

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO  
TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL**

**MARIA CARMELA KASNOWSKI**

***Listeria* spp., *Escherichia coli*: ISOLAMENTO,  
IDENTIFICAÇÃO, ESTUDO SOROLÓGICO E  
ANTIMICROBIANO EM CORTE DE CARNE BOVINA  
(ALCATRA) INTEIRA E MOÍDA**

**UNIVERSIDADE  
FEDERAL  
FLUMINENSE**

**Niterói  
2004**

MARIA CARMELA KASNOWSKI

*Listeria* spp., *Escherichia coli*: ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO, ESTUDO SOROLÓGICO E ANTIMICROBIANO EM CORTE DE CARNE BOVINA (ALCATRA) INTEIRA E MOÍDA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de P.O.A.

Orientador: Prof. Dr. ROBSON MAIA FRANCO

Niterói  
2004

MARIA CARMELA KASNOWSKI

*Listeria* spp., *Escherichia coli*: ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO, ESTUDO  
SOROLÓGICO E ANTIMICROBIANO EM CORTE DE CARNE BOVINA (ALCATRA)  
INTEIRA E MOÍDA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de P.O.A.

Aprovada em setembro de 2004.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Robson Maia Franco - Orientador  
Universidade Federal Fluminense

---

Prof. Dr. Luiz Antônio Trindade de Oliveira - Co-orientador  
Universidade Federal Fluminense

---

Dra. Maria da Graça Fichel do Nascimento  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/ EMBRAPA

Niterói  
2004

A DEUS, por iluminar meu caminho e me fortalecer diante das dificuldades.

Ao meu pai, Francesco Kasnowski (*in memoriam*), por ter me amado e pela certeza de que, mesmo tão distante, estará feliz com mais uma conquista minha.

À minha família: mãe, filho, marido, irmão e avó; pelo exemplo de amor e por constituírem peças fundamentais na minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Robson Maia Franco, pela oportunidade, confiança, amizade, dedicação e principalmente pela sua orientação imprescindível na realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Teófilo José Pimentel da Silva, por ter me iniciado na área de tecnologia e inspeção de alimentos, pela amizade, pelo estímulo e apoio prestados durante todo o curso de mestrado.

Ao meu marido, Marcelo R. M. Holanda Duarte, por ter me proporcionado a oportunidade de voltar a estudar; pela amizade, amor e compreensão.

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio Trindade de Oliveira, pelo estímulo, amizade e ajuda prestados.

Ao técnico Alcinez Paes Fidelis, pela amizade e ajuda nas atividades laboratoriais.

Ao Prof. Sérgio Carmona de São Clemente e ao Prof. Henrique Silva Pardi, ambos da Faculdade de Veterinária – UFF, pelo apoio e recursos prestados.

Ao Dr. Ernesto Hofer e à assistente Cristhiane Moura F. dos Reis (bióloga) do Laboratório de Zoonoses- Departamento de Bacteriologia da FIOCRUZ, pela realização da caracterização antigênica das cepas de *Listeria* spp. isoladas.

À Prof. Dra. Mônica Queiroz, da Faculdade de Veterinária –UFF, pela amizade e auxílio na realização da análise estatística desta pesquisa.

À Prof. Dra. Eliana de Fátima Marques de Mesquita, da Faculdade de Veterinária- UFF, pela amizade e auxílio no uso da língua estrangeira.

À amiga Carolina Pombo, pelo auxílio na formatação do trabalho e na elaboração da apresentação.

Ao Dráusio Ferreira de Paiva, secretário da coordenação de pós-graduação, pela amizade, consideração e apoio às solicitações.

Aos amigos do curso de mestrado, que me apoiaram e auxiliaram nesta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pelo auxílio financeiro.

## SUMÁRIO

### LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### LISTA DE TABELAS

### LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

### RESUMO

### ABSTRACT

### 1 INTRODUÇÃO, p.

### 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, p.

#### 2.1 *Listeria* spp.

##### 2.1.1 TAXONOMIA E CARACTERÍSTICAS DO MICRORGANISMO

##### 2.1.2 EPIDEMIOLOGIA

##### 2.1.3 OCORRÊNCIA DE *LISTERIA* EM ALIMENTOS

##### 2.1.4 FATORES INTERFERENTES NA SOBREVIVÊNCIA E NO CRESCIMENTO DE *Listeria* spp.

##### 2.1.5 VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE

##### 2.1.6 CARACTERÍSTICAS DA DOENÇA

#### 2.2 *Escherichia coli*

##### 2.2.1 TAXONOMIA E CARACTERÍSTICAS DO MICRORGANISMO

##### 2.2.2 EPIDEMIOLOGIA

##### 2.2.3 OCORRÊNCIA DE DIFERENTES SOROVARES DE *E. coli* EM ALIMENTOS

##### 2.2.4 FATORES INTERFERENTES NA SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO

##### 2.2.5 VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE

##### 2.2.6 CARACTERÍSTICAS DA DOENÇA

#### 2.3 MEDIDAS DE CONTROLE, p.

#### 2.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS

#### 2.5 LEGISLAÇÃO

### 3 MATERIAL E MÉTODOS, p.

#### 3.1 MATERIAL E AMOSTRAGEM

#### 3.2 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS

#### 3.3 METODOLOGIA

##### 3.3.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Listeria* spp.

###### 3.3.1.1 Provas bioquímicas

###### 3.3.1.2 Caracterização antigênica das cepas isoladas de *Listeria*

##### 3.3.2 ENUMERAÇÃO DE *Escherichia coli*

##### 3.3.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Escherichia coli* PATOGÊNICAS (EPEC e EIEC)

###### 3.3.3.1 Interpretação dos testes de Mili e EPM

##### 3.3.4 ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO DE *E.coli* O157:H7 E DIFERENCIAÇÃO DE CEPAS ENTEROHEMORRÁGICAS (EHEC)

##### 3.3.5 SOROLOGIA

##### 3.3.6 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

#### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

### 4 RESULTADOS, p.

**5 DISCUSSÃO, p.**

**6 CONCLUSÕES, p.**

**7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p.**

**8 APÊNDICES, p.**

**9 ANEXOS, p.**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1-** Isolamento de *Listeria* spp. pelo método USDA

**Figura 2-** NMP de *Escherichia coli* (MERCK, 2000) – **Método 1**

**Figura 3-** Isolamento e identificação de cepas de *E.coli* patogênicas (EIEC, EPEC, EHEC) (Mehlman; Lovett, 1984) **Método 2**

**Figura 4-** Isolamento e identificação de *E.coli* O157:H7 e diferenciação de cepas enterohemorrágicas (EHEC) (MERCK, 1996) – **Método 3**

**Figura 5** - *Listeria* spp.; Microscopia eletrônica

**Figura 6** - *Listeria* spp. com presença de flagelos peritríquios (microscopia eletrônica)

**Figura 7** - Colônias de *Listeria* spp. em placas contendo ágar MOX

**Figura 8** - *Listeria* spp.; coloração de Gram; microscopia óptica

**Figura 9** - CAMP- test. Placa contendo ágar com sangue de carneiro.

**Figura 10** - Caldo Fluorocult com reagente de Kovacs para diagnóstico rápido de *E. coli* e Caldo Fluorocult sob luz UV

**Figura 11** - Teste de sensibilidade aos antimicrobianos; meio ágar Müller- Hinton

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1-** Número de cepas de *Listeria* spp. isoladas das amostras de carne (alcatra) inteira e carne (alcatra) moída

**TABELA 2-** Número de cepas isoladas de acordo com o meio de enriquecimento das amostras de carne inteira e moída.

**TABELA 3** - Valores médios de isolamentos de cepas de *Listeria* spp. em amostras de carne bovina (alcatra) inteira e moída

**TABELA 4** - Valores médios de isolamentos de cepas de *Listeria* spp. quanto ao enriquecimento primário e secundário aos enriquecimentos primários e secundários utilizados na metodologia

**TABELA 5** – Comportamento das cepas de *Listeria* spp. isoladas frente aos antimicrobianos

**TABELA 6** - Resultados das análises de NMP pelo método 1 de amostras de carne (alcatra) inteira (CI) e carne moída (CM)- Enumeração de *Escherichia coli*.

**TABELA 7** - Valores médios de NMP de coliformes a 35°C e coliformes a 45°C em amostras de carne bovina (alcatra) inteira e moída.

**TABELA 8** - Número de colônias de *Escherichia coli* isoladas de amostras de carne bovina (alcatra) pelo método 2

**TABELA 9** - Número de colônias de *Escherichia coli* isoladas de amostras de carne bovina (alcatra) pelo método 3

**TABELA 10** - Valores médios de isolamento de cepas de *E. coli* de amostras de carne bovina (alcatra) quanto ao fator tratamento (inteira e moída)

**TABELA 11** - Valores médios de cepas de *E. coli* oriundas de amostras de carne bovina (alcatra) inteira e moída quanto ao fator método de isolamento 2 e 3.

**TABELA 12** - Sorogrupos indicadores de *Escherichia coli* considerados patogênicos isolados de meios de cultura seletivos

**TABELA 13** - Comportamento das cepas de *E. coli* isoladas e sorotipadas como patogênicas frente aos antimicrobianos

**TABELA 14** – Características diferenciais de *Listeria* spp.

**TABELA 15** – Características bioquímicas úteis na diferenciação dos gêneros *Brochothrix*, *Erysipelothrix*, *Listeria*, *Lactobacillus* e *Kurthia*.

**TABELA 16** – Sorotipos das espécies de *Listeria*

**TABELA 17** – Características bioquímicas identificáveis da *Escherichia coli*

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Aa	Atividade de água
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
A/E	Attachment/ Efforcement
APHA	America Public Health Association
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
AOAC	Association of Official Analytical
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ATCC	American Type Culture Collection
bact./mL	bactéria/mililitro
Bfp	Bundle forming pillus
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BHI	Brain Heart Infusion
°C	Graus centígrados
CDC	Centers for Disease Control
CFA.	Co Factor Adesion
cm	centímetro
DAEC	Diffusely adherent <i>Escherichia coli</i>
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
eae	<i>Escherichia coli</i> attaching and effacing
eaf	EPEC adherence factor
EaggEC	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
EMB	Eosin Metilen Blue
EPEC	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>
ETEC	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Food Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FSIS	Food Safety and Inspection Service
g	Grama
h	Hora
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Point
H <sub>2</sub> S	Sulfeto
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Inv	Invasion
IPA	Invasion Plasmid Antigen
Kcal	Quilocalorias
KDa	Quilo Dalton
Kg	Quilograma
KGy	Quilogray
LLO	Listeriolisina O
LT	Labile Toxin
M.A	Ministério da Agricultura
MCLac	MacConkey lactose
MCS	MacConkey sorbitol

MDal	mili Dalton
Mg	Miligrama
MG	Minas Gerais
MILI	Motilidade Indol Lisina
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
MOX	Modified Oxford
MR	Metil Red
M.S	Ministério da Saúde
MUG	Metil Umbeliferil Galactopiranosídeo
n·	Número
NaCl	Cloreto de sódio
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
Nm	Nanômetro
NMP	Número Mais Provável
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pb	Pares de base
Per	Plasmid encoded regulator
POA	Produtos de origem animal
PPHO	Procedimentos Padrão de Higiene Operacional
PTT	Púrpura Trombocitopênica Trombótica
RJ	Rio de Janeiro
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SIM	Sulfeto Indol Motilidade
SLT	Shiga Like Toxin
SNC	Sistema nervoso central
SOPs	Sanitation Standard Operating Procedures
SP	São Paulo
SS	<i>Salmonella-Shigella</i>
SSP	Solução salina peptonada
ST	Stabile Termic
SUH	Síndrome Urêmica Hemolítica
TAF	Tríplice Açúcar Ferro
TSI	Triple Sugar Iron
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFF	Universidade Federal Fluminense
USDA	United State Departamnt of Agriculture
UV	Ultra-Violeta
UVM	University of Vermont Medium
VP	Voges Proskauer
VT	Verotoxina
µm	Micrômetro
%	Por cento

## RESUMO

Os surtos de enfermidades transmissíveis por alimentos (ETA) constituem alvo de preocupação para as indústrias alimentícias e para os órgãos de Saúde Pública. A *Listeria monocytogenes* e as cepas patogênicas de *Escherichia coli* estão comumente presentes no trato intestinal dos animais, possibilitando a contaminação da carcaça e cortes de carne durante o abate ou o processamento inadequado. A importância que a carne apresenta na alimentação humana associada à necessidade de se oferecer sempre um alimento inócuo e incapaz de veicular doenças, induziram ao desenvolvimento desta pesquisa com o objetivo de isolar e identificar *Listeria* spp.; enumerar, isolar e identificar sorogrupos de *E. coli* em 30 amostras de carne bovina (alcatra) comercializadas em supermercados e açougues do Rio de Janeiro. Dessas amostras, 15 foram inteiras e 15 moídas no próprio estabelecimento. Após identificação, os sorogrupos também foram testados quanto à susceptibilidade antimicrobiana. Dentre as amostras examinadas, um maior número de isolamentos foi obtido na carne moída, porém, sem significância estatística. As cepas de *Listeria* mais identificadas pertenciam ao sorogrupo da *L. innocua* 6a, seguida da *L. monocytogenes* 4b. O método utilizado foi o da USDA com enriquecimento secundário, o que possibilitou maior percentual de isolamento. Em relação à *E. coli*, foram isoladas cepas EPEC, EIEC e EHEC. Todos os isolamentos foram confirmados bioquímica e sorologicamente. As cepas patogênicas de *Listeria* e *E. coli* apresentaram grande espectro de resistência frente aos antimicrobianos testados. A presença de *L. monocytogenes* e sorogrupos de *E. coli* nas amostras avaliadas é indicativa da necessidade de se colocar em prática os programas de Boas Práticas de Fabricação (BPF), Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC); preservando desta maneira a saúde do consumidor.

Palavras - chave: carne bovina, *Listeria*, *Escherichia coli*, antimicrobianos.

## ABSTRACT

The outbreaks of foodborne diseases constitute a target of concern to the food industries and to the Public Health agencies. *Listeria monocytogenes* and pathogenic variants of *Escherichia coli* are usually present in the intestinal tract of animals, making possible the contamination of the carcass and meat cuts during slaughtering or by inadequate processing. The importance of meat as human food associated to the needs of having a safety food which is not capable to cause illnesses, had induced to the development of this research with the objective to isolate and to identify *Listeria* spp.; to enumerate, to isolate and to identify strains of *E. coli* in 30 samples of beef (heart of rump) sold in supermarkets and butchers of Rio de Janeiro. Of these samples, 15 were composed by whole beef and 15 were grounded in each own establishment. After identification, the strains were also tested for antimicrobial susceptibility. Amongst the examined samples, a greater number of isolations were obtained from ground meat, but it was not statistically significant. Most of the variants of *Listeria* identified belonged to serogroup of *L. innocua* 6a, followed of *L. monocytogenes* 4b. The adopted method was the USDA with secondary enrichment, which made possible a great percent of isolation. Concerning *E. coli*, variants of EPEC, EIEC and EHEC were isolated. All the isolates had been confirmed biochemically and sorologically. The patogenic variants of *Listeria* and *E. coli* presented a great specter of resistance to antimicrobials. The presence of *L. monocytogenes* and serogroups of *E. coli* in the examined samples stands out the need of programs of Good Manufacturing Practice (GMP), Sanitation Standard Operation Procedures (SSOP), and Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP); to preserve the consumer's health.

Key-words: beef, *Listeria*, *Escherichia coli*, antimicrobial.

## 1 INTRODUÇÃO

A carne bovina é uma excelente fonte de proteínas de alto valor biológico, de vitaminas do complexo B e minerais essenciais (especialmente ferro e zinco), sendo muito utilizada na alimentação humana (FELÍCIO, 1998). A carne moída destaca-se, entre os produtos cárneos, pela sua boa aceitação comercial e por se caracterizar como produto popular utilizado em refeições de maneiras práticas e variadas (FLORENTINO et al., 1997).

A alcatra é um corte de carne bovina, cuja composição média presente em 100g é: 191,0 Kcal; 30,4g de proteínas; 6,8g de gordura; 89,0 mg de colesterol; 3,4 mg de ferro e 6,5 mg de zinco (PROTESTE, 2003).

Entretanto os alimentos cárneos, particularmente aqueles que passam por apreciável manuseio, se constituem em excelente meio de cultura devido à elevada porcentagem de umidade, pH próximo à neutralidade e composição rica em nutrientes; favorecendo a instalação, sobrevivência e multiplicação de grande número de microrganismos capazes de provocar toxinfecções no homem (FRAZIER; WESTHOFF, 1993).

As condições sanitárias deficientes durante o abate dos animais, cozimento inadequado, armazenamento impróprio e falta de higiene durante o preparo dos produtos cárneos são fatores que podem predispor os indivíduos a ETA ou a tornarem-se portadores assintomáticos.

As enfermidades humanas e animais passam a ter maior destaque quando se transformam em condições que contribuem para a diminuição da produção e da oferta de bens e serviços de uma população, bem como, quando comprometem a saúde humana. Além disso, a presença de microrganismos patogênicos em

alimentos muitas vezes significa uma barreira para as exportações, influenciando significativamente na economia do país.

Neste contexto as ETA se constituem atualmente em uma grande preocupação para as indústrias de alimentos e órgãos oficiais de regulamentação em termos de segurança alimentar.

Inicialmente denominada *Bacterium monocytogenes*, *Listerella hepatolytica*, *Erysipelothrix monocytogenes* e finalmente *Listeria*, em homenagem a Lord Lister, descobridor da antissepsia; o agente causal da listeriose foi descrito pela primeira vez no ano de 1926 por Murray, em virtude de uma infecção espontânea que ocorreu entre cobaias de laboratório caracterizada por uma monocitose, em Cambridge – EUA (FARBER; PETERKIN, 1991; HOBBS; ROBERTS, 1992; PEREIRA; ROCOURT, 1993; LOGUERCIO et al, 2001; RYSER; DONNELLY, 2001).

O meio científico foi despertado para o perigo da listeriose durante a década de 80, quando uma série de surtos ocorreu na América do Norte e Europa (SCHLECH, 1988; FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Os estudos e procedimentos para isolamento e enumeração de *Listeria* spp em alimentos têm aumentado muito nos últimos anos, tendo em vista a comprovada relevância como patógeno emergente de origem alimentar, documentada pelos inúmeros surtos e casos de listeriose que surgiram nas décadas de 80 e 90, envolvendo alimentos como veículo (FARBER; PETERKIN, 1991; OLIVEIRA, 1993).

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 a 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, 1988; SCHLECH, 1988; NASCIMENTO; CULLOR, 1994; INTERLAB, 2002).

Outro prisma a ser abordado é que, na rotina bacteriológica de um laboratório, observa-se que aproximadamente 90% dos isolados são bactérias Gram negativas, sendo que 95% pertencem à família *Enterobacteriaceae*, onde a *Escherichia coli* inclui-se no quadro das espécies mais comumente identificadas. No caso do Homem, estas bactérias podem determinar processos entéricos, assim como uma variedade de infecções extra-intestinais. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se a ocorrência no mundo de um bilhão de episódios diarreicos por

ano, atingindo, particularmente, crianças menores de cinco anos, tendo como consequência elevada letalidade (BRASIL, 2002).

*Escherichia coli* é a espécie predominante entre os diversos microrganismos anaeróbios facultativos que fazem parte da microbiota intestinal de animais de sangue quente. O significado da sua presença nos alimentos deve ser avaliado sob dois ângulos: indica contaminação microbiana de origem fecal e portanto condições higiênicas insatisfatórias; e o outro aspecto a ser considerado é que diversas linhagens são comprovadamente patogênicas para o Homem e os animais. A enumeração laboratorial de *E. coli* auxilia na detecção do perigo potencial de uma toxinfecção alimentar através da água e dos alimentos fornecidos ao consumo (HOBBS; ROBERTS, 1992; FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Franco (2002) relata que esta espécie foi descrita pela primeira vez por Dr. Theodor Escherich em 1885 ao tentar isolar o agente etiológico da cólera. Germano e Germano (2001) citam que o primeiro nome dado a esta bactéria foi *Bacterium coli commune* devido ao fato de ser encontrada no cólon e extremamente comum nos animais e no Homem.

Os surtos decorrentes da infecção por *Escherichia coli* (EPEC, EIEC, EaggEC e EHEC) são considerados severos. A *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) e a *E. coli* enteroagregativa (EaggEC) destacam-se entre os microrganismos classificados como emergentes (MARTINS et al., 2003). Os sorotipos de EHEC são os que produzem duas citotoxinas responsáveis pela colite hemorrágica no homem, tendo como complicação mais importante a síndrome hemolítica urêmica. O sorotipo O157:H7 é a EHEC mais freqüentemente encontrada. A EaggEC foi descrita mais recentemente e está associada a casos crônicos de diarreia (ibid.).

A *E. coli* O157:H7 tem sido reconhecida mundialmente, nos últimos tempos, como um dos microrganismos mais envolvidos nos surtos de doenças veiculadas por alimentos em humanos. Em 1982 ocorreu um surto de *E.coli* O157:H7 pelo consumo de hambúrguer mal cozido em uma grande rede de “fast food” nos Estados Unidos, que envolveu 600 pessoas resultando na morte de quatro crianças (SILVA et al, 1997).

A *Listeria* spp., *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) e a *E. coli* enteroagregativa (EaggEC) são patógenos emergentes que vêm sendo relacionados a diversos surtos de doenças de origem alimentar principalmente por estarem

presentes no trato gastrointestinal dos animais, sendo muito comum a contaminação da carcaça e cortes de carne durante o abate ou processamento inadequado.

Os relatos anteriormente citados contribuem para que o controle microbiológico se apresente como uma etapa essencial durante o processamento da carne, para o fornecimento de um alimento aceitável e seguro ao consumo. Tanto a presença de microrganismos contaminantes quanto a de patógenos podem provocar alterações que descaracterizam o produto ou, no caso de alguns patógenos, tornar somente o seu consumo perigoso e impróprio para a saúde humana, sem, entretanto, causarem alterações aparentes.

Com base nos fatos mencionados, o presente estudo teve como objetivo:

- Verificar a ocorrência de bactérias dos gêneros *Listeria* e *Escherichia* a partir de amostras de corte de carne bovina (alcatra), inteira e moída, em diferentes estabelecimentos nas condições oferecidas ao consumo;
- Isolar e identificar *Listeria* utilizando a metodologia proposta pelo USDA;
- Enumerar, isolar e identificar *E. coli* nas respectivas amostras por diferentes métodos;
- Realizar a sorologia e o teste de sensibilidade antimicrobiana das cepas de *Listeria* spp. e *E. coli* isoladas;
- Alertar as autoridades sanitária e fiscalizadora para possíveis riscos de ocorrência de surtos por *Listeria* e diferentes sorotipos de *E. coli*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Listeria* spp.

#### 2.1.1 TAXONOMIA E CARACTERÍSTICAS DO MICRORGANISMO

Segundo Seeliger e Jones (1986), as bactérias do gênero *Listeria* são bastonetes Gram positivos curtos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, com extremidades arredondadas, medindo 0,4 a 0,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 0,5 a 2,0  $\mu\text{m}$  de comprimento. Podem ocorrer isoladamente em cadeias curtas ou arranjados em ângulos formando “V” entre si ou em grupos que se mantêm paralelos ao longo dos eixos (ANEXOS- FIGURA 5).

A *Listeria monocytogenes* é móvel 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; FRANCO; LANDGRAF, 1996; TODAR, 2003) (ANEXOS-FIGURA 6).

Em relação às características bioquímicas, *Listeria* spp é catalase positiva, oxidase negativa, móvel a 20°C; algumas espécies são  $\beta$  hemolíticas em ágar sangue (*L. monocytogenes*, *L. seeligeri* e *L. ivanovii*), D-xilose negativo, D-manitol negativo, L-ramnose positivo,  $\alpha$  metil-D-manosídeo positivo, fermentam a glicose, vermelho de metila positivo, Voges Proskauer positivo, indol negativo, esculina positivo e não reduzem nitrato (SEELIGER; JONES, 1986; LOVETT, 1988; BILLE et al., 1992) (ANEXOS- TABELA 14).

Em ágar nutriente, as colônias, após 24 – 48 horas de incubação, são arredondadas, translúcidas, pouco convexas e de bordos regulares. Apresentam

coloração cinza azulada pela iluminação normal e produzem um brilho verde azulado característico quando a luz é transmitida obliquamente (SEELIGER; JONES, 1986).

O gênero *Listeria* é classificado juntamente com os gêneros *Lactobacillus*, *Erysipelotrix*, *Brochothrix*, *Caryophanon* e *Renibacterium* (ANEXOS- TABELA 15). As espécies reconhecidas são: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. murayi*. A espécie *L. denitrificans* foi transferida para o gênero *Jonesia* (ibid.).

No que diz respeito à sorologia, foram descritos 16 sorovares, sendo 15 antígenos somáticos “O” e cinco antígenos flagelares “H”. A *Listeria monocytogenes*, considerada a espécie patogênica para homens e animais, contém os sorovares 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 7 (ibid) (ANEXOS- TABELA 16).

### 2.1.2 EPIDEMIOLOGIA

A listeriose apresenta distribuição geográfica mundial, sendo aparentemente mais freqüente 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).

*Listeria monocytogenes* encontra-se amplamente disseminada na natureza. Tanto o Homem como os animais e o ambiente servem como reservatórios. No Homem, o seu isolamento de indivíduos assintomáticos, provavelmente, é conseqüência da colonização do trato intestinal (LAGE, 1993; OLIVEIRA, 1993; FRANCO; LANDGRAF, 1996; SILVA, 1996; TODAR, 2003).

O primeiro surto de listeriose humana veiculada por alimentos data de 1979, nos EUA, quando 20 pacientes internados apresentaram a doença atribuída ao consumo de saladas de alface, tomate e salsa (LOGUERCIO et al., 2001).

Durante a década de 80 ocorreram vários surtos, como, por exemplo, os relatados no Canadá em 1981; Califórnia em 1983; Suíça 1983-1987; Reino Unido 1989-1990 e França 1993-1995 (SCHLECH, 1988; UBOLDI EIROA, 1990; PEREIRA; ROCOURT, 1993; NASCIMENTO; CULLOR, 1994; FRANCO; LANDGRAF, 1996; LOGUERCIO et al., 2001; CRESPO et al., 2003).

Entretanto, o primeiro surto que realmente despertou os microbiologistas de alimentos para o problema ocorreu no Canadá, e o alimento incriminado foi a salada

de repolho cru (tipo “coleslaw”). A hortalíça era cultivada em campos fertilizados com fezes de ovinos, que haviam sido portadores da listeriose (ibid.).

O ocorrido em Massachussets (USA) foi atribuído ao consumo de leite pasteurizado; na Califórnia, foi associado ao consumo de queijos estilo Mexicano; na Suíça, o alimento envolvido também foi o queijo (ibid.).

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; alta prevalência da bactéria no ambiente e hábitos de manuseio, preparo e armazenamento inadequados dos alimentos (CRESPO et. al., 2003).

Em estudos diversos, ficou evidenciada a presença de *Listeria* spp a partir de diversas fontes como animais domésticos e silvestres; peixes, animais marinhos e água do mar; vegetação, silagem e forragens; em solos e esgoto. A habilidade do microrganismo em sobreviver às condições ambientais extremas explica a ocorrência em áreas rurais e urbanas em diferentes regiões do mundo (BRACKETT, 1988; SCHLECH, 1988; HOBBS; ROBERTS, 1992). Hofer e Póvoa (1984) demonstraram essa capacidade de sobrevivência ao isolarem *L. monocytogenes* a partir de 20 amostras de solo da cidade do Rio de Janeiro.

A *Listeria monocytogenes* tem sido identificada com relativa freqüência em fezes de pessoas e animais aparentemente saudáveis, sendo encontrada em águas de esgoto; como foi demonstrado por Hofer (1975) em amostras provenientes da estação de tratamento de esgoto da Penha e do Galeão (Rio de Janeiro).

A *Listeria* spp também tem sido isolada em superfícies de equipamentos e de vários produtos de usinas de processamento de leite e derivados; indústrias processadoras de carnes; desde a entrada da matéria-prima até às águas residuais (FRANCO; LANDGRAF, 1996; SILVA, 1996).

A *Listeria monocytogenes* pode acometer uma variedade de espécies de animais silvestres ou domésticos, de sangue frio ou quente. Deste modo, a listeriose é considerada uma zoonose na qual o agente etiológico apresenta grande potencial patogênico para o Homem (SCHLECH, 1988).

No período de 1969 a 1983, Hofer et al. (1984) caracterizaram sorologicamente 71 cepas de *L. monocytogenes*, isoladas de processos patológicos e de portadores humanos no estado do Rio de Janeiro.

Kampelmacher e Van Noorle Jansen<sup>1</sup> (1969; apud BRYAN, 1986) constataram que entre as pessoas que trabalhavam em abatedouros 10 a 30% eram portadores assintomáticos de *Listeria monocytogenes* e também que veterinários de campo apresentavam listeriose cutânea adquirida pela manipulação de produtos de aborto infectados.

Durante os surtos, a mortalidade pode atingir 40% dos acometidos pela infecção; nos casos de meningite, essa taxa pode atingir 70% e nas septicemias 50% (GERMANO; GERMANO, 2001).

No Brasil não existem descrições de surtos de listeriose causados por alimentos, entretanto, há relatos da presença do microrganismo em alimentos, tornando-se uma preocupação, já que a ingestão de alimentos de origem animal é considerada a principal fonte de transmissão para o Homem (NASCIMENTO; CULLOR, 1994).

A ocorrência dessa enfermidade está crescendo em nível mundial, fato esse que preocupa as indústrias e as autoridades sanitárias devido à sua alta taxa de mortalidade, larga distribuição em produtos crus, capacidade de crescimento em baixas temperaturas e de se estabelecer nos vários ambientes do processamento de alimentos (SILVA; TIBANA, 1995; MURIANA, 1996; RIJPENS et al., 1997).

### 2.1.3 OCORRÊNCIA DE *LISTERIA* EM ALIMENTOS

De acordo com a literatura 32% dos casos esporádicos de listeriose são atribuídos ao consumo de alimentos contaminados (CRESPO et al., 2003).

Dediol et al. (2002) ressaltam que muitos animais portam *Listeria monocytogenes* em seu trato intestinal, o que impossibilitaria sua total eliminação da carne crua. Este fato associado ao caráter ubíquo do patógeno e às restritas normas de higiene resultaria na inevitável contaminação de numerosos alimentos.

Deste modo, os alimentos incriminados são diversos tais como: leite cru e pasteurizado, queijos, carnes bovinas, suínas, de aves, peixes, embutidos, carne moída, produtos cárneos crus e termoprocessados, além de produtos de origem vegetal, origem marinha e refeições preparadas (FRANCO; LANDGRAF, 1996; GERMANO; GERMANO, 2001; DEDIOL et al., 2002).

---

<sup>1</sup> KAMPELMACHER, E.H.; VAN NOORLE JANSEN, L.M. Zentrakbl. Bakteriol. Parasitenk, Infektionskr.Hyg. Abt.1:Orig. A211, 353, 1969.

O leite e produtos lácteos (principalmente queijos) têm sido os alimentos mais freqüentemente envolvidos em casos recentes e esporádicos de listeriose associados aos produtos alimentares (DESTRO; SERRANO, 1990; NASCIMENTO; CULLOR, 1994; LOGUERCIO et. al. 2001).

Guerra e Bernardo (1999) analisaram 68 amostras de queijos alentejanos e isolaram *Listeria* sp. em 25% dessas; tendo sido encontrada *L. monocytogenes* em 11,8%.

Há relatos da presença de *Listeria monocytogenes* em diversos tipos de queijos, nos processos de produção e armazenamento de leite em pó, manteiga, leite fermentado refrigerado, leiteiro, iogurte desnatado e integral (DESTRO; SERRANO, 1990).

Em relação à presença do microrganismo em leite pasteurizado, vários estudos foram realizados com o intuito de esclarecer a termotolerância do microrganismo devido à localização intracelular, contudo ainda há discordância sobre esta questão (DESTRO; SERRANO, 1990; PEREIRA; ROCOURT, 1993; FRANCO; LANDGRAF, 1996). Alguns autores justificaram a ocorrência devido a uma insuficiente pasteurização ou a recontaminação pós-processamento (UBOLDI EIROA, 1990; LOGUERCIO et. al., 2001).

Destro e Serrano (1990) advertiram para a sobrevivência do microrganismo em carnes de cordeiro, suíno e bovina moída mantidas a 0°C por 20 a 24 dias. Também descreveram outros produtos que possibilitavam a sobrevivência e/ou o crescimento de *L. monocytogenes*, como ovos líquidos e desidratados, salames, embutidos, peito de frango e músculo bovino.

Existem relatos de isolamentos de *L. monocytogenes* de cortes de frango, peru, salsichas, salame, carne bovina moída e outros produtos cárneos, pescados (camarão, caranguejo, lagostas, mariscos, lula), vegetais (alface, tomate, salsa) e alimentos congelados (FABER et al., 1989; JOHNSON et. al., 1990; UBOLDI EIROA, 1990; WONG et. al., 1990; PEREIRA; ROCOURT, 1993).

Em um programa realizado pelo USDA-FSIS para verificar a ocorrência de *L. monocytogenes* em carne bovina crua, no período de 1987 a 1990, o microrganismo foi isolado de 122 (7,1%) das 1.726 amostras monitoradas (RYSER; MARTH, 1991). A incidência de *Listeria* em produtos cárneos também foi demonstrada por Truscott e

McNab<sup>2</sup> (apud RYSER; MARTH, 1991) ao isolarem *Listeria* spp. em 45 das 50 amostras de carne bovina moída analisadas no Canadá. Na França, Le Guillox et al.<sup>3</sup> (apud RYSER; MARTH, 1991) também demonstraram a ocorrência de *L. monocytogenes* em 4,9%, 21,2% e 19,8% das amostras avaliadas de carcaça bovina, carne moída e carne moída congelada respectivamente.

Dentre os trabalhos realizados no Brasil, referentes ao isolamento de *Listeria* em alimentos, destacam-se alguns, como: a análise de 20 produtos cárneos e lácteos nos quais foi detectada a presença de *L. monocytogenes* em 4,4% das amostras de carne de frango, 70% das de salsicha, 80% das de lingüiça frescal, 65% das de carne moída, 8,9% das de camarão industrializado e 10% das de queijo tipo minas frescal (DESTRO et al., 1992); amostras originárias de 25 quartos dianteiros bovinos, que, após a desossa, foram utilizados como matéria-prima para industrialização, das quais 24 resultaram em positivas (PICCHI et al., 2003); 50 amostras de carne moída, das quais 24 estavam contaminadas por *Listeria* spp. (MESQUITA, 1990); a carne de frango na cidade de Belo Horizonte, na qual a frequência foi alta em 100% das amostras, tendo a ocorrência de *L. monocytogenes* em 4,4% (LAGE, 1993); 40 amostras de peito de frango congelado em que 100% foram positivas e 50% para a espécie *L. monocytogenes* (GONÇALVES, 1998); amostras fatiadas de blanquet de peru e presunto de peru com a frequência de 50% e 60% de *L. monocytogenes* respectivamente (ARAÚJO, 1998).

Dediol et al. (2002) analisaram 100 amostras de carne moída de supermercados e açougues da área de Mendoza, detectando 37% dessas amostras contaminadas com *Listeria monocytogenes*. No total, isolaram e estudaram 306 colônias, das quais 68 cepas foram identificadas como *Listeria monocytogenes*. Os autores relataram que os resultados encontrados assemelhavam-se as 34,2% amostras positivas de carne fresca analisadas por lida<sup>4</sup> (1998; apud DEDIOL et al., 2002).

Numa avaliação da qualidade microbiológica de 20 amostras de carne moída em supermercados e açougues, realizada por uma equipe da defesa do consumidor, a *Listeria monocytogenes* foi encontrada em duas amostras moídas no momento da

---

<sup>2</sup> TRUSCOTT, R.B.; McNAB, W.B. Comparison of media and procedures for the isolation of *Listeria monocytogenes* from ground beef. *J. Food Prot.* V.51, p. 626-628, 1988.

<sup>3</sup> LE GUILLOUX, M.; DOLLINGER, Cl.; FREYBURGER, G. *Listeria monocytogenes*- Sa fréquence dans les produits de charcuterie. *Bull. Soc. Vet. Prat. France*, V.64, n1, p. 45-53, 1980.

compra, em duas das previamente moídas e vendidas a granel e em cinco das pré-moídas e embaladas (PROTESTE, 2003).

Existem numerosos caldos de enriquecimento e meios de plaqueamento para isolamento e detecção de *Listeria* spp. em alimentos. Os mais comumente utilizados são os desenvolvidos pelo FDA e USDA (RYSER; DONNELLY, 2001). O método do FDA é usado para examinar leite, produtos lácticos, pescado e vegetais. Por conseguinte, McClain e Lee (1988), testando o procedimento do USDA, isolaram *L. monocytogenes* de 20 das 41 amostras de carne moída congelada e 12 das 23 amostras de lingüiça de porco; comprovando a eficiência do método na avaliação de carne crua, produtos cárneos e de aves.

#### 2.1.4 FATORES INTERFERENTES NA SOBREVIVÊNCIA E NO CRESCIMENTO DE *Listeria* spp.

Diversos fatores podem afetar o crescimento, a sobrevivência e a multiplicação da *Listeria* em alimentos, dentre eles: temperatura, pH, atividade de água, cloreto de sódio, nitrito de sódio, conservantes, atmosfera e outros.

Os alimentos de origem animal, particularmente os que passam por apreciável manuseio, como, por exemplo, os produtos cárneos que sofrem processo de moagem, apresentam condições propícias para instalação, sobrevivência e multiplicação de grande número de microrganismos (MOTTA et al., 2000; PROTESTE, 2003).

O desenvolvimento da agroindústria alimentar, a forma como os alimentos são produzidos, a habilidade da *Listeria* spp de sobreviver em condições adversas, sua capacidade de crescer em temperatura de refrigeração, aliada à sua resistência ao congelamento, ao calor e a diversos antibióticos, tornaram esse microrganismo emergente e de grande importância entre os patógenos transmitidos por alimentos (FARBER; PETERKIN, 1991; SILVA; TIBANA, 1995; MURIANA, 1996; RIJPENS et al., 1997; BRACKETT, 1998).

As listérias crescem em temperatura de 1 a 45°C, sendo a faixa ótima de 30 a 37°C, embora existam relatos sobre o crescimento a 0°C. Suportam repetidos congelamentos e descongelamentos (LOVETT, 1988; FRANCO; LANDGRAF, 1996; SEELIGER; JONES, 1986; GERMANO; GERMANO, 2001.). A característica

---

<sup>4</sup> IIDA, T., et al. Detection of *Listeria monocytogenes* in humans, animals and foods. *J. Vet. Med. Sci.*

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 lag fase prolongada em temperaturas de refrigeração (OLIVEIRA, 1993). Destro e Serrano (1990) relataram estudos sobre o isolamento de *Listeria* spp. em carne moída armazenada sob refrigeração (4°C), onde se verificou que o microrganismo permanecia viável por duas semanas ou até por 30 dias. Além de sua característica psicrotrófica, diversos autores mencionaram sua capacidade de termotolerância (VARNMAM; EVANS, 1996a; LOGUERCIO et. al., 2001).

Embora o pH ótimo para crescimento esteja numa faixa entre 6,0 e 8,0 (ibid; LOVETT, 1988), podem resistir a um intervalo mais amplo de 5,0 e 9,6 (UBOLDI EIROA, 1990). No entanto, em algumas situações especiais, foi relatada a ocorrência do microrganismo em pH 4,3 e 4,8; apesar desses serem considerados impróprios para a bactéria (ibid; MARTINIS et. al., 1997.).

Com relação à concentração de NaCl, constatou-se a sobrevivência em 10,5% e 13% quando incubada a 37°C por 15 e 10 dias respectivamente. Em concentrações de 20 a 30% de NaCl, o tempo de sobrevivência foi reduzido para cinco dias. Mas, se a temperatura for reduzida para 4°C, a bactéria pode sobreviver por mais de 100 dias em concentrações entre 10,5 e 30,5% de NaCl (UBOLDI EIROA, 1990; FRANCO; LANDGRAF, 1996). Martinis et. al. (1997) relataram que a *L. monocytogenes* é capaz de crescer em meios contendo 10% de NaCl com pH 7,0 a 25°C e em 20% de NaCl a 4°C por oito semanas.

A atividade de água (Aa) ótima para seu crescimento é próxima a 0,97; contudo foi observada sua sobrevivência em alimentos desidratados com Aa inferior a 0,93, levando à suposição de que pelo menos um certo período de tempo seja capaz de tolerar condições de baixa Aa (UBOLDI EIROA, 1990; FRANCO; LANDGRAF, 1996). Varnmam e Evans (1996a) relataram um valor mínimo de Aa de 0,932 com glycol como humectante e 0,942 com sacarose ou NaCl.

Foi constatado que a *L. monocytogenes* é capaz de tolerar concentrações de nitrito de sódio da ordem de 156ppm, máximo permitido nos Estados Unidos da América do Norte. Entretanto, combinando o seu uso com a influência de outros fatores ou agentes inibidores, foi possível controlar o desenvolvimento do

microrganismo (UBOLDI EIROA, 1990; VARNMAM; EVANS, 1996a.). Por esta razão muitos autores consideram a *Listeria* um problema para a indústria de carne, uma vez que sobrevive aos níveis recomendados de nitrato de sódio e de cloreto de sódio (OLIVEIRA, 1993; FRANCO; LANDGRAF, 1996; GERMANO; GERMANO, 2001; LOGUERCIO et al., 2001).

Em relação à composição da atmosfera, o crescimento de *Listeria* é estimulado por baixas concentrações de oxigênio e pela suplementação com dióxido de carbono (VARNMAM; EVANS, 1996a; LOGUERCIO et al., 2001). Segundo Uboldi Eiroa (1990), atmosferas compostas de 85% de nitrogênio, 10% de anidrido carbônico e 5% de oxigênio parecem ser ótimas para o crescimento do microrganismo. Mano (1997), estudando carnes envasadas em atmosferas modificadas, constatou que o patógeno realmente se desenvolvia; porém, o efeito inibidor do dióxido de carbono se potencializava mediante o seu uso em altas concentrações, associado ao armazenamento a temperaturas de refrigeração as mais baixas possíveis.

As bacteriocinas são proteínas bacterianas que normalmente apresentam atividade inibitória para algumas espécies e cepas de bactérias, sendo, por este motivo, utilizadas como agentes antimicrobianos em diversos alimentos. A nisina e pediocina são exemplos de bacteriocinas produzidas por determinadas cepas de *Lactococcus lactis* e *Pediococcus* spp. respectivamente, capazes de inativar a *Listeria* (LOGUERCIO et. al., 2001). Entretanto, Martinis et. al. (1997) constataram capacidade desse microrganismo apresentar uma certa resistência à nisina, comprometendo a eficiência desse preservativo aprovado pela OMS para uso na indústria de alimentos, que dependerá de fatores como pH, concentração de NaCl e temperatura. Por outro lado, Ming et al. (1997) obtiveram resultados satisfatórios em relação à inibição do crescimento da *Listeria* spp., quando fizeram uso de pediocina em carne bovina e de ave frescas, processadas e embaladas com filmes plásticos.

Convém ressaltar a existência de alguns estudos envolvendo bactérias lácticas capazes de produzir uma diminuição no número de células viáveis de *L. monocytogenes*, não só pela redução do pH, como pela produção de bacteriocinas (LOGUERCIO et. al., 2001). Destacam-se também estudos sobre a produção de bacteriocinas apresentando atividade contra *Listeria* spp. por bactérias do gênero *Enterococcus* (GIRAFFA et.al., 1995; AYMERICH et. al. ,1996).

A irradiação de alimentos com doses de 3kGy pode eliminar 99% das bactérias patogênicas, sendo considerada efetiva para o controle de *Listeria* spp. em produtos cárneos, incluindo a carne moída (ROBERTS; WEESE, 1998).

### 2.1.5 VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE

Dentre as espécies de *Listeria*, a *L. monocytogenes* é inquestionavelmente patogênica para o homem. É um microrganismo de distribuição ubiquitária, encontrando-se vastamente disseminado na natureza e em diversos tipos de alimentos, quer seja “in natura” ou processados. Apesar de rara, a listeriose é uma doença alimentar atípica devido à alta gravidade, natureza não entérica, alta mortalidade (20-30%), longo período de incubação, e prevalência particular em indivíduos com imunidade comprometida, idosos, crianças, recém-nascidos, gestantes e seus fetos (PEREIRA; ROCOURT, 1993; LOGUERCIO et al., 2001; INTERLAB, 2002). Segundo Todar (2003), a *L. ivanovii* também é considerada patogênica, entretanto, causadora da doença apenas em animais, principalmente em ovinos.

A *Listeria* spp., após entrar no organismo hospedeiro por via oral, atinge o trato intestinal, aderindo e invadindo a mucosa. Em seguida, a célula bacteriana é fagocitada por macrófagos e após a lise da membrana fagocítica, é liberada no citoplasma da célula do hospedeiro onde se multiplica rapidamente (LOVETT; TWEDT, 1988; FRANCO; LANDGRAF, 1996; GERMANO; GERMANO, 2001).

Os mecanismos pelos quais a *Listeria monocytogenes* causa listeriose ainda não estão bem definidos. Sabe-se, entretanto, que a bactéria produz algumas toxinas, dentre estas se destacam as toxinas hemolíticas (hemolisinas) e as toxinas lipolíticas; responsáveis pelo aumento na produção de monócitos e pela depressão na atividade de linfócitos. Entre as toxinas já isoladas estão incluídas uma toxina hemorrágica, uma fração pirogênica e uma toxina capaz de causar alterações eletrocardiográficas (MARTH, 1988). Os componentes da parede celular parecem estar também envolvidos no mecanismo de patogenicidade (ibid; SCHLECH, 1988).

Schlech (ibid) considera a sorotipagem como o melhor caracterizador da virulência de *Listeria monocytogenes* e de outras espécies de *Listeria*. Entre os sorotipos virulentos, como tem sido demonstrado pelos estudos de patogenicidade

em animais de laboratório, está bem evidenciado que o 1 e o 4 causam a maioria das infecções humanas.

Farber e Peterkin (1991) destacam como fatores de patogenicidade associados à *Listeria monocytogenes*: a capacidade de crescer intracelularmente, os altos índices de compostos de ferro, a catalase e a superoxidase dismutase e a produção de hemolisina.

Benedict e Schultz (1991) também afirmam que a virulência é atribuída à presença de hemolisinas e enzimas oxidativas que permitem a entrada e sobrevivência em macrófagos e células intestinais. Deste modo, estudaram o efeito do nível de ferro e tipo de alimento na produção destas substâncias, concluindo que o alto nível de ferro e a aeração aumentaram o crescimento e induziram a produção de várias catalases.

Para Franco e Landgraf (1996), vários são os fatores de virulência que tentam explicar o mecanismo de patogenicidade, entre eles: listeriolisina O (LLO), que tem como função mediar a lise dos vacúolos que contêm a célula bacteriana; fosfolipases (fosfatidilinositol – fosfolipase C e fosfatidilcolina fosfolipase C), que hidrolisam os lipídeos da membrana causando ruptura da célula; p60 (60 KDa), que é uma proteína associada à capacidade invasiva da bactéria; internalina é uma proteína de membrana (80KDa) também associada ao mecanismo de invasão da célula do hospedeiro.

A virulência pode ser modificada por fatores ambientais: a temperatura do inóculo, o crescimento variável em alimentos, o estado hormonal do hospedeiro, a presença ou a ausência de cátions divalentes como ferro e magnésio e a interferência no trato gastrintestinal (SCHLECH, 1988; FARBER; PETERKIN, 1991).

#### 2.1.6 CARACTERÍSTICAS DA DOENÇA

A listeriose no organismo humano e no animal apresenta um quadro clínico diferente da maioria das outras enfermidades enquadrada como ETA. Isto se deve à natureza intracelular facultativa do seu agente casual, que rompendo as células produz septicemia, o que propicia a infecção de tecidos normalmente não afetados, como cérebro e o sistema nervoso central, a placenta e o útero gravídico. A *Listeria monocytogenes* é a única espécie do gênero patogênica para o Homem (LOVETT;

TWEDT, 1988; MARTH, 1988; CASTRO, 1989; FARBER; PETERKIN, 1991; PEREIRA ; ROCOURT, 1993; FRANCO; LANDGRAF, 1996).

A listeriose humana é comumente caracterizada pela formação de granulomas miliares e necrose focal ou por supuração no tecido infectado (LOGUERCIO et al., 2001). Na ausência de tratamento médico a morte ocorre, sendo usualmente resultado de meningites e tendo a idade avançada, a gravidez, os neonatos e os imunodeprimidos como fatores predisponentes de risco (DEDIOL et al., 2002).

A transmissão da *Listeria* spp. pode ocorrer tanto por contato direto quanto indireto com fontes contaminadas; por via oral, ocular, cutânea, respiratória e urogenital. Pode estar presente em secreções ocular, nasal e purulenta da epiderme e na urina, na placenta de bovino infectado e outros tecidos contaminados, nas fezes e sangue. Porém a transmissão por alimentos parece ser a forma mais importante (BRACKETT, 1988; MARTH, 1988; CASTRO, 1989; GODOY, 1991; LAGE, 1993; SILVA, 1996; MILLER et al., 1997). Os portadores assintomáticos podem eliminar o microrganismo nas fezes por um tempo indeterminado, aumentando o risco de transmissão de pessoa a pessoa (ibid; NASCIMENTO; CULLOR, 1994).

Farber e Peterkin (1991), em um levantamento, observaram que doses entre  $10^2$  e  $10^4$  produziram a doença em cerca de 35 dias, enquanto que dose de  $3,0 \times 10^9$  produziu a doença em 24 horas. Os relatos de surto de listeriose por alimento sugerem que a dose infectante é baixa, porém, dada a impossibilidade de se trabalhar em experimentos com seres humanos, esta permanece indeterminada. Há contudo indícios de que esteja relacionada com a susceptibilidade do hospedeiro. O período de incubação varia de dias a algumas semanas (mais ou menos três a setenta dias) (PEREIRA; ROCOURT, 1993; FRANCO; LANDGRAF, 1996; SILVA, 1996).

Na fase entérica, a sintomatologia é semelhante a da gripe, acompanhada de diarreia e febre moderada. No entanto, em alguns casos esses sintomas são inaparentes (ibid).

A ocorrência de bacteremia em adultos não é rara e os sintomas mais comuns são: febre, fadiga, mal-estar, podendo haver ou não presença de náuseas, vômitos, dores e diarreia (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

A infecção por *L. monocytogenes* pode causar várias formas diferentes de listeriose, sendo divididas em cinco categorias: infecção em gestantes, granulomatose infantisséptica, septicemia, meningite e meningoencefalite e infecção local (BAHK; MARTH, 1990; HOBBS; ROBERTS, 1992; SILVA, 1996). Varnmam e Evans (1996a) descrevem outras formas de listeriose além das citadas anteriormente: a cérico-glandular (linfadenopatia purulenta cervical e submandibular), a cutânea (pústulas nodulares na pele), a oculoglandular (conjuntivite), que pode ser seguida de meningite purulenta, e a granulomatose séptica e pneumônica.

Em mulheres grávidas, a *L. monocytogenes* produz geralmente sintomas de gripe (febre, calafrios, dor de cabeça, dor nas costas), mas pode haver invasão do feto e, dependendo do estágio em que a gravidez se encontra, pode ocorrer aborto, parto prematuro, natimorto, septicemia neonatal ou meningite no recém nascido (SCHLECH, 1988; LAGE, 1993; SILVA, 1996; FRANCO; LANDGRAF, 1996; VARNMAN; EVANS, 1996a).

A granulomatose infantisséptica é a infecção do feto via transplacentária que usualmente resulta em bacteremia. É conhecida como listeriose de recém-nascidos, na qual os sinais clínicos são variados, em geral incluem: dispnéia, falência cardíaca, cianose, regurgitação de líquidos, vômitos, convulsões, choro baixo, expulsão precoce do mecônio, fezes com muco, hiper ou hipotermia (VARNMAN; EVANS, 1996a).

Na listeriose septicêmica o primeiro sinal clínico é a febre e usualmente estão presentes a faringite severa e leucocitose acompanhada de mononucleose. A recuperação completa do quadro clínico é freqüente, entretanto, algumas vezes pode evoluir para meningite (ibid.).

A listeriose do tipo meningite e meningoencefalite é mais comum em recém-nascidos e idosos, sendo o curso desta patologia fulminante e com alta taxa de mortalidade. Em recém-nascidos e crianças os sintomas são de um processo infeccioso agudo, no qual ocorrem respiração com baixa amplitude e alta freqüência, leve cianose, letargia, febre, anorexia e às vezes crises convulsivas. Em adultos, começa como uma gripe seguida de dor de cabeça, dores nas pernas, calafrios, febre baixa, rigidez na nuca, náuseas, vômito, fotofobia, convulsões intermitentes, podendo evoluir para o coma (ibid.).

Nos casos de comprometimento do SNC, a manifestação dá-se através do aparecimento de meningite, encefalite e de abscessos. Entre outras formas localizadas de listeriose, podem ser citadas a endocardite e osteomielite, porém são mais raras (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Varnman e Evans (1996a) descrevem como infecções locais a artrite, peritonite, abscessos cerebrais ou espinhais e colecistite.

A ingestão de alimentos contaminados com *Listeria* é particularmente perigosa para gestantes, recém-nascidos, indivíduos com síndrome de imunodeficiência adquirida, carcinomas e outras doenças ou medicamentos que provoquem comprometimento do sistema imunológico (SCHLECH, 1988; CASTRO, 1989; GODOY, 1991; HOBBS; ROBERTS, 1992; LAGE, 1993; BAIRD-PARKER, 1994; FRANCO; LANDGRAF, 1996; SILVA, 1996; VARNMAN; EVANS, 1996a).

No tratamento da enfermidade recomenda-se a associação de ampicilina-gentamicina ou ampicilina- t-sulfametoxazole (CRESPO et al., 2003).

## **2.2 *Escherichia coli***

### 2.2.1 TAXONOMIA E CARACTERÍSTICAS DO MICRORGANISMO

A *Escherichia coli* é um microrganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, constituindo parte da microbiota normal do trato intestinal de humanos e de uma de variedade de animais. Dentre suas principais características, destacam-se: bacilos Gram-negativos, não esporulados, capazes de fermentar glicose com produção de ácido e gás; a maioria também fermenta a lactose. Apresentam antígenos somáticos O, relacionados com polissacarídeos da membrana externa; antígenos flagelares H, relacionados com proteínas de flagelos, e ainda, antígenos K, relacionados com polissacarídeos capsulares (FRANCO; LANDGRAF, 1996; MENG et al., 2001).

Esta espécie compreende grupos e tipos sorológicos, identificados por meio de anti-soros preparados contra as três variedades de antígenos que ocorrem na espécie, ou seja, antígenos O, K e H. O antígeno O identifica o sorogrupo da cepa e a combinação do antígeno O e H identifica o sorotipo. Entretanto nem todas as amostras apresentam os três tipos ao mesmo tempo (TRABULSI; TOLEDO, 1989a; MENG et al., 2001).

Elevadas temperaturas e o lauril sulfato de sódio utilizado no caldo para a estimativa do número mais provável (NMP) podem causar a perda de plasmídios que são fatores associados à virulência da *E. coli*. Como consequência, não há um determinado método eficaz para detectar todas as cepas patogênicas de *E. coli*; mas sim métodos adaptados ou desenvolvidos para um grupo específico de *E. coli* patogênica. Por isso, a importância de primeiramente se identificar bioquimicamente as cepas isoladas antes de se realizar a sorologia e a verificação dos fatores de virulência (MENG et.al., 2001).

Com base nos fatores de virulência, manifestações clínicas, epidemiologia e sorotipagem, as linhagens de *E. coli* consideradas patogênicas são agrupadas em classes: EPEC (*E. coli* enteropatogênica clássica), EIEC (*E. coli* enteroinvasora), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EHEC (*E. coli* entero – hemorrágica), EaggEC ou EAEC (*E. coli* enteroagregativa) e DAEC (*E. coli* difusivamente aderente) (BUCHANAN; DOYLE, 1997; ibid.).

EPEC é um importante microrganismo causador de gastroenterite em crianças e possui um número restrito de sorotipos pertencentes aos sorogrupos: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128ab, O142 e O158 (HOBBS; ROBERTS, 1992; FRANCO; LANDGRAF, 1996). Entretanto, de acordo com Levine<sup>5</sup> (1987; apud MIOKO; FRANCO, 1991), os sorogrupos de *E. coli* que incluem sorotipos de EPEC são O18, O26, O44, O55, O86, O111, O112, O114, O119, O125, O126, O127, O128ab e O142.

As cepas de EIEC não possuem flagelos, fermentam ou não tardiamente a lactose, são capazes de penetrar em células epiteliais e causar manifestações clínicas semelhantes às infecções causadas por *Shigella*; pertencem a um número limitado de sorogrupos: O21, O28ac, O29, O112c, O124, O136, O143, O144, O152, O164, O167 e O173 (HOBBS; ROBERTS, 1992; FRANCO; LANDGRAF, 1996).

ETEC são as cepas capazes de aderir à mucosa do intestino delgado através de fímbrias (tipo um pili e antígeno de colonização) e produzir enterotoxinas. Atualmente são conhecidas as toxinas termolábeis (LT), com dois tipos imunológicos e geneticamente distintos (LT-I e LT-II), e as toxinas termoestáveis (ST), que também apresentam duas variantes (ST-I e ST-II) (MIOKO; FRANCO, 1991; HOBBS; ROBERTS, 1992; FRANCO; LANDGRAF, 1996; MENG et al., 2001).

---

<sup>5</sup> LEVINE, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea; enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* Chicago, 155:377-389, 1987.

A designação de EHEC foi inicialmente empregada para as cepas pertencentes ao sorotipo O157:H7, porém mais recentemente foi incluído o sorotipo O26:H11; têm a capacidade de produzir citotoxinas denominadas “shiga-like toxins” (SLT) ou verotoxinas (VT) (ibid.). Além desses, Michanie (2003) cita outros sorotipos isolados em vários países: O111:H8, O103:H2, O113:H 21 e O104:H21.

As cepas de *E. coli* O157:H7 diferem das demais cepas pela não fermentação do sorbitol e a não produção da enzima beta-glicuronidase (SILVA et al., 1997; MENG et al ,2001). Temperaturas elevadas de incubação aplicadas na confirmação de coliformes fecais ou procedimentos de enriquecimento podem inibir o crescimento deste patógeno (MENG et al., 2001).

A partir da *E. coli* O157:H7 foram identificadas duas verotoxinas: a VT1 ou toxina de Shiga, por ser estrutural e imunologicamente semelhante à produzida pela *Shigella* spp., com duas subunidades A e B, ambas neutralizadas pela toxina anti-shiga; e a VT2, também com duas subunidades A e B , porém nenhuma das duas neutralizadas pela toxina anti-shiga (SILVA et al., 1997; GERMANO; GERMANO,2001; MENG et al ,2001).

Existem poucos dados disponíveis em relação a EAEC; sua ocorrência em surtos alimentares ainda não foi relatada, entretanto, parecem estar associadas com casos crônicos de diarreia (HOBBS; ROBERTS, 1992; FRANCO; LANDGRAF, 1996). Meng et al. (2001) definem como cepas de *E. coli* que não secretam enterotoxina LT ou ST e que aderem às células Hep-2 agregativamente; são responsáveis pela diarreia persistente, particularmente em crianças.

A DAEC está associada com diarreia em crianças e é definida pela característica padrão de aderência difusa em células Hep-2 ou HeLa. De acordo com Meng et al. (ibid.), não há relatos de surtos com alimentos.

De um modo geral a ocorrência em alimentos de coliformes a 35°C, antigamente denominados coliformes totais, indica condições higiênicas precárias e a de coliformes a 45°C, anteriormente denominados coliformes fecais, é considerada como indicadora de contaminação fecal e da possibilidade da presença de bactérias patogênicas que têm seu habitat no trato intestinal (LEITE et al., 1988; FLORENTINO et al., 1997; COSTA et al., 2000).

### 2.2.2 EPIDEMIOLOGIA

A principal via de transmissão da *E. coli* é representada pelo consumo de alimentos contaminados, direta ou indiretamente, através de fezes bovinas. Entre outras fontes de infecções conhecidas, destacam-se a carne, o leite cru, as saladas contaminadas com fezes de animais usadas como adubo e a transmissão pessoa a pessoa presumivelmente através da via oral-fecal devido a hábitos de higiene inadequados (BRASIL, 2002).

Atualmente, em países desenvolvidos, EPEC é isolada em surtos esporádicos e com frequência muito baixa em casos de diarreia endêmica. Entretanto, em países subdesenvolvidos (destacando os da América Latina e África), principalmente em zonas tropicais, EPEC está entre os principais agentes enteropatogênicos, em especial na diarreia dos recém-nascidos e lactentes, com índices de mortalidade altos (MIOKO; FRANCO, 1991; FRANCO; LANDGRAF, 1996).

No Brasil, EPEC é responsável por cerca de 30% dos casos de diarreia aguda em crianças pobres com idade inferior a seis meses, com predominância dos sorotipos O111: [H], O111[H2], O119:H6 e O55:H6. Nos anos 60-70, diversos surtos causados pelo consumo de água e/ou alimentos contaminados com EPEC foram registrados em diversas partes do mundo, envolvendo principalmente os sorogrupos O86 e O111 (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Em 1995, dois surtos na França foram associados à salada de maionese com lagostim, alface e pepino em conserva, totalizando 59 casos dos quais EPEC O111 foi isolada dos pacientes (MENG et al., 2001).

A EIEC acomete mais comumente adultos e alguns estudos apontam surtos relacionados à ingestão de alimentos e/ou água contaminados. Entretanto, acredita-se que a via de transmissão mais comum seja o contato interpessoal (TRABULSI; TOLEDO, 1989a; FRANCO; LANDGRAF, 1996; MENG et al., 2001). O maior surto ocorrido nos Estados Unidos em 1973 foi devido ao consumo de queijo importado da França. Um grande surto também foi relatado no Japão em 1988, com 670 casos relatados, em que a febre alta e a diarreia aquosa eram características da infecção (MENG et al., 2001).

As bactérias do grupo ETEC são importantes causas de diarreia em países subdesenvolvidos, onde as condições de saneamento são precárias, principalmente nos trópicos. Além disso, ETEC é considerada um dos principais agentes etiológicos

da chamada “diarréia dos viajantes”, acometendo indivíduos que se locomovem de áreas desenvolvidas para regiões com problemas de saneamento básico. A doença atinge pessoas de todas as faixas etárias (TRABULSI; TOLEDO, 1989a; FRANCO; LANDGRAF, 1996; MENG et al., 2001).

Alimentos e água contaminados são os mais freqüentes veículos da infecção por ETEC, documentada pela primeira vez em 1970. Em 1994, ETEC O153:H43 foi identificada como causa de dois surtos alimentares em Wisconsin e Louisiana, envolvendo batatas e pão de milho respectivamente. Em junho de 1998, uma salada de batatas contaminada com cepas de ETEC foi identificada como o veículo do grande surto nos Estados Unidos, envolvendo mais de 4.500 pessoas. No Japão um grande surto afetou mais de 800 estudantes de quatro escolas elementares em 1996, no qual *E. coli* O25:NM foi isolada (MENG, et. al., 2001).

O bovino é considerado reservatório natural de EHEC, razão pela qual os alimentos de origem animal, principalmente a carne bovina, parecem ser o principal veículo deste patógeno. Diversos surtos de colite hemorrágica ocorridos nos Estados Unidos, Canadá, Japão, Inglaterra e Alemanha foram associados ao consumo de carne bovina, em especial ao hambúrguer (TRABULSI, 1999; SCARCELLI; PIATTI, 2002). No Brasil ainda não houve registro de surtos epidemiológicos e o número de crianças com infecções endêmicas por EHEC relatado tem sido muito baixo (FRANCO; LANDGRAF, 1996; TRABULSI, 1999.). Entretanto, estudos realizados no Rio de Janeiro demonstraram que mais de 80% do rebanho bovino brasileiro é portador de EHEC (TRABULSI, 1999).

O sorotipo O157:H7 é o mais implicado como agente etiológico de colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica e púrpura trombótica (CDC, 1995). Este foi primeiramente reconhecido como patógeno humano em 1982 quando dois surtos de colite hemorrágica foram associados ao consumo de carne moída mal cozida, que estava contaminada com este microrganismo. Os maiores surtos incluem o ocorrido em 1992/1993 no oeste dos Estados Unidos, que envolveu mais de 700 indivíduos, evoluindo para quatro mortes; e um severo, no Japão, em 1996 onde mais de 9.000 casos foram reportados. De acordo com estimativas do CDC (Center of Disease Control) a *E. coli* O157:H7 causa aproximadamente 73.400 casos de infecção, com 60 associados à morte, anualmente, nos Estados Unidos (SCARCELLI; PIATTI, 2002; SCHROEDER et al., 2002). Os maiores reservatórios são os bovinos e outros ruminantes, embora tenha sido isolado de outros animais

como caninos, felinos, eqüinos e aves. Relatos de transmissão de pessoa a pessoa e pela água vêm sendo acrescentado à literatura (HEUVELINK et al., 1996; MENG et al., 2001; SCARCELLI; PIATTI, 2002).

Michanie (2003) adverte para outros sorogrupos enterohemorrágicos que vêm sendo isolados em vários países como: O26:H11, O111:H8, O103:H2, O113:H21 e O104:H21.

A ocorrência de cepas EaggEC foi reportada pela primeira vez em 1980, no Chile, como causa de diarréia entre crianças. Em 1994, foram relatados, no Reino Unido, quatro surtos de infecção associados ao consumo de refeição em um restaurante, afetando 133 pacientes. Os sintomas incluíam vômito e diarréia, sendo mais persistente em um número menor de pacientes (HEUVELINK et al., 1996; MENG et al., 2001.).

Em relação a DAEC não foram relatados surtos associados a alimentos (ibid).

### 2.2.3 OCORRÊNCIA DE DIFERENTES SOROVARES DE *E. coli* EM ALIMENTOS

As cepas de ETEC, EIEC e EPEC, quando isoladas de alimentos, são provenientes da contaminação fecal veiculada diretamente das mãos dos manipuladores de alimentos ou indiretamente da água (DESMARCHELIER; GRAU, 1997). A água contaminada com despejos de esgoto é uma das mais importantes vias de transmissão do agente na natureza (GERMANO; GERMANO, 2001).

Na maioria dos surtos descritos, a transmissão foi veiculada através de alimentos de origem bovina, tendo sido a carne moída crua ou mal passada, implicada em quase todos os surtos documentados e mesmo em casos esporádicos (GERMANO; GERMANO, 2001; BRASIL, 2002; PATOLOGIA, 2003). Leite et al. (1988) analisaram 50 amostras de alimentos, entre elas 11 de carne bovina, adquiridas em nove estabelecimentos comerciais da cidade de Araraquara-SP e observaram alta freqüência de coliformes, apesar de não identificarem nenhuma *E. coli* enteropatogênica clássica ou enteroinvasora.

Cerqueira et al. (1997) afirmaram que produtos de origem animal, especialmente produtos cárneos, eram importantes veículos nas infecções por *E. coli*. Essa afirmação foi baseada na análise de 105 amostras de carne moída bovina crua, incluindo 35 porções de carne moída refrigerada, 35 de hambúrguer congelado e 35 de kibe congelado; nas quais *E. coli* patogênica foi isolada de 34 amostras de

carne (32,4%), sendo 14 amostras de carne moída. Costa et al. (2000) também isolaram *E. coli* de 30 amostras de carne bovina moída comercializada nos principais mercados, feiras e açougues da cidade de São Luis.

Bryan (1986) atribuiu à presença de *E. coli* nas fezes animais a causa da contaminação das carcaças e carnes de um abatedouro. Este motivo justificou o isolamento desse microrganismo em carne moída, salsicha, carne de frango, hambúrguer e quibes. Entretanto, sabe-se que apenas uma parte de *E. coli* isolada de alimentos é considerada patogênica (ibid.).

Segundo diversos estudos de avaliação microbiológica da carne bovina “in natura” e moída comercializadas em diferentes locais do Brasil, todos os resultados foram significativos para enumeração de coliformes a 35°C e a 45°C (NMP). Motta et al. (2000) examinaram amostras de carne moída comercializada em supermercados localizados na região oeste de São Paulo, e nos resultados obtidos a contagem de coliformes a 35°C em 53,3% das amostras foi superior a  $10^4$  NMP/g e 46,7% foram positivas para coliformes a 45°C. Ritter et al. (2001) efetuaram a análise em amostras de carne moída bovina comercializada em bancas do mercado público de Porto Alegre e encontraram um número elevado ( $>110,0$  UFC/g) para ambos grupos de coliformes. Oliveira et al. (2002) avaliaram a contaminação das carnes frescas bovinas e suínas em 20 açougues da cidade de Alfenas-MG, sendo que 92% das amostras apresentavam coliformes a 35°C e 52% coliformes a 45°C. Ferreira e Sobrinho (2003) realizaram a avaliação da qualidade bacteriológica da carne bovina moída comercializada em supermercados, feiras e frigoríficos de São Luís, onde, das 12 amostras analisadas, 83,3% estavam contaminadas com coliformes a 35°C e 16,66% com coliformes a 45°C. Pigatto e Barros (2003) avaliaram o grau de contaminação da carne bovina moída comercializada na região de Curitiba em 60 amostras oriundas de três açougues escolhidos aleatoriamente e verificaram que a contagem para coliformes foi muito elevada, pois 86,6% (52/60) das amostras tiveram contagens superiores a  $10^5$ UFC/g.

Petri et al. (1989a; 1989b), analisando 100 amostras de carne moída de segunda qualidade, isolaram cepas de *E. coli* em 97 dessas amostras, sendo mais freqüente as linhagens de EPEC, porém sem capacidade toxigênica. De acordo com esses autores, em trabalhos realizados no Brasil e nos Estados Unidos foi demonstrada que a incidência de ETEC em alimentos de origem animal,

principalmente os que sofrem algum tipo de processamento, era de 5% a 10%, predominando as cepas de *E. coli* produtoras de enterotoxina LT.

Mioko e Franco (1991) elaboraram um trabalho similar no qual verificaram a frequência de EPEC e ETEC entre as 339 cepas de *E. coli* isoladas de alimentos de origem animal. Dentre os alimentos analisados 34 constituíam amostras de carne crua, sendo 13 de carne bovina, da qual foram isoladas quatro cepas de EPEC (1 cepa do sorotipo O125:H11).

Segundo estudos realizados em diversos países, a incidência de ETEC em alimentos não associada a surtos é bastante variável (PETRI et al., 1989b; MIOKO; FRANCO, 1991).

Os produtos lácteos, especialmente o leite cru, também têm sido associados a surtos de toxinfecções (GERMANO; GERMANO, 2001; PATOLOGIA, 2003). A contaminação ocorre através do úbere das vacas ou dos equipamentos de ordenha em contato com conteúdo fecal (PATOLOGIA, 2003).

Surtos envolvendo a água são associados à presença de EPEC, ETEC e EIEC, provavelmente pela contaminação com material de esgoto (VARNMAN; EVANS, 1996b; DESMARCHELIER; GRAU, 1997). Os autores citados anteriormente também reportam surtos de EIEC e ETEC envolvendo o consumo de queijos.

Segundo Desmarchelier e Grau (1997), EIEC já foi isolada de salmão e salada de batatas; e ETEC de carne de caranguejo, carne curada de peru, maionese e saladas. Varnman e Evans (1996b) relataram surtos envolvendo carne suína, torta de carne, manteiga, iogurte e outros produtos cárneos e lácteos.

De acordo com Desmarchelier e Grau (1997), os produtos implicados em surtos com *E. coli* O157 são produtos cárneos, vegetais (melão, melancia, alface e cenoura), saladas, suco de maçã e água.

Varnman e Evans (1996b) associaram às infecções por *E. coli* O157 ao consumo de leite cru, hambúrguer, carne moída, carne de peru, de suíno, aves e cordeiro. Em todos os casos envolvendo produtos cárneos, estes não sofreram o cozimento adequado.

Trabulsi (1999) enfatizou que, apesar de muitos surtos estarem associados ao consumo de carne moída mal cozida, outros alimentos já foram relatados, como: rosbife, leite cru e pasteurizado, iogurte, suco de maçã, salame, alface, melão, batatas, broto de rabanete e broto de alfafa.

É notável que determinados alimentos, como salame, maionese, a cidra e o suco de maçã, que são considerados seguros e prontos para o consumo devido à elevada acidez, podem ser veículo desse patógeno (CDC, 1995; BUCHANAN; DOYLE, 1997).

#### 2.2.4 FATORES INTERFERENTES NA SOBREVIVÊNCIA E NO CRESCIMENTO

Semelhante a todas as bactérias, o crescimento e a sobrevivência da *Escherichia coli* em alimentos dependem da interação de vários fatores intrínsecos e extrínsecos, como, por exemplo: temperatura, pH, atividade de água (Aa), cloreto de sódio, dentre outros.

Em relação à temperatura, o padrão geral de *E. coli* situa-se na faixa de 7 a 48°C, com o ótimo de temperatura a 37°C; com exceções que das cepas patogênicas. Algumas cepas enteropatogênicas crescem em baixas temperaturas (4-5°C) e inúmeras são incapazes de crescer a 44°C, temperatura usada rotineiramente no isolamento de *E. coli* (VARNMAM; EVANS, 1996b).

Segundo Desmarchelier e Grau (1997), a temperatura mínima em que *E. coli* é capaz de se desenvolver é 7-8°C e a máxima é próximo a 46°C. É sensível ao aquecimento, contudo essa sensibilidade é dependente de fatores como composição do alimento, pH e atividade de água (Aa). Germano e Germano (2001) relatam que, por não apresentar termoresistência, é destruída a 60°C em poucos segundos. Entretanto, é capaz de resistir por longo tempo em temperaturas de refrigeração (ibid.).

A atividade de água mínima para o crescimento do microrganismo é 0,95 (VARNMAM; EVANS, 1996b; DESMARCHELIER; GRAU, 1997; GERMANO; GERMANO, 2001).

Em meios convencionais de cultivo a *E. coli* cresce numa faixa de pH entre 4,4 e 10,0, com o nível ótimo em pH 6,0-7,0 (DESMARCHELIER; GRAU, 1997). Para Buchanan e Doyle (1997), a faixa ótima de pH está entre 5,5-7,5, com o mínimo entre 4,0-4,5. Entretanto, o pH é dependente da interação com outros parâmetros de crescimento, como temperatura e atividade de água com a natureza do acidulante (VARNMAM; EVANS, 1996b; BUCHANAN; DOYLE, 1997).

A *E. coli* O157:H7 é resistente às diversas situações, tendo como temperatura ótima de crescimento 37°C, mínima de 8°C e máxima de 45°C, podendo sobreviver até nove meses a -20°C em carne moída. Seu pH ótimo é 7,5, entretanto sobrevive por longos períodos em alimentos fermentados ou ácidos. Pode se desenvolver em concentrações de 6,5% NaCl (SILVA et al., 1997; MENG et al., 2001; GERMANO; GERMANO, 2001). Essa cepa não se desenvolve bem quando submetida à temperatura entre 42-45°C e às altas concentrações de sais biliares (DESMARCHELIER; GRAU, 1997).

Particularmente este microrganismo tolera condições de acidez baixas, o que permite atravessar a acidez do estômago sem ser afetado (MICHANIE, 2003). Essa característica de resistência a pH extremo foi confirmada experimentalmente por Miller e Kaspar (1994), ao isolarem O157:H7 em cidra de maçã, armazenada a 4°C, durante 14 a 21 dias, apesar da presença de preservativos e da acidez da própria cidra.

Quanto à irradiação, a sensibilidade de *E. coli* é semelhante a de outros patógenos, sendo a dose de 3kGy proposta para controlar este microrganismo (ROBERTS; WEESE, 1998).

### 2.2.5 VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE

Em relação aos grupos de *E. coli* patogênicos, existem particularidades quanto à virulência. A virulência das cepas EPEC está associada à capacidade de adesão e destruição das células da mucosa intestinal, mediada por um plasmídeo (*eaf*) que promove um tipo de adesão localizada, a qual é característica, uma vez que outras cepas de *E. coli* promovem adesão difusa ao enterócito. Tem sido demonstrado que esse patógeno induz profundas alterações no citoesqueleto das células epiteliais, como destruição das microvilosidades e acúmulo de actina no local da adesão, denominado efeito “*attachment and effacement*”, causado pela proteína intimina mediada pelo gene cromossômico *eae* (“*Escherichia coli* attaching and effacing”) (TRABULSI; TOLEDO, 1989a; FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Segundo os autores citados acima, a EIEC inicia o processo de invasão com a internalização (endocitose) do enterócito, rompendo a célula, multiplicando-se e invadindo as células vizinhas. No local da invasão ocorre um acúmulo de actina que

acarreta no desarranjo da estrutura celular, determinando a morte da célula. Proteínas denominadas IPA mediadas por plasmídios “invasion” (*inv*) estão diretamente relacionadas com esse processo.

A adesão e colonização da mucosa intestinal pelas cepas ETEC são mediadas por fatores de colonização denominados fímbrias, que parecem ser espécies específicas e são codificadas por plasmídios. Podem produzir enterotoxina termolábil (LT; variantes LT-I e LT-II) e/ou uma enterotoxina termoestável (ST; variantes ST-I e ST-II), além do fator de colonização (CFA) (ibid; MIOKO; FRANCO, 1991; MENG et al., 2001). As toxinas LT-I e LT-II são constituídas por uma subunidade A envolta por cinco subunidades B. As subunidades B têm a função de fixação à mucosa do intestino, através de receptores monosialogangliosídicos presentes na membrana externa dos enterócitos. Após a fixação, a subunidade A é internalizada pelo enterócito e estimula a adenilciclase, provocando um acúmulo de AMPcíclico intracelular; promovendo uma hipersecreção de água e eletrólitos que resulta em diarreia aquosa. A toxina ST-I tem ação sobre a guanilciclase, que acarreta um acúmulo intracelular de GMPcíclico, provocando aumento da secreção de cloreto e diminuição de absorção de sódio (MIOKO; FRANCO, 1991; FRANCO; LANDGRAF, 1996).

As cepas EHEC possuem o mecanismo de patogenicidade relacionado com a produção de citotoxinas denominadas verotoxinas (VT), uma vez que sua atividade biológica pode ser observada em culturas de células Vero, originárias de rim de macaco. Também conhecidas como toxinas *shiga-like* (SLT), já que são semelhantes à toxina produzida pelo bacilo de Shiga, causador da disenteria bacilar, possuem as variantes VT-I (SLT-I) e VT-II (SLT-II), formadas por duas subunidades, sendo uma delas responsável pela ligação com a fração 60S dos ribossomas dos enterócitos, inibindo a síntese protéica, resultando em colite hemorrágica. A produção dessas citotoxinas é mediada por fagos específicos. Outros fatores de virulência incluem o gene *eae* e enterohemolisina mediada pelo plasmídeo 60-mDal (FRANCO; LANDGRAF, 1996; MENG et al., 2001).

A EaggEC é a mais recente linhagem patogênica descrita. A patogenicidade parece estar relacionada com adesão à mucosa intestinal, principalmente do cólon, mediada por fímbrias chamadas BFP (“*bundle forming pilus*”), que são diferentes das outras fímbrias de adesão. Alguns autores relatam que as cepas são capazes de produzir toxinas e que interferem no metabolismo celular do enterócito com ação na

absorção de sais e eletrólitos (TRABULSI; TOLEDO, 1989a; FRANCO; LANDGRAF, 1996).

A patogenicidade da DAEC foi pouco estudada, entretanto sabe-se que geralmente não elaboram toxinas (MENG et al., 2001)

A *E. coli* patogênica pode ser diferenciada das variedades não patogênicas através de testes imunológicos e de outros métodos, incluindo a sorotipagem essencial para os estudos epidemiológicos.

#### 2.2.6 CARACTERÍSTICAS DA DOENÇA

O período de incubação das gastroenterites por *E. coli* é de 12 horas a três dias. Os sintomas consistem principalmente em diarreia, algumas vezes com presença de sangue e muco nas fezes (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

A diarreia provocada por EPEC é clinicamente mais grave do que àquelas provocadas por outros patógenos e geralmente acompanhada de dores abdominais, vômito e febre. A duração da doença varia de seis horas a três dias com período de incubação variando entre 17 e 72 horas. As cepas de EPEC são agentes causais da diarreia infantil de lactentes e recém-nascidos, entretanto, alguns autores sugerem que possam causar distúrbios gastrointestinais também em adultos (PETRI et al., 1989a; *ibid.*).

Franco e Landgraf (1996) ressaltam que a gastroenterite provocada por EIEC é bastante semelhante àquela provocada por *Shigella*, em que os sintomas são: disenteria, cólicas abdominais, febre e mal-estar geral, com eliminação de sangue e muco nas fezes; variando o período de incubação entre oito e 24 horas. Apesar de se assemelhar bioquímica e antigenicamente à *Shigella*, sua dose infectante é alta, em torno de  $10^6$  a  $10^8$  células, enquanto que para *Shigella* é de  $10^3$  (*ibid.*; MENG et al., 2001).

A doença provocada por ETEC caracteriza-se pela diarreia aquosa, normalmente acompanhada de febre baixa, dores abdominais e náuseas; porém, em sua forma mais severa, ocorrem fezes aquosas bem característica (água de arroz) que levam à desidratação. O período de incubação varia de oito a 44 horas e a dose infectante é alta ( $10^6$  a  $10^8$  células) (*ibid.*; PETRI et al., 1989b).

A EHEC é a causadora da colite hemorrágica, caracterizada clinicamente por dores abdominais severas e diarreia aguda, sanguinolenta, diferindo das demais

pela grande quantidade de sangue nas fezes e pela febre não elevada ou até mesmo inexistente. O período de incubação varia de três a nove dias (média de quatro) e a duração da doença de dois a nove dias. A enterocolite pode evoluir para uma doença grave, denominada síndrome urêmica hemolítica (SUH), com destruição dos eritrócitos e falência aguda dos rins, podendo ser fatal (FRANCO; LANDGRAF, 1996; MENG et al., 2001). A infecção por *E. coli* O157:H7 também pode desencadear um quadro de Púrpura Trombocitopênica Trombótica (PTT), caracterizada por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, manifestações neurológicas, insuficiência renal e febre (MENG et al., 2001; SCARCELLI; PIATTI, 2002; PATOLOGIA, 2003).

Já as cepas EaggEC parecem estar associadas com casos crônicos de diarreia (diarreia protraída). A diarreia persiste pelo menos por 14 dias e a presença de sangue ocorre em 11% dos casos (FRANCO, LANDGRAF, 1996; MENG et al., 2001).

As EPEC, EIEC, ETEC e EHEC raramente causam infecções extra-intestinais. Estas infecções são causadas por amostras de *E. coli* dos sorogrupos que participam da microbiota normal dos intestinos, mas que podem se localizar em qualquer órgão ou tecido. Entretanto as infecções mais freqüentes são: infecções urinárias ascendentes, meningite do recém-nascido e bacteremia (TRABULSI; TOLEDO, 1989).

Na maioria das vezes é dispensável a antibioticoterapia na terapêutica das infecções por *Escherichia coli*. No tratamento das infecções causadas por *E. coli* O157 há controvérsias em relação ao uso de antimicrobianos, devido a potencial lesão da parede bacteriana, liberando a shiga toxina e acarretando conseqüentemente a SUH (SCHROEDER et. al, 2002).

### **2.3 MEDIDAS DE CONTROLE**

Pigatto e Barros (2003) relatam em seu trabalho que, segundo a FAO (Food Agriculture Organization), um quinto da população mundial alimenta-se de carne, justificando a preocupação de proporcionar às pessoas um alimento mais saudável. Todavia, o produto cárneo, mesmo que obtido de animais sadios, pode ser contaminado ao abate, no processamento e na comercialização pela manipulação e

armazenamento inadequados e, conseqüentemente, chegar à mesa do consumidor um alimento de risco.

Entretanto, a contaminação das carcaças pode ser reduzida adotando-se medidas eficazes de limpeza e desinfecção do local de abate e cuidados higiênicos durante o procedimento (RITTER et al., 2001).

Considera-se de suma importância o controle específico da carne em sua origem e nos procedimentos de desossa no sentido de que se possa, senão eliminar o microrganismo, reduzi-lo em sua grande expressão (PICCHI et al., 2003).

Scarcelli e Piatti (2002) advertem para a importância da rastreabilidade dos alimentos em todas as fases de produção, industrialização, transporte, distribuição, armazenamento e comercialização, possibilitando ao consumidor obter uma perfeita correlação entre o produto final e a sua origem, permitindo a aquisição de um produto seguro e saudável.

Ferreira e Sobrinho (2003), ao encontrarem um alto índice de coliformes em suas análises, atribuíram a causa às condições higiênicas insatisfatórias, como, por exemplo: contaminação no manuseio, limpeza e sanitizações deficientes de equipamentos e utensílios e falta de refrigeração do produto. Com o resultado obtido, esses autores advertiram para a necessidade do controle desses pontos que provavelmente acarretaram a contaminação.

Convém ressaltar a extrema importância da higiene dos funcionários envolvidos na manipulação dos alimentos. Estes não devem possuir lesões e nem serem portadores de doenças gastrointestinais; sendo importante que sejam submetidos a treinamentos adequados e a trabalhos de conscientização por profissionais aptos e com conhecimento em higiene e sanidade de alimentos (GERMANO et. al., 2000; RITTER et al., 2001.).

Em relação à sanitização, Sallam e Donnelly (1992) consideraram os compostos quaternários de amônio como os mais efetivos, advertindo quanto ao uso em concentração correta e tempo de exposição adequado.

Estratégias preventivas são obrigatórias para redução dos focos ou eliminação da presença de microrganismos, particularmente para alimentos crus que podem não ser completamente cozidos durante o consumo (ex: carne moída) ou alimentos prontos para comer, mas que não receberam tratamento definitivo adequado e seguro (BUCHANAN; DOYLE, 1997; CDC, 2003; FSIS, 2003a).

De um modo geral, com a finalidade de prevenir infecções de origem alimentar, seja por *Listeria* spp. ou por *Escherichia* spp., é necessário que haja controle do local de processamento do alimento. É imprescindível a adoção de algumas medidas para minimizar as chances de contaminação, como: diminuição da contaminação de matérias-primas; limpeza e sanificação dos equipamentos; controle de pragas, insetos e roedores; controle de portadores assintomáticos; evitar o contato do produto final com a matéria-prima, prevenindo assim a contaminação cruzada; manutenção de matérias-primas estocadas adequadamente; manter acima de 50°C os produtos prontos para servir; contratação de equipe de controle de qualidade para monitorar o processamento, o ambiente e o pessoal; emprego do método de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (FRANCO; LANDGRAF, 1996; GERMANO; GERMANO, 2001; LOGUERCIO et al, 2001). Durante a aplicação do programa APPCC, além do monitoramento visual para o controle de limpeza e higiene de equipamentos, são realizadas também análises microbiológicas com o intuito de rastrear possíveis fontes de contaminação que, uma vez localizadas, devem ser imediatamente removidas (SILVA; TIBANA, 1995). São relevantes as campanhas educativas que esclarecem aos consumidores sobre os riscos de adquirir alimentos de origem incerta, destacando a importância da qualidade da matéria-prima, do cozimento adequado de qualquer POA, da higiene das instalações e utensílios, e de métodos de conservação de alimentos. Desta forma, é garantida a qualidade do produto, a segurança ao consumidor e aos próprios manipuladores de alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 1996; GERMANO; GERMANO, 2001; LOGUERCIO; et al, 2001; SCARCELLI; PIATTI, 2002).

## **2.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS**

As bactérias podem ser classificadas em sensíveis e resistentes aos antimicrobianos; sendo consideradas resistentes as que crescem “in vitro” nas concentrações médias que os antimicrobianos atingem no sangue, quando administrados por via oral, e sensíveis as que não crescem nestas concentrações (TRABULSI; TOLEDO, 1989b). A concentração inibitória dos antimicrobianos pode ser determinada direta ou indiretamente. A determinação direta é feita pelos chamados métodos de diluição e a indireta pelo método do disco (método de Bauer

e Kirby). A capacidade de adquirir resistência, bem como o grau adquirido, são propriedades variáveis entre as bactérias (ibid.).

A água e os alimentos estão entre os principais veículos de disseminação dos microrganismos emergentes e o uso indiscriminado de antibióticos, particularmente nos alimentos de origem animal, tem favorecido a seleção de linhagens cada vez mais resistentes e, portanto, de difícil tratamento médico (MARTINS et al., 2003).

O uso excessivo de antibióticos no tratamento de animais doentes e/ou como medida profilática em animais produtores de alimentos e promotores de crescimento vem acelerando a emergência da resistência bacteriana a antimicrobianos. Tal prática é muito comum, o que favorece a presença de resíduos de antibióticos nos alimentos e conseqüentemente a seleção de bactérias resistentes, que podem ser transferidas aos humanos comprometendo uma possível antibioticoterapia (ibid.; MENG et al., 1998).

A maioria dos microrganismos resistentes às drogas surge como resultado das alterações genéticas determinadas por mutações cromossômicas ou por aquisição de plasmídios e subseqüentes processos de seleção pelos agentes antimicrobianos (TRABULSI; TOLEDO, 1989b).

Franco (2002) analisando a resistência de cepas de *E. coli*, isoladas em carne de suíno, frente a determinados antibióticos e Schroeder et al. (2002) ressaltaram a importância da existência de plasmídios e transposons. Estes constituem elementos de transferência genética de uma célula para outra, capazes de se replicarem, contribuindo para a distribuição de genes de resistência aos antimicrobianos (ibid.).

A existência de plasmídios R ou fatores R, que possuem como principal característica a presença de genes de resistência para antimicrobianos, é considerada por muitos como a principal causa da resistência bacteriana (GOMES et al., 1989). Por sua vez, os transposons constituem pequenas moléculas de DNA que podem se inserir nos cromossomos ou plasmídios trocando de posição e codificando a síntese de enzimas de resistência a antimicrobianos (ibid.).

Lemaître et al. (1998) demonstraram a múltipla resistência de *Listeria* spp. a agentes antimicrobianos (anti-sépticos e desinfetantes). Observaram a presença de DNA extracromossomal em todas as cepas resistentes e verificaram, através de conjugação experimental, que plasmídios eram transferidos em alta frequência entre as cepas, inclusive entre *L. monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

O gênero *Listeria* apresenta susceptibilidade uniforme aos antibióticos contra bactérias Gram positivas (CASTRO, 1989; ROBERTS et al, 1996). Seeliger e Jones (1986) relataram que, quando testadas “in vitro” pelo método de difusão em ágar, as cepas de *Listeria* foram sensíveis a ampicilina, carbenicilina, cefaloridina, cloranfenicol, eritromicina, furazolidona, neomicina, novobiocina, e menos sensíveis a clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, gentamicina, canamicina, nitrofurantoína, penicilina G e estreptomicina. As cepas foram resistentes ao ácido nalidíxico, polimixina B e sulfonamidas.

Wong et al. (1990) testaram a sensibilidade a antimicrobianos de cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas a partir de diversos alimentos vendidos em Taiwan e verificaram que os isolados foram altamente susceptíveis a ampicilina, cefalotina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, canamicina, neomicina, novobiocina, penicilina e estreptomicina. Cerca de 14,5% das cepas foram resistentes a meticilina e tetraciclina.

Araújo (1998) e Gonçalves (1998), ao estudarem o comportamento de *L. monocytogenes* frente a antimicrobianos, verificaram que todas as cepas apresentavam resistência a cefoxitina, cefalexina e ceftadizina. Gonçalves (ibid) também encontrou um certo número de cepas resistentes a ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina, penicilina e outros.

Os antimicrobianos mais indicados no tratamento da listeriose são: ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol e eritromicina (CASTRO, 1989). Marth (1988) relata que a maioria das cepas desse microrganismo é sensível à tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina e cefalotina.

Alguns autores citam que a *Listeria* pode ser refratária aos mecanismos bactericidas de muitos antibióticos, por ser intracelular e usar esse mecanismo para multiplicar-se e proteger-se, visto que os antimicrobianos se encontram no fluido extracelular e poucos são os agentes que podem penetrar, acumular e alcançar o citossol das células (CRESPO et al., 2003).

Na clínica a eficácia do tratamento da enfermidade depende da precocidade do início da instituição da medicação e da manutenção das doses adequadas, sendo a droga de eleição a ampicilina (GODOY, 1991).

Crespo et al (2003), em trabalho desenvolvido num hospital, obtiveram uma boa sensibilidade nos isolamentos de *Listeria* para ampicilina, penicilina e gentamicina (97,3%), justificando o uso dessas drogas no tratamento de primeira

linha. Ao contrário, as cefalosporinas não são indicadas porque a efetividade é muito baixa, inclusive *in vitro*.

Em relação a *Escherichia coli*, quando necessária a antibioticoterapia, deverá haver uma seleção pelo antibiograma, pois a sensibilidade dependerá muito da cepa isolada. No caso das infecções por EPEC, os biosorotipos mais freqüentemente isolados são resistentes à maioria dos antimicrobianos; as EIEC são sensíveis à maioria dos antibióticos, sendo a ampicilina o mais indicado para o tratamento; as ETEC e EHEC podem apresentar resistência múltipla com relativa freqüência (TRABULSI; TOLEDO, 1989b). Schroeder et al. (2002) alegam que as cepas de EHEC apresentam sensibilidade a diversos antimicrobianos pelo fato de as infecções não serem tratadas com o uso de antibióticos.

Petri et al (1989a) isolaram cepas de EPEC em amostras de carne moída e verificaram que apenas uma apresentou resistência múltipla a, no máximo, três das 15 drogas testadas; cinco cepas de diferentes sorogrupos apresentaram resistência a duas drogas e cinco foram resistentes a uma droga. As cepas do sorogrupo O26 apresentaram diversos modelos de resistência. Nenhuma cepa de EPEC foi resistente a estreptomicina, carbenicilina, cefalotina e tobramicina. A ampicilina foi a droga com maior população de EPEC resistente, seguida da tetraciclina. Com relação às demais drogas, a população sensível esteve acima de 93%.

MENG et al (1998) determinaram a resistência antimicrobiana de 118 cepas de *E. coli* O157: H7 e sete cepas de O157:NM isoladas de animais, alimentos e humanos, dentre as quais 30 (24%) foram resistentes a pelo menos um antibiótico e 24 (19%) foram resistentes a três ou mais antibióticos. As sete cepas isoladas de alimentos tiveram como origem a carne moída, apresentando resistência a três antimicrobianos: estreptomicina, sulfisoxazole e tetraciclina.

Oliveira et al. (1999), ao isolarem coliformes a 45°C ("fecais") e *E. coli* em 100% de amostras de hambúrguer de frango avaliadas, verificaram resistência a carbenicilina, clindamicina, eritromocina e rifampicina, e sensibilidade a gentamicina.

Schroeder et al. (2002) isolaram 361 cepas de *E. coli* O157 de humanos, bovinos, suínos e alimentos, das quais 220 (61%) foram sensíveis aos 13 antibióticos testados. Dentre essas, 99 (27%) foram resistentes a tetraciclina, 93%(26%) a sulfametoxazole, 61 (17%) a cefalotina e 48 (13%) a ampicilina. Das cepas isoladas, 210 (58%) foram identificadas como produtoras de shiga toxina e com baixa resistência aos antimicrobianos (10% a sulfametoxazole e 9% a

tetraciclina) e 189 (52%), como *E. coli* O157:H7 ( 10% resistentes a sulfametoxazole e 8% a tetraciclina).

Franco (2002) afirmou que os sorotipos de *E. coli* mais isolados são resistentes à maioria dos antimicrobianos, entretanto demonstrou em seu experimento 100% de sensibilidade a gentamicina e a tobramicina.

Martins et al. (2003), a partir de amostras de produtos de origem animal comercializados no estado do Ceará, isolaram 124 cepas de *E. coli* e analisaram o perfil antimicrobiano frente a 11 antibióticos, sendo que aproximadamente 63% demonstraram resistência entre dois a 11 antibióticos. A sulfonamida e a amicacina foram os agentes que apresentaram menor e maior eficiência respectivamente. O maior nível de resistência individual foi para a sulfonamida com 69,3%, seguida da tetraciclina com 43,4%, nitrofurantoína, 42% e estreptomicina, 32%.

Por outro lado, Vasconcelos <sup>6</sup>(1979; apud MARTINS et al., 2003) e Falcão et al.<sup>7</sup> (1982; apud MARTINS et al.,2003) registraram 100% e 47% de cepas sensíveis em relação a todos antibióticos testados, sendo que, neste último, no grupo das sulfonamidas, este índice foi de 100%.

## 2.5 LEGISLAÇÃO

A legislação sobre alimentos surgiu em muitos países para prevenir a venda de produtos fraudulentos, preocupando-se inicialmente com os defeitos de composição e peso. Atualmente, tem se estendido para outros aspectos da saúde pública como os que se referem à transmissão das bactérias patogênicas através de alimentos, tratando de garantir a segurança e qualidade dos mesmos (GERMANO et. al. ,2000).

O “Codex Alimentarius” da “Food and Agricultural Organization” (FAO) é tido como ponto de referência para consumidores, produtores e processadores de alimentos; agências nacionais de controle de alimentos, bem como comércio internacional de produtos alimentícios (ibid.).

Representando um marco na Legislação Brasileira para o controle higiênico dos alimentos, a Portaria Federal nº1.428 dispõe sobre a fiscalização da Vigilância

---

<sup>6</sup> VASCONCELOS, J.C. Colibacilos enteropatogênicos em alimentos semiprocessados de origem animal. Dissertação, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1979.

Sanitária, estabelecendo diretrizes para a adoção de BPF nas áreas de alimentos, assim como a utilização do APPCC em estabelecimentos que produzam ou comercializem alimentos, o Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos e o Regulamento Técnico para o Estabelecimento de Padrão de Identidade e Qualidade para Serviços e Produtos na Área de Alimentos (BRASIL, 1993).

A implementação da Portaria nº304, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, teve como objetivo principal introduzir modificações racionais e progressivas para que se alcançasse avanço em termos higiênicos, sanitários e tecnológicos na distribuição e comercialização de carne bovina, bubalina e suína, visando preservar a saúde do consumidor. Embora a questão do abate clandestino tenha motivado o sancionamento da portaria, os aspectos sanitários e tecnológicos, com destaque para temperatura, embalagem, identificação e distribuição de carnes, também são muito importantes (BRASIL, 1996). Essa portaria não atingiu os resultados desejados, surgindo assim a Portaria nº 145 (BRASIL, 1999a), que, além da obrigatoriedade da desossa, estabelece o novo padrão de cortes técnicos e a implantação da tipificação de carcaças como sistema de referência qualitativa para a remuneração dos animais de abate.

O regulamento final do “Food Safety and Inspection Service” (FSIS), do “United State Departament of Agriculture” (USDA), estabeleceu exigências para todos os estabelecimentos brasileiros interessados em permanecer na lista dos habilitados a exportar produtos à base de carne para os Estados Unidos, com o intuito de melhorar a segurança dos alimentos e modernizar o sistema de inspeção de carnes; prevenindo a contaminação dos produtos cárneos por patógenos e diminuindo os riscos de enfermidades de origem alimentar. Esta legislação está embasada no Programa de Redução de Patógenos, na implantação dos Procedimentos Padrões de Higiene Operacional (PPHO) e do Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e na obrigatoriedade de os estabelecimentos de abate realizarem análises microbiológicas para *E. coli* (FEDERAL REGISTER, 1996).

A Portaria Federal nº46 institui o APPCC a ser implantado nas indústrias de produtos de origem animal sob regime do Serviço de Inspeção Federal (SIF)

---

<sup>7</sup> FALCÃO, D.P.; *et al.* Enterobactérias isoladas de alimentos. Ver. Microbiologia. 13(4), p. 402-411,

(BRASIL, 1998). O sistema APPCC é reconhecido internacionalmente como o melhor método de garantia de segurança de produtos alimentícios, que permite identificar riscos específicos e medidas preventivas para seu controle (BORGES; FREITAS, 2002).

A Portaria CVS6/99 aprova o Regulamento Técnico sobre os parâmetros e critérios para o controle higiênico-sanitário em estabelecimentos de alimentos e institui obrigatoriedade da responsabilidade técnica (BRASIL, 1999b).

Os casos de listeriose confirmados nos Estados Unidos e Inglaterra devido às carnes processadas, os relatos de que a *Listeria* está presente nestes produtos ao nível varejista, juntamente com a preocupação quanto à capacidade do microrganismo de crescer em uma temperatura de refrigeração, resultou, no ano de 1989, no estabelecimento pelo USDA-FSIS de um programa de monitoramento e verificação de *L. monocytogenes* em produtos cárneos e na instituição de tolerância zero deste patógeno em produtos prontos para consumo nos Estados Unidos (RYSER; MARTH, 1991; LAWRENCE; GILMOUR, 1994; SILVA; TIBANA, 1995). Já os países da Europa, como a Alemanha, têm sido mais tolerantes, permitindo um máximo de 100 UFC/g para alguns tipos de alimentos (SILVA; TIBANA, 1995). Em junho de 2003, o FSIS publicou uma lei exigindo que os estabelecimentos federais produtores de alimentos cárneos e de aves prontos para o consumo incluíssem em seu programa de HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) ou do Sanitation SOPs (Sanitation Standard Operating Procedures) métodos de prevenção para contaminação por *L. monocytogenes*. Os estabelecimentos seriam verificados quanto à eficácia de suas ações e seus programas de controle testados periodicamente pelo FSIS. Também ficou estabelecido que o produto seria considerado adulterado se fosse constatada a presença de *L. monocytogenes* ou se tivesse tido contato direto com alimentos contaminados com o determinado patógeno (FSIS, 2003b).

A RDC nº 12 aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, estipulando para carne bovina crua refrigerada a tolerância máxima para amostra indicativa e representativa de  $10^4$  coliformes a 45°C/g. Em relação a *L. monocytogenes* e *E. coli* patogênica, de acordo com o anexo II da citada resolução, fica estabelecido que o produto o qual demonstrar presença ou quantificação de

microrganismos patogênicos ou toxinas que representem risco à saúde do consumidor é considerado impróprio para o consumo (BRASIL, 2001).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL E AMOSTRAGEM

Foram adquiridas 30 amostras de carne bovina de estabelecimentos comerciais incluindo supermercados e açougues da cidade do Rio de Janeiro nas condições oferecidas ao consumo, onde o corte selecionado foi a alcatra. As amostras pesavam 1,0 Kg cada, sendo que foram divididas em 500 gramas inteiros e os outros 500g moídos no próprio estabelecimento, no ato da compra. Imediatamente após a compra, as amostras foram transportadas em recipiente isotérmico para o laboratório.

O número representativo das amostras satisfaz as exigências de amostragem para diagnóstico analítico, em conformidade com o método de amostragem descrito por Di Giacomo e Koepsell (1986) e Martin et al (1987), tendo em vista que as prevalências de *Listeria* spp. e *E. coli* em carne bovina vêm apresentando respectivamente variações de 34% a 96% conforme demonstrado por Mc Clain e Lee (1988), Mesquita (1990), Dediol et al. (2002) e Picchi et al. (2003); e de 30% a 90% de acordo com Cerqueira et al. (1997) e Martins et al. (2003).

Procederam-se as análises de amostras de carne bovina no período de maio a novembro de 2003, no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal do Departamento de Alimentos da Faculdade de Veterinária, na Universidade Federal Fluminense – Niterói/RJ (ABNT, 1988).

Esterilizou-se a vidraria utilizada em forno Pasteur a 170°C por uma hora e prepararam-se as soluções e meios de cultura, esterilizando-os em autoclave, conforme respectivas especificações. Testou-se a eficiência da esterilidade dos meios de cultura com ampolas do bioindicador Sterikon (Merck 10594), colocando-as

nas autoclaves durante o processo de esterilização. Esse bioindicador de cor violeta, é composto por caldo nutriente, glicose, indicador de pH, esporos de microrganismos apatogênicos e de *Bacillus Sthearothermophilus* (ATCC 7953). Após o processo, incubaram-se as ampolas a 55°C; em caso de uma esterilização inadequada, a coloração se tornaria amarela e turva em 24-48 horas, devido ao crescimento de microrganismos e à formação de ácido resultante da fermentação da glicose pelo *Bacillus Sthearothermophilus*.

Com o intuito de observar o real comportamento dos microrganismos e testar a eficácia de todos os meios de cultura utilizados nas diferentes fases, estes foram semeados com as culturas padrões: *E. coli* INCQS 00312- origem UFF/NCIB-86, *E. coli* INCQS 00127- origem ATCC 10799, *E. coli* INCQS 00046- origem ATCC 11303, *E. coli* INCQS 00179- origem CDC H27, *E. coli* INCQS 00181 – origem CDC 055, *E. coli* O157:H7 E-40705-SH1-PHLS e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (Fiocruz).

### 3.2 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS

Realizou-se todo o procedimento analítico em câmara asséptica, na margem de segurança do bico de Bunsen. Procedeu-se a desinfecção com álcool a 70% das superfícies da bancada e da embalagem contendo a amostra. Posteriormente pesaram-se assepticamente 25g de cada amostra em embalagens plásticas de “stomacher” estéreis utilizando-se a balança analítica. Homogeneizaram-se essas subamostras com auxílio do “stomacher” durante dois minutos em velocidade normal.

Submeteram-se as amostras às seguintes análises bacteriológicas: isolamento e identificação de bactérias dos gêneros *Listeria* e *Escherichia*. A partir das cepas isoladas, realizaram-se a caracterização sorológica e a avaliação da sensibilidade e resistência frente a antimicrobianos.

### 3.3 METODOLOGIA

#### 3.3.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Listeria* spp.

A técnica utilizada foi baseada na metodologia revisada do USDA - FSIS (MC CLAIN; LEE, 1988), que inclui: enriquecimento seletivo primário, enriquecimento seletivo secundário, plaqueamento, isolamento e diferenciação em ágar sangue (APÊNDICES- FIGURA 1).

Pesaram-se assepticamente 25g de cada amostra para realização da análise procedendo-se a homogeneização com o caldo de enriquecimento primário por dois minutos em velocidade normal no “*stomacher*”. No enriquecimento primário utilizaram-se 225mL do meio de cultura “Modified *Listeria* Enrichment Broth” (UVM- University of Vermont Medium) (DIFCO 222330), e incubou-se a 30+/- 2°C por 24 horas, sob condições normais de atmosfera.

Após a incubação, estriou-se o subcultivo do enriquecimento primário (UVM) com auxílio de alça de platina em placas com ágar MOX (Modified Oxford) (MERCK 7004) suplementado com SR140. O meio possui, em sua formulação, esculina e citrato férrico amoniacal, que atuam como indicadores no isolamento e diferenciação da *Listeria*. O suplemento é composto por componentes inibidores: cicloheximida (200,0mg), sulfato de colistina (10,0 mg), acriflavina (2,5 mg), cefotetan (1,0 mg) e fosfomicina (5,0 mg). Incubaram-se as placas de ágar Mox a 35°C por 24 e 48 horas para posterior observação das colônias típicas, que são esféricas e rodeadas por um halo preto. A *Listeria* hidrolisa a esculina produzindo zonas escuras ao redor das colônias devido à formação do componente enegrecido ferro fenólico derivado do aglucon (ANEXOS- FIGURA 7).

Simultaneamente, da cultura do enriquecimento primário transferiu-se com auxílio de pipeta 0,1mL para 10mL do caldo de enriquecimento secundário, denominado caldo Fraser (OXOID CM895), constituído, dentre outros componentes, por esculina e citrato férrico amoniacal, e suplementado com SR156E (OXOID). Incubou-se a 35°C por 24 e 48 horas. Esse suplemento é composto por inibidores do crescimento de bactérias acompanhantes como: ácido nalidíxico (10,0 mg), acriflavina (12,5 mg) e citrato férrico amônico (250,0mg). O caldo de coloração amarelada fica enegrecido, devido à ação da enzima beta-D-glucosidase produzida

pela *Listeria*, que hidrolisa a esculina em esculentina e glicose. A esculentina reage com o ferro oriundo do citrato férrico amoniaco originando um complexo enegrecido. Esse subcultivo foi estriado com auxílio de alça de platina em placas de ágar MOX e incubado a 35°C por 24/48 horas (OXOID,1991).

Das colônias típicas obtidas e isoladas nas fases do plaqueamento acima citadas, cinco foram selecionadas e cultivadas por picada em placas contendo ágar Trypticase de Soja (Merck 5458) com 0,6% de extrato de levedura (Merck 3753) e 5% de sangue de carneiro. Incubou-se a 35°C por 24 horas para posterior observação de uma zona clara ao redor da perfuração, que seria uma indicação da ação beta hemolítica do microrganismo, quando presente. Concomitantemente, confeccionaram-se esfregaços em lâmina, corados pelo método de Gram para verificação das características morfotintoriais das bactérias (bastonetes Gram positivos pequenos e curtos, em cadeias curtas, paralelamente ou em forma de "V") (ANEXOS- FIGURA 8).

Repicaram-se os subcultivos crescidos para tubos contendo ágar Motilidade para *Listeria* (DIFCO 0105175), ágar Trypticase de Soja com 0,6% de extrato de levedura, ágar e caldo Manutenção de *Listeria* com extrato de levedura e de carne. Todos esses meios inoculados foram incubados a 30°C por 24 horas e posteriormente mantidos em refrigerador a 4°C. Partindo desses subcultivos realizaram-se as provas bioquímicas.

### 3.3.1.1 Provas bioquímicas

As provas bioquímicas realizadas, segundo Faddin (1985), para identificação das espécies de *Listeria* foram:

- Produção de catalase: sobre os cultivos crescidos nos tubos de ágar Trypticase de Soja com 0,6% de extrato de levedura inclinado, incubados a 30°C por 24 horas, adicionou-se 1 mL de água oxigenada a 3%. O teste é positivo quando ocorre efervescência sobre o crescimento bacteriano. As cepas de *Listeria* são catalase positivas.
- Teste de motilidade: semearam-se as cepas em estudo em tubos contendo ágar Motilidade para *Listeria* (DIFCO 0105-17-5) por picada no centro do meio de cultura e até uma distância de 1cm da superfície.

Após o período de incubação de 48 horas a 30°C o crescimento, que na presença de *Listeria* forma turbilhonamento no formato de “guarda-chuva”, caracterizou a prova como positiva.

- Redução de nitrato a nitrito: transferiu-se com alça de platina de 0,3mm de diâmetro, o inóculo de cada cultura suspeita em tubos com 3 mL de caldo Nitratado (MERCK 10204). Incubou-se a 30°C por 24 horas e após esse período adicionou-se 0,1 mL das soluções A (ácido sulfanílico 0,8%) e B (alfa-naftol 0,5%) do reativo de Gries-Illosvay (MERCK 9023). Quando ocorre o aparecimento da coloração rosa ou avermelhada, considera-se o teste positivo, e quando de negativo, adiciona-se zinco em pó para observar se o meio permanece com a cor inalterada (teste positivo) ou adquire uma coloração rósea avermelhada (teste negativo). As cepas de *Listeria* não reduzem o nitrato.
- Produção da urease: tubos contendo 3 mL de caldo Uréia (MERCK 8483), foram inoculados com as cepas suspeitas e incubados a 30°C por 48 horas. As cepas produtoras de urease hidrolisam a uréia presente no meio de cultura originando radicais alcalinos e tornando o meio de coloração avermelhada pela viragem do indicador vermelho de fenol. Em relação à presença de *Listeria*, a prova deve ser negativa, não ocorrendo a viragem do indicador e permanecendo o meio com a coloração rosa.
- Comportamento em ágar Tríplice Açúcar Ferro (TAF) ou Tríplice Sugar Iron (TSI): repicou-se a cepa com auxílio de agulha em profundidade e estria na superfície do ágar Tríplice Açúcar Ferro (MERCK 3915) e incubou-se a 30°C por 24-48 horas. A prova é considerada positiva para bactérias do gênero *Listeria* quando ocorre acidificação com alteração da coloração da base e da superfície do meio (amarelos), sem produção de gás e sulfeto (não escurecimento do ágar).
- Prova do Vermelho de Metila: semearam-se tubos contendo caldo MR-VP (MERCK 5712) com as cepas suspeitas e incubaram-se a 30°C durante 96 horas. Após esse período de incubação, adicionaram-se três a cinco gotas da solução de vermelho de metila. O aparecimento da cor vermelha caracteriza a prova como positiva.

- Prova de Voges-Proskauer: utilizou-se como meio de cultura o caldo MR-VP (MERCK 5712) e ao cultivo de 48 horas a 30°C, adicionou-se 0,2mL da solução de hidróxido de potássio a 40% e 0,6mL da solução de alfa-naftol a 5%. Aguardou-se durante 30 minutos com os tubos abertos e inclinados para observar-se a produção da coloração avermelhada que caracterizava a prova como positiva.
- Fermentação de carboidratos: utilizou-se como meio base o caldo Púrpura de Bromocresol (MERCK 3032), adicionado separadamente dos seguintes carboidratos: glicose, manitol, maltose, xilose e rhamnose na concentração final de 1%. A esterilização dos tubos contendo manitol e maltose foi a 121°C durante 15 minutos e dos tubos com xilose e rhamnose, a 121°C por 10 minutos. As provas são consideradas positivas quando ocorre a viragem do indicador púrpura de bromocresol e a coloração do meio, originalmente púrpura, torna-se amarela devido à produção de ácido.
- “CAMP-test”: esse teste foi usado para detectar cepas fracamente hemolíticas de *Listeria monocytogenes* e auxiliar na diferenciação de outras espécies do gênero. Utilizou-se uma cepa de *Staphylococcus aureus* beta-hemolítico (ATCC 25923) que proporcionou uma potencialização a beta-hemólise das cepas de *L. monocytogenes* e *L. seeligeri*, e uma cepa de *Rhodococcus equi* CCT0541(ATCC6939), que potencializou a hemólise da *L. ivanovii*; entretanto a hemólise da *L. seeligeri* é descrita como sendo mais facilmente visualizada no teste de hemólise por perfuração; conforme procedimento em 3.3.1. As cepas de *Staphylococcus aureus* beta-hemolítico e *Rhodococcus equi* foram cultivadas em placas contendo ágar Trypticase de Soja com 0,6% de extrato de levedura e 5% de sangue estéril de carneiro, com auxílio de alça de platina verticalmente em linhas paralelamente opostas. No espaço entre as estrias de *S. aureus* e *R. equi*, inoculou-se uma única estria de cada cultura suspeita, perpendicular às outras duas, porém sem tocá-las. Incubaram-se as placas inoculadas a 35°C por 24 horas e após este período examinou-se a presença de zonas de hemólise. O teste é considerado positivo para *L. monocytogenes* quando o cultivo em

estudo produz zonas de hemólise em forma de seta próximo ao crescimento do *S. aureus*, e positivo para *L. ivanovii* quando as zonas de hemólise ocorrem concomitantemente próximas ao crescimento do *S. aureus* e do *R. equi* (ANEXOS- FIGURA 9).

Alíquotas dos cultivos positivos, identificados como *Listeria*, foram transferidos para ágar Manutenção e caldo Manutenção para *Listeria* (BRASIL, 1999c) e incubados a 35°C por 24 horas, sendo mantidos em geladeira a 4°C para posterior realização da sorologia e do teste de resistência antimicrobiana.

### 3.3.1.2 Caracterização antigênica das cepas isoladas de *Listeria*

O processo de caracterização antigênica das cepas isoladas de *Listeria* foi realizado no Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Esta técnica baseou-se na aglutinação “O” e “H” conforme recomendações de Donker-Voet (1959) e Seeliger e Höhne (1979).

### 3.3.2 ENUMERAÇÃO DE *Escherichia coli*

- Método 1 (MERCK, 2000) (APÊNDICE- FIGURA 2)

Pesaram-se assepticamente 25 g de cada amostra e procedeu-se a homogeneização com 225 mL de solução salina peptonada a 0,1% em *stomacher*, obtendo-se deste modo a diluição  $10^{-1}$ . Retirou-se uma alíquota de 1 mL desta diluição e transferiu-se para um tubo contendo 9 mL de SSP 0,1%, originando a diluição  $10^{-2}$ . Para as amostras de carne inteira prosseguiu-se as diluições até  $10^{-7}$ , enquanto que para carne moída foi procedida até a diluição  $10^{-9}$ .

Três séries de três tubos contendo 10 mL de meio Fluorocult LMX Broth Modified (Merck 10620) cada, foram inoculados e incubados a 35 - 37°C por 24-48 horas. Este meio é considerado altamente nutritivo pela presença do fosfato, garantindo um crescimento favorável aos coliformes presentes enquanto o lauril-sulfato de sódio inibe o crescimento de bactérias Gram positivas. Na composição do meio também estão presentes o substrato cromogênico 5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-GAL), que é clivado pelos coliformes, e o substrato

fluorogênico 4-metilumbeliferyl- $\beta$ -D-glucuronide (MUG), que é altamente específico para *E. coli*. Procedeu-se a leitura do teste com auxílio de lâmpada de luz ultravioleta, de comprimento de onda de 366nm (fonte de luz UV para microbiologia-MERCK 13203), de acordo com a seguinte interpretação: o aparecimento da cor verde-azulada determina a presença de coliformes a 35°C (“totais”) e a ocorrência da fluorescência azul a de *Escherichia coli* (coliformes “fecais”). Utilizou-se o reativo de Kovacs (MERCK 9293) para realização da prova do indol, cuja confirmação da presença da *E. coli* é determinada pelo surgimento de um anel vermelho, devido à presença do indol resultante do desdobramento do triptofano pelo microrganismo (ANEXOS- FIGURA 10). A partir dos tubos positivos calculou-se o número mais provável (NMP) de coliformes a 35°C e de coliformes a 45°C por grama de amostra, de acordo com a tabela de Mc Crady.

### 3.3.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Escherichia coli* PATOGÊNICAS (EPEC e EIEC)

- Método 2 (MEHLMAN; LOVETT, 1984) (APÊNDICE- FIGURA 3)

Pesaram-se 25 gramas de cada amostra que, após homogeneização em *stomacher*, foram adicionados a 225 mL de BHI (Merck 10493) e incubados a 35°C por três horas. Esse caldo proporciona a recuperação das condições fisiológicas do microrganismo e estimula a produção enzimática, aumentando o potencial imunogênico e patogênico. Após o período de incubação transferiu-se todo o inóculo para 250mL de caldo Triptona Fosfato e incubou-se a 44°C por 20 horas. Procedeu-se então a fase de plaqueamento, inoculando-se, com auxílio de alça de platina e em forma de estrias, a cultura suspeita em placas contendo ágar Mac Conkey Lacto0se (Merck 5465), ágar EMB (Merck 1347) e ágar *Salmonella-Shigella* (OXOID CM099). Após a inoculação, as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas.

O ágar Mac Conkey Lactose contém sais biliares e cristal violeta que inibem o crescimento da microbiota Gram positiva. A lactose e o indicador de pH vermelho neutro são utilizados para indicar a degradação da lactose, tornando o pH ácido. As colônias lactose positivas são róseas-avermelhadas envoltas por uma zona turva rosada, devido ao precipitado de ácidos biliares resultante da queda do pH.

No ágar EMB (Eosin Metilen Blue), os corantes eosina amarela e azul de metileno presentes na formulação do meio inibem a microbiota acompanhante indesejável, particularmente bactérias Gram positivas. A bactéria fermenta a lactose e produz ácido que precipita eosina amarela e azul de metileno, fornecendo o brilho verde metálico característico das colônias.

No ágar SS (*Salmonella-Shigella*), a bile bovina e as elevadas concentrações de tiosulfato e citrato inibem consideravelmente a microbiota acompanhante. As colônias possuem coloração de rosa a vermelho pela degradação da lactose com produção de ácido e a viragem do indicador vermelho neutro.

Três colônias típicas e isoladas de cada um dos meios foram selecionadas e inoculadas para triagem em tubos contendo meio SIM (Merck 5470) e ágar Citrato de Simmons (Merck 2501), sendo incubados a 35°C por 24 horas.

O meio SIM é usado para verificar as provas de sulfeto, indol e motilidade. A presença de sulfeto (H<sub>2</sub>S) é caracterizada pela coloração preta do meio de cultura. A motilidade é demonstrada pela turbidez difusa do meio ao redor do inóculo em profundidade. Para verificar-se a produção de indol adicionaram-se três a quatro gotas do reativo de Kovacs ao meio e a formação de um anel vermelho ou róseo na superfície indica a presença de indol, enquanto que o anel de cor amarela indica reação negativa.

O meio Citrato de Simmons permanece com coloração esverdeada se o microrganismo não utilizar o citrato como fonte de carbono nem os sais de amônio como fonte de nitrogênio.

Considera-se suspeitos os cultivos que se apresentarem H<sub>2</sub>S negativo (-), indol positivo (+), motilidade positiva ou negativa (+/-) e citrato negativo(-), estes foram inoculados em meio Mili (TOLEDO et al.,1982a) e meio EPM (TOLEDO et al.,1982b) e incubados a 35°C por 24 horas (ANEXO - TABELA 17). Após a interpretação dos testes, conservaram-se os tubos inoculados em geladeira a 4°C para posterior realização da sorologia e antibiograma.

#### 3.3.3.1 Interpretação dos testes de Mili e EPM

Toledo et al. (ibid.) reuniram dois ou mais testes bioquímicos em um único meio, simplificando consideravelmente a identificação de bactérias, além de

apresentar precisão, confiabilidade e vantagens em termos econômicos. Deste modo, o meio Mili fornece em um único tubo informações quanto aos testes de motilidade, formação de indol e detecção de lisina descarboxilase. Por sua vez, o meio EPM informa a capacidade de produção de gás a partir da fermentação da glicose, H<sub>2</sub>S, urease e triptofano desaminase.

Inoculou-se com agulha de platina o meio Mili no centro até a base do tubo e após 24 horas de incubação a 35°C, detectou-se a motilidade pela turvação total do meio ou pela observação de crescimento além da linha de inoculação. Se a cepa for imóvel, o crescimento se restringe à linha de inoculação e o meio permanece límpido. Quando há fermentação da glicose, ocorre a troca de cor da base do meio para amarelo e com a descarboxilação da lisina, a cor do meio é revertida para roxo ou roxo-acinzentado. Deste modo, coloração amarela nítida na base com uma banda roxa no topo indica reação negativa para lisina descarboxilase. Não se procedeu a prova do indol porque já havia sido analisada anteriormente.

Do mesmo modo inoculou-se toda superfície do meio EPM e o centro da base até o fundo do tubo. Incubou-se os tubos inoculados a 35°C por 24 horas. Observou-se a produção de gás, H<sub>2</sub>S e urease na base do meio, enquanto que a produção de l-triptofano desaminase foi observada na superfície.

A fermentação da glicose acidifica o meio na base, mudando a coloração para amarelo através do indicador azul de bromotimol e, no caso de produção de gás, há formação de bolhas. Na produção de urease ocorre alcalinização do meio e a mudança do indicador para azul ou amarelo-esverdeado. Quando há produção de H<sub>2</sub>S, a base do meio torna-se preta. Coloração verde - escuro na superfície indica produção l-triptofano desaminase.

No caso das culturas suspeitas de *E. coli*, o meio Mili pode apresentar reação positiva ou negativa para motilidade e para formação de lisina descarboxilase. Enquanto que o meio EPM se apresenta azul na superfície, indicando reação negativa para l-triptofano desaminase; base amarela, devido a não produção de uréase; ocorrência ou não de bolhas de gás e não formação de H<sub>2</sub>S.

### 3.3.4 ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO DE *E.coli* O157:H7 E DIFERENCIAÇÃO DE CEPAS ENTEROHEMORRÁGICAS (EHEC)

- Método 3 (MERCK ,1996) (APÊNDICE- FIGURA 4)

Pesaram-se assepticamente 25g de cada amostra, que foram acondicionadas em bolsas plásticas de “stomacher”, adicionadas de 225 mL de caldo Lauril Sulfato Triptose (MERCK 10266), homogeneizadas e posteriormente incubadas a 37°C por 24 horas. Procedeu-se a semeadura em placas contendo ágar Fluorocult *E.coli* O157:H7 (MERCK 4036) e ágar Mac Conkey Sorbitol (OXOID CM 813) de modo a obter colônias isoladas, incubando-se as placas inoculadas por 24 horas a 37°C .

O ágar Fluorocult *E. coli* O157:H7 é composto por desoxicolato de sódio, que inibe grande parte de crescimento da microbiota Gram positiva; sorbitol e indicador de pH azul de bromotimol, que determinam a degradação do álcool; tiosulfato de sódio e citrato férrico amoniacal, que resultam em descoloração parda enegrecida do meio pela presença de colônias de patógenos formadores de sulfito de hidrogênio pela precipitação de sulfito de ferro. As colônias possuem a coloração esverdeada sem produção de H<sub>2</sub>S, pois cepas sorbitol negativas não determinam a alteração de cor do meio de cultura. Analisaram-se as colônias mediante uma lâmpada ultra-violeta para observação da fluorescência, que, no teste negativo, deveria ser ausente devido à incapacidade da *E. coli* O157:H7 de produzir beta-D-glucuronidase. Essa enzima transforma o tetrametilumbeliferil beta-D-glucuronide (MUG) em tetrametilumbeliferona, que fluoresce sob radiação com luz UV.

Repicaram-se três UFC típicas de cada placa inoculada para triagem em meio SIM e ágar citrato de Simmons, e posterior semeadura em meio Mili e meio EPM; conforme procedimento descrito em 3.3.3.1. Os inóculos suspeitos foram estocados conforme descrito em 3.3.1, para posterior realização da sorologia e do teste de sensibilidade antimicrobiana.

### 3.3.5 SOROLOGIA

Para realização da sorologia, as culturas positivas para *E. coli* oriundas do meio EPM foram inoculadas em ágar Casoy (Trypticase de soja) (OXOID CM131) inclinado e incubadas a 35°C por 24 horas.

Utilizaram-se os soros polivalentes e monovalentes da Probac do Brasil (1998); para identificação dos sorogrupos de *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC), enteroinvasora (EIEC) e enterohemorrágica (EHEC). Todos os soros contêm anticorpos contra antígenos O e antígenos superficiais do tipo K, aglutinando bem culturas homólogas vivas e aquecidas, resultando em reações rápidas e, de modo geral, completas.

Realizou-se a prova sorológica de aglutinação em placa, previamente limpa e desengordurada com álcool. Obteve-se uma suspensão da cultura bacteriana em estudo com a adição de 0,3 mL de solução salina esterilizada sobre o cultivo crescido no ágar Casoy supracitado.

Inicialmente trabalhou-se com os soros polivalentes para EPEC (Poli A, Poli B e Poli C), para EIEC (Poli A e Poli B) e o soro anti *E. coli* O157. Os soros polivalentes de EPEC contêm anticorpos contra os seguintes sorogrupos: Poli A - O26, O55, O111 e O119; Poli B - O114, O125, O142 e O158; e Poli C - O86, O126, O127 e O128. Os soros polivalentes para EIEC possuem anticorpos contra os sorogrupos Poli A - O28ac, O29, O136, O144 e O152; e Poli B - O112ac, O124, O143, O164 e O167.

Para o controle do soro utilizou-se uma gota do mesmo e uma gota de solução salina, verificando-se a não ocorrência de autoaglutinação.

Procedeu-se o teste depositando sobre a placa de vidro uma gota de cada um dos anti-soros polivalentes e uma gota da suspensão bacteriana. Em seqüência, as mesmas foram homogeneizadas movimentando-se a placa durante um a dois minutos para posterior leitura através da formação de grumos, que deve ocorrer dentro de dois minutos para ser considerada uma reação positiva. Quando ocorreu aglutinação em um dos soros polivalentes, prosseguiram-se as provas utilizando-se os monovalentes correspondentes. Com a ocorrência da aglutinação em um dos monovalentes, considerava-se a cultura identificada.

A prova caracteriza-se como negativa quando a reação de aglutinação é parcial ou demora mais de dois minutos, as culturas não aglutinam com os polivalentes e quando aglutinam em um dos polivalentes, mas não nos monovalentes correspondentes.

### 3.3.6 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Após o isolamento e identificação, os cultivos de *E. coli* e *Listeria* foram testados quanto à sensibilidade aos antimicrobianos, segundo o método recomendado por NCCLS (1990), que se baseia no originalmente descrito por Bauer et al.<sup>8</sup> (1966, apud NCCLS), tido como o mais preciso. Utilizaram-se os polidiscos da Polisensidisc DME Especial, que consiste em um sistema composto por quatro módulos os quais contêm seis antibacterianos cada, classificados como os principais de uso rotineiro.

Prepararam-se placas de Petri com 20 a 25 mL do meio padrão ágar Müeller-Hinton (VETEC 5036), com pH em torno de 7,2-7,4. A suspensão bacteriana utilizada foi a mesma da sorologia, entretanto, ajustada com solução salina esterilizada para uma turbidez padrão de Kirby e Bauer, correspondente ao número um da escala de Mc Farland, que representa um total de  $3 \times 10^8$  bact./mL de meio. Preparou-se esta turbidez padrão adicionando-se 0,1 mL de cloreto de bário a 9,9 mL de ácido sulfúrico a 1%. Esta escala nefelométrica constitui o padrão de turvação mais freqüentemente utilizado nos laboratórios para determinar a intensidade da multiplicação bacteriana em meios de cultivo líquido; quanto maior o número de bactérias maior a opacidade do meio.

Com o uso de um cotonete estéril inoculou-se o cultivo líquido em toda superfície do meio em pelo menos três sentidos, girando a placa após cada semeadura. Então, aplicaram-se os discos de sensibilidade com auxílio de uma pinça previamente flambada e esfriada (ANEXOS- FIGURA 11).

Utilizaram-se para *E. coli* os polidiscos correspondentes aos módulos III e IV, por serem os indicados para realização de antibiogramas de microrganismos Gram-negativos. O módulo III é constituído pelos antibacterianos Cloranfenicol, Aztreonam, Sulfazotrim, Cefadizima, Cefotaxima e Amicacina. Por sua vez, o módulo IV é composto por Netilmicina, Ampicilina, Cefalotina, Cefoxitina, Gentamicina e Tetraciclina.

No caso da *Listeria*, por ser um microrganismo Gram positivo, utilizaram-se os polidiscos dos módulos I e IV. O módulo I corresponde aos antibióticos Penicilina

---

<sup>8</sup> BAUER, A W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disc Method. *The American Journal of Clinical Pathology*, v.45, n.4, p. 493-496, 1966.

G, Oxacilina, Teicoplanina, Vancomicina, Eritromicina e Clindamicina. O módulo IV é semelhante ao utilizado para *E. coli*, com exceção da Netilmicina, que é substituída pela Ceftriaxona.

Incubaram-se as placas inoculadas a 35 - 37°C durante 18-24 horas, e após este período, observaram-se os halos de inibição que foram mensurados com auxílio de um halômetro (milímetros). A interpretação do teste foi baseada na tabela que determinava as medidas padrão dos halos de inibição de cada antimicrobiano segundo a classificação como resistente, intermediário, moderadamente sensível e sensível.

### **3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O tratamento estatístico das análises microbiológicas foi realizado pela análise de variância (ANOVA) em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e em fatorial, seguidas do Teste de Tukey Kramer ao nível de 5% de significância. Os fatores avaliados corresponderam aos dois tratamentos a que as amostras foram submetidas (carne inteira e moída); aos enriquecimentos utilizados na metodologia de *Listeria* spp. (primário e secundário) e aos métodos usados no isolamento de *E. coli*.

## 4 RESULTADOS

Os resultados das análises realizadas nesta pesquisa estão representados nas Tabelas localizadas nos apêndices, no item oito.

Observando a Tabela 1, verifica-se que foi isolado um total de 173 cepas de *Listeria* spp. das amostras de alcatra analisadas. Destas, 72 (41,62%) foram originadas da carne inteira e 101 (58,38%) da carne moída. A espécie mais isolada foi a *Listeria innocua* 6a, totalizando 91 cepas, seguida da *Listeria monocytogenes* 4b com 45 cepas identificadas. Também foram isoladas 11 cepas de *Listeria innocua* 6b, uma de *L. innocua* rugosa, 18 de *L. innocua* não tipável e sete de *L. monocytogenes* 1/2b.

Na Tabela 2 encontram-se inseridos os resultados da eficiência do enriquecimento secundário, a partir do qual isolaram-se 156 cepas contra apenas 17 oriundas do enriquecimento primário.

Na Tabela 3 constam os valores médios dos isolamentos de *Listeria* spp., testando-se o efeito do fator tratamento (carne inteira e carne moída). Observa-se que nas seis cepas isoladas não houve efeito significativo do fator moagem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ( $p > 0,05$ ).

Os valores médios de isolamentos de *Listeria* spp. em função do tipo de enriquecimento utilizado (primário e secundário) estão dispostos na Tabela 4, na qual pode-se verificar que apenas na cepa 1 (*Listeria innocua* 6a) ocorreu diferença significativa pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

Está representado na Tabela 5 o resultado do teste de sensibilidade antimicrobiana, no qual a maioria das cepas avaliadas apresentou resistência aos antimicrobianos testados. Em relação às cepas patogênicas, das três cepas de *L. monocytogenes* 1/2b, uma apresentou sensibilidade intermediária a teicoplanina,

uma mostrou sensibilidade intermediária a gentamicina e outra foi sensível a gentamicina. Das 16 cepas de *L. monocytogenes* 4b, cinco foram sensíveis a teicoplanina, sete a vancomicina e três intermediárias a clindamicina. A cepa de *Listeria innocua* rugosa isolada demonstrou resistência a todos antibióticos testados. Ocorreu a presença de uma cepa de sensibilidade intermediária a ceftriaxona, uma sensível a cefalotina, três sensíveis a gentamicina e duas sensíveis a tetraciclina; correspondentes aos sorovares de *Listeria innocua*. Todas as cepas analisadas apresentaram resistência a penicilina, a oxacilina, a eritromicina, a ampicilina e a cefoxitina.

Estão inclusos na Tabela 6 os resultados do NMP de coliformes a 35°C e a 45°C. Observa-se que 100% das amostras estavam contaminadas com coliformes a 35°C e apenas cinco apresentaram ausência de coliformes a 45°C. A variação de coliformes a 35°C e coliformes a 45°C foi respectivamente de  $4,0 \times 10^3$  a  $1,1 \times 10^6$  e 0 a  $2,4 \times 10^3$  para carne inteira; de  $4,4 \times 10^3$  a  $2,5 \times 10^7$  e 0 a  $3,0 \times 10^5$  para carne moída. Para fins estatísticos, o NMP para a estimativa de coliformes  $<3$  foi considerado como zero, pelo fato de tal resultado oferecer a combinação de 0-0-0 na primeira, segunda e terceira séries. Dentre as amostras, a carne moída foi a que apresentou maior índice de contaminação por coliformes.

Na Tabela 7 verificam-se os valores médios do NMP, demonstrando efeito significativo do fator tratamento (moagem) pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ), tanto para coliforme a 35°C como para coliforme a 45°C.

O método 2 apresentou maior eficácia no isolamento de *Escherichia coli* patogênica, totalizando em 223 colônias confirmadas bioquimicamente, sendo 110 (49,33%) presentes na carne inteira e 113 (50,67%) na moída, conforme dados da Tabela 8. Das 223 colônias isoladas, 61 foram sorotipadas como *E. coli* patogênica e novamente a carne moída obteve uma quantidade maior de cepas (34 colônias- 55,74%) do que a inteira (27 colônias- 44,26%). Na mesma Tabela 8, pode-se observar que, após a sorologia, as cepas do grupo EPEC foram mais freqüentes (52 colônias), seguida por EIEC (oito colônias) e a ocorrência de apenas uma cepa de EHEC.

Na Tabela 9 consta o número de colônias de *Escherichia coli* confirmadas pela bioquímica nas diferentes amostras pelo método 3 (28 colônias). A carne moída mais uma vez apresentou um maior número de colônias confirmadas (16 colônias-

57,14%) do que a amostra inteira (12 colônias- 42,86%). Após a sorologia, apenas duas cepas foram tipificadas como patogênicas, pertencentes ao grupo das EIEC, sendo uma cepa oriunda da carne moída e a outra da carne inteira.

Na Tabela 10 são retratados os valores médios de isolamentos de cepas de *E. coli*, avaliando-se o efeito do fator tratamento (tipo de amostra: carne inteira e carne moída). Segundo os resultados, não houve efeito significativo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ( $p > 0,05$ ).

Encontram-se na Tabela 11 os resultados referentes aos valores médios de isolamento das cepas 1, 2 e 3 de *E. coli*, correspondentes a EPEC, EIEC e EHEC, respectivamente, em função das metodologias utilizadas (2 e 3). Ocorreu efeito significativo do fator método ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, somente na cepa 1 (EPEC).

Na Tabela 12 estão relacionados os meios de cultura e os correspondentes sorogrupos encontrados, constatando que os meios que mais proporcionaram isolamentos foram EMB e SS, ambos com 24 cepas (38,09%), paradoxalmente o MCS não demonstrou eficiência (0 cepa). Os sorogrupos identificados foram: EPEC A, EPEC B, EPEC C, EIEC A, EIEC B, EIEC C e EHEC. Nesta mesma Tabela, observa-se que a cepa mais isolada foi a EPEC B O142.

As cepas de *Escherichia coli* isoladas e sorotipadas como patogênicas apresentaram grande espectro de resistência, principalmente a ampicilina (11,32%), cefalotina (11,11%) e amicacina (10,06%); o resultado completo do teste de antibiograma pode ser visualizado na Tabela 13, onde também se observa a maior susceptibilidade a cefoxitina, gentamicina e tetraciclina (10,75%).

## 5 DISCUSSÃO

Na revisão de literatura pode-se observar que a característica ubiqüitária, a resistência fisiológica do microrganismo e a gravidade do processo patológico provocado no Homem justificam a preocupação com a *L. monocytogenes* no controle de qualidade de uma indústria e pelos órgãos de Saúde Pública. Os conhecimentos sobre a epidemiologia da listeriose tornam evidente a transmissão por ingestão de alimentos contaminados e a elevada taxa de mortalidade para a população susceptível, apesar da doença ser rara.

O resultado obtido neste estudo, no qual a opção pela análise da carne bovina foi devido ao fato desse alimento ser considerado uma importante fonte de alimentação utilizada pelo Homem, adverte a respeito da presença de *Listeria* spp. em grande parte das amostras avaliadas. Apesar de não existir descrições de surtos de listeriose no Brasil, é demonstrada a presença do microrganismo em alimentos, considerando-os como principal fonte de transmissão para o Homem (NASCIMENTO; CULLOR, 1994).

Nesta pesquisa foi isolado um total de 173 cepas de *Listeria* spp., provenientes das 30 amostras de carne (alcatra) bovina analisadas. Essa taxa de isolamento é equiparável com a referida por Picchi et al.(2003), que, ao analisarem amostras originárias de 25 quartos dianteiros bovinos, obtiveram 96% dessas amostras positivas para *Listeria* spp. O resultado também corrobora com o programa realizado pelo USDA-FSIS para verificar a incidência de *L. monocytogenes* em carne bovina crua, no qual foi isolado o microrganismo de 7,1% das 1726 amostras monitoradas (RYSER; MARTH, 1991). Isso foi atribuído ao grande número de animais de fazenda portadores assintomáticos que disseminavam o microrganismo através das fezes (ibid.).

Trabalhos equivalentes como o de Truscott e McNab<sup>9</sup>; Le Guilloux et al.<sup>10</sup> (apud RYSER; MARTH, 1991) também demonstraram a ocorrência de *Listeria* spp. na carne bovina crua e confirmaram ser relativamente comum a contaminação da carne moída por este microrganismo.

Em concordância com a literatura consultada, a frequência de isolamentos no presente estudo foi maior nas amostras de carne bovina moída; apesar de não apresentar diferença significativa na análise estatística. O isolamento de 101 (58,38%) cepas das amostras moídas e 72 (41,62%) das inteiras, pode ser justificado pelo processo de moagem, que aumenta a superfície de contato e expõe o produto a maior manipulação, favorecendo o desenvolvimento de microrganismos. Este achado reforça a importância da manipulação higiênica, da sanitização dos equipamentos e dos utensílios e da conservação do produto. Nas situações em que *Listeria* spp. cresceu em menor número em carne moída, foi, provavelmente, devido à competição estabelecida pelo elevado número de coliformes isolado.

A facilidade que o produto moído oferece para o crescimento de microrganismos explica o grande número de trabalhos desenvolvidos com esse tipo de alimento e a semelhança dos resultados encontrados. De modo similar, Dediol et al. (2002) demonstraram uma elevada taxa de isolamento ao avaliarem 100 amostras de carne moída e observaram que 37% dessas se encontravam contaminadas com *Listeria monocytogenes*. McClain e Lee (1988) isolaram *L. monocytogenes* de 40% das amostras de carne moída congelada avaliadas. Os resultados discriminados no presente estudo também corroboram com os dados citados na Proteste (2003), em que ocorreu o isolamento de *L. monocytogenes* em nove amostras de carne moída das 20 analisadas.

No que diz respeito à incidência das espécies de *Listeria*, a *L. innocua* foi a isolada com maior frequência (121 cepas); e o sorotipo *L. innocua* 6a o mais identificado (91 cepas), seguido por *L. innocua* não tipável (18 cepas), *L. innocua* 6b (11 cepas) e *L. innocua* rugosa (1 cepa). Convém ressaltar o isolamento das cepas patogênicas *L. monocytogenes* 4b (45 cepas) e *L. monocytogenes* 1/2b (7 cepas). Esses dados corroboram com os de Mesquita (1990) que isolou 24 cepas de *Listeria* spp. em 50 amostras de carne bovina moída, sendo 22 *L. innocua* 6a, uma *L.*

---

<sup>9</sup> TRUSCOTT, R.B.; McNAB, W.B. Comparison of media and procedures for the isolation of *Listeria monocytogenes* from ground beef. *J. Food Prot.* V.51, p. 626-628, 1988.

*innocua* não tipável sorologicamente e uma *L. monocytogenes* 1/2b. Pesquisa similar com carne bovina também foi realizada por Faber et al. (1989), que após selecionarem 20 UFC, obtiveram a confirmação em 19 UFC de *L. innocua* e uma de *L. monocytogenes*.

Apesar de *L. innocua* não ser patogênica para o Homem, seu isolamento, assim como o de outras espécies, não deixa de ter interesse já que possui o mesmo habitat (trato gastrointestinal). Deste modo sua presença pode também ser considerada presuntiva de um risco de contaminação por *L. monocytogenes*, indicando falta de condições sanitárias satisfatórias durante o processamento do alimento. Esta proposição é confirmada por Guerra e Bernardo (1999), que sugerem a competição da *L. innocua* com a *L. monocytogenes*; em que a *L. innocua*, multiplicando-se mais rapidamente, induz a resultados falsos negativos na pesquisa da *L. monocytogenes*. O simples fato de muitos animais portarem *L. monocytogenes* no trato intestinal impossibilita eliminá-la totalmente da carne crua, podendo resultar numa contaminação cruzada.

Os sorovares 4b e 1/2b isolados nesta pesquisa são apontados por Farber e Peterkin (1991) como sendo os mais comumente associados a surtos de toxinfecção alimentar. Com base no levantamento bibliográfico, observa-se uma diferença de distribuição dos sorotipos de *L. monocytogenes* de acordo com o produto analisado. Lage (1993) isolou os sorotipos 4b e 1/2b nas amostras de carne de frango; nos cortes de peito de frango analisados por Gonçalves (1998), os sorotipos identificados foram 4b, 1/2b e 1/2c; nas amostras fatiadas de blanquet e presunto de peru foram isolados por Araújo (1998) os sorovares 4b, 1/2c, 1/2b e 1/2a; Silva (1996) isolou das amostras de embutidos cárneos os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b; Mesquita (1991) identificou em amostras de carne bovina moída uma cepa de *L. monocytogenes* 1/2b e Le Guilloux et al. (op. cit.) demonstraram a predominância do sorotipo 1/2 nos produtos de carne bovina analisados. Farber et al. (1989) constataram que mais de 80% das *Listeria monocytogenes* isoladas a partir de amostras de carne bovina e de frango pertenciam ao sorogrupo 1. Portanto, no presente experimento, a freqüência de isolamentos na carne bovina inteira e moída, assim como os sorotipos identificados, encontram-se em concordância com os trabalhos referidos.

---

<sup>10</sup> LE GUILLOUX, M.; DOLLINGER, Cl.; FREYBURGER, G. *Listeria monocytogenes*- Sa fréquence dans les produits de charcuterie. *Bull. Soc. Vet. Prat. France*, V.64, n1, p. 45-53,1980.

Considerando-se que a saúde pública é fundamental para dispersão bacteriana em diversos “habitats”, cabe ressaltar que Hofer, em 1975, identificou os sorotipos 4b e 4ab em amostras provenientes de uma estação de tratamento de esgoto. Posteriormente, em 1984, Hofer et al. verificaram a predominância dos sorotipos 4b, 4a e 1/2a em processos infecciosos e portadores humanos. No mesmo ano isolaram os sorotipos 1/2b (46,87%), 4b (25%) e 1/2a (18,75%) de amostras de solo (HOFER; PÓVOA, 1984). Esses dados relevam a importância epidemiológica que os sorotipos 4b e 1/2b isolados nas amostras analisadas nesta pesquisa possuem, diante da possível presença em processos infecciosos humanos e contaminação do meio ambiente através das fezes.

Em relação à metodologia aplicada, a escolha pelo método do USDA-FSIS é justificada por ser o mais eficiente, rápido e indicado para produtos cárneos (DESTRO; SERRANO,1990; RYSER; DONNELLY, 2001). É notável a maior frequência de isolamentos a partir do caldo de enriquecimento secundário confirmando maior eficiência na recuperação das células injuriadas e maior seletividade. O caldo de enriquecimento primário constituiu uma seleção prévia dos microrganismos. Este resultado está em concordância com o obtido por McClain e Lee (1988), que afirmaram que a recuperação de cepas de *L. monocytogenes*, partindo-se de amostras de carne, apresentou um aumento de 42% quando utilizaram o enriquecimento secundário após o primário. O uso do ágar Mox foi eficaz e rápido porque dispensou a transiluminação para o reconhecimento das colônias, por conter em sua formulação o revelador que facilita a visualização das colônias, podendo ser feita a olho nu em 12-24 horas. Os testes bioquímicos utilizados para confirmar e identificar *Listeria* spp. foram eficientes. Entretanto, assim como no estudo de Guerra e Bernardo (1999), os CAMP testes efetuados nem sempre conduziram a resultados positivos evidentes. Verificou-se na nona amostra inteira que quatro cepas de *L. monocytogenes* foram CAMP negativa, apesar de serem beta-hemolítica, e que uma outra foi CAMP positiva, mas não era beta-hemolítica.

Dediol et al. (2002) e Picchi et al (2003) adotaram metodologia semelhante e obtiveram sucesso em seus resultados. Gonçalves (1998), comparando as metodologias, observou que, através do enriquecimento secundário do USDA e com o uso de ágar OX, foi isolado um maior número de cepas. Entretanto, Silva (1996), em seu experimento, demonstrou que o meio de Palcam foi mais eficiente no

isolamento de *Listeria* spp.. Por sua vez, Lage (1993) e Gonçalves (1998) demonstraram a superioridade do ágar LPM na recuperação de células de *Listeria*. Deste modo, para obtenção de um maior número de colônias suspeitas e confirmação positiva nos testes bioquímicos, é mais aconselhável o uso de pelo menos dois meios de plaqueamento seletivo.

Apesar de órgãos internacionais como APHA, AOAC, FDA e nacionais, como M.A., M.S. estabelecerem métodos para detecção de *Listeria* spp. em alimentos, não existe um meio padrão universalmente recomendado. Os níveis de detecção variados encontrados resultam da utilização de diversos métodos com diferentes meios de cultura, associado a fatores como o tamanho da amostra, o número de colônias selecionadas para a confirmação e o local onde as amostras são adquiridas (DESTRO; SERRANO, 1990; FARBER; PETERKIN, 1991; LAGE, 1993).

Devido ao maior número de casos envolvendo o leite e produtos lácteos (principalmente queijos), estes têm sido os alimentos mais estudados como veículos de transmissão da listeriose (DESTRO; SERRANO, 1990; NASCIMENTO; CULLOR, 1994; LOGUERCIO et. al., 2001). Autores como Lage (1993) e Gonçalves (1998), ao isolarem *Listeria* spp. em carne de frango, afirmaram que a frequência é maior nesse tipo de carne devido à maior manipulação e às etapas do processamento, como escaldagem e resfriamento, podendo ocorrer contaminação cruzada. Entretanto, os resultados obtidos neste estudo demonstram a relevância da *Listeria* spp. como patógeno emergente de origem alimentar, destacando também a carne bovina como fonte capaz de veicular o microrganismo.

O teste de sensibilidade antimicrobiana demonstrado na Tabela 5 indica que a maioria das cepas de *Listeria* spp. apresentou resistência frente aos antimicrobianos testados. Esse dado diverge dos citados na literatura, que indicam geralmente sensibilidade a ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina e cefalotina (SEELIGER; JONES, 1986; MARTH, 1988; CASTRO, 1989). Crespo et al (2003) demonstraram uma boa sensibilidade nos isolamentos de *Listeria* para ampicilina, penicilina e gentamicina (97,3%). No presente estudo, todas as cepas analisadas foram resistentes a ampicilina, que, segundo Godoy (1991) e Crespo et al. (2003), é o fármaco de eleição no tratamento da listeriose. Entretanto, foram encontradas cepas sensíveis a teicoplanina, vancomicina, cefalotina, gentamicina e tetraciclina; concordando desta maneira com os resultados obtidos por Araújo (1998).

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 clorafenicol, três a ampicilina, duas a eritromicina e uma a tetraciclina.

Por outro lado, Wong et al (1990) e Araújo (1998) verificaram em seus isolados um número maior de cepas susceptíveis aos antibióticos testados, principalmente a ampicilina, clorafenicol, eritromicina, gentamicina e penicilina.

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 (GOMES et. al., 1989; TRABULSI; TOLEDO, 1989b; FRANCO, 2002; SCHOEDER et al., 2002). Esse fato, somado 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 desses nos alimentos, vêm acelerando a emergência da resistência bacteriana a antimicrobianos (MENG et al., 1998; MARTINS et al., 2003).

De acordo com o levantamento bibliográfico, as características da *Escherichia coli* como indicadora de contaminação fecal e condições higiênicas insatisfatórias, associada à patogenicidade das diferentes cepas descritas, representam um desafio para a indústria alimentícia e para os órgãos governamentais.

A enumeração (NMP) de coliformes a 35°C e coliformes a 45°C, avaliada pelo método 1, foi elevada tanto em amostras de carne bovina inteira como em moída, constatando-se valores maiores para as amostras moídas, sendo esta diferença estatisticamente significativa. A variação dos resultados de coliformes a 35°C foi de  $4 \times 10^3$  a  $1,1 \times 10^6$  para carne inteira e  $4,4 \times 10^3$  a  $2,5 \times 10^7$  para carne moída. Apenas cinco amostras não apresentaram coliformes a 45°C, entretanto a maioria variou de 0 a  $2,4 \times 10^3$  para carne inteira e 0 a  $3,0 \times 10^5$  para carne moída. Esses resultados são equiparáveis aos encontrados por Leite et al. (1988) nos quais 100% das amostras de alimentos examinadas apresentaram coliformes a 35°C em contagens significativas e 56% apresentaram NMP de coliformes a 45°C acima de  $5,0 \times 10^2$ /g, inclusive as amostras de carne moída que apresentaram  $3,5 \times 10^4$ /g coliformes a 45°C. Resultados semelhantes, em avaliações da qualidade microbiológica da carne bovina moída, também foram demonstrados por Costa et al. (2000) ao verificarem que 100% das 30 amostras analisadas estavam contaminadas com coliformes a

35°C, 90% com coliformes a 45°C e 40% positivas para *E. coli*; por Ritter et al. (2001), que encontraram um número elevado (>110,0 UFC/g) para coliformes a 35°C e a 45°C; por Ferreira e Sobrinho (2003) em que 83,3% das amostras estavam contaminadas com coliformes a 35°C e 16,66% com coliformes a 45°C; por Oliveira et al. (2002), sendo que, para coliformes a 35°C, 82% das amostras tiveram contagem entre 10 e 10<sup>2</sup> UFC/g e 10% obtiveram 10<sup>3</sup> UFC/g, referindo-se a coliformes a 45°C, constataram que 48% das amostras apresentavam contagem de até 10<sup>2</sup>UFC/g e 4% apresentaram contagem de 10<sup>3</sup> UFC/g; por Pigatto e Barros (2003), ao verificarem que 86,6% das amostras tiveram contagens para coliformes superiores a 10<sup>5</sup>UFC/ml e por Motta et al. (2000) quando 53,3% das amostras avaliadas apresentaram contagem de coliformes a 35°C com valores superiores a 10<sup>4</sup> NMP/g, os testes confirmativos para coliformes a 45°C mostraram que 20% das amostras se encontravam em condições higiênicas insatisfatórias e 26,7% foram consideradas impróprias para o consumo.

A justificativa desses resultados foi baseada na manipulação excessiva da carne, condições precárias de higiene, condições inadequadas de temperatura de armazenamento, manejo inadequado por parte dos manipuladores e por contaminação proveniente do processo de abate (ibid.).

O grande número de trabalhos com resultados positivos, abordando os coliformes e em especial a *E. coli* em carne bovina, é justificado pelo fato de que o bovino é considerado reservatório natural (especialmente da EHEC) e que o consumo de alimentos contaminados direta ou indiretamente através das fezes bovinas representa a principal via de transmissão desse microrganismo. A carne pode ser contaminada durante o abate, quando as bactérias intestinais contaminam a carcaça, ou no processamento inadequado (FRANCO; LANDGRAF, 1996; CERQUEIRA et al., 1997; TRABULSI,1999; BRASIL,2002).

De acordo com os achados do presente estudo e conforme a literatura consultada (CERQUEIRA et al., 1997; PATOLOGIA, 2003), confirma-se que a carne moída crua ou mal passada constitui um fator de risco de toxinfecção alimentar. Este relato sugere, conforme mencionado anteriormente, a influência das condições precárias de manuseio, higiene durante o processo de moagem, sanitização de equipamentos e armazenamento do produto.

O número total de colônias de *E. coli* diagnosticadas nesta pesquisa foi de 251. Entretanto, tem-se o conhecimento de que apenas uma parte isolada de alimentos é considerada patogênica (BRYAN, 1996).

Conforme consta na Tabela 12, a maior frequência de isolamentos foi de cepas de EPEC (51 cepas) e os sorogrupos mais identificados foram EPEC B O142 (27 cepas), EPEC B O125 (nove cepas) e EPEC A O111 (cinco cepas). Além desses, também foram identificados, entretanto em números inferiores, EPEC A O55 (três cepas), EPEC A O119 (uma cepa), EPEC B O158 (uma cepa), EPEC B O114 (uma cepa), EPEC C O128 (duas cepas) e EPEC C O86 (três cepas). Esses achados são preocupantes pela razão da EPEC ser um importante microrganismo causador de gastroenterites em indivíduos de faixa etária extrema e imunodeprimidos (HOBBS; ROBERTS, 1992; FRANCO; LANDGRAF, 1996).

A taxa de isolamento encontrada é equiparável às referidas por Petri et al. (1989a) e Mioko e Franco (1991), que também identificaram EPEC em amostras de carne bovina. Franco (2002) analisando amostras de carne suína encontrou igualmente maior número de cepas de EPEC e Martins et al. (2003), a partir das 124 colônias de *E. coli* isoladas de 35 amostras de POA, caracterizaram bioquímica e sorologicamente 93% como pertencentes ao grupo EPEC e 3,5% ao grupo EIEC do sorogrupo polivalente A.

Ao contrário, Cerqueira et al (1997) analisaram 105 amostras de carne moída bovina crua e isolaram *E. coli* patogênica de 34 amostras de carne (32,4%), sendo 14 amostras de carne moída, onde EIEC foi a categoria mais freqüente isolada, correspondendo a 21 (50%) das 42 cepas isoladas. No presente estudo, apesar de com menor freqüência, também ocorreu isolamento de cepas de EIEC A O144 (1), EIEC A O28ac (3), EIEC A O29 (3), EIEC B O143 (2) e EIEC C O112a (2).

Martins et al. (2003) ressaltaram que estudos relacionados a fatores de virulência, sintomatologia e epidemiologia demonstram que os sorogrupos EPEC são heterogêneos e algumas cepas apresentam expressivo potencial patogênico, podendo corresponder às classes EHEC, EaggEc e DAEC. Portanto, a presença de cepas de EPEC em alimentos deve ser considerada como um alerta em nível de Saúde Pública, inclusive no aspecto de doenças emergentes. Desta forma, a quantidade de cepas isoladas neste estudo é considerada, no mínimo, preocupante; além do que EPEC se constitui num dos mais importantes agentes etiológicos de

infecções intestinais agudas, particularmente na população de menor poder sócio-econômico.

Em referência à metodologia empregada, o método dois de cultivo mostrou-se mais eficiente do que o três, pois apresentou maior número de colônias confirmadas, o que foi comprovado pela análise estatística em relação somente às cepas de EPEC. Os meios com maiores percentuais de recuperação foram EMB (38,09%) e SS (38,09%), seguidos por Mac Conkey lactose (20,63%). Em trabalhos anteriores (CERQUEIRA et al, 1997; FRANCO, 2002), a metodologia aplicada que apresentou maior eficiência foi semelhante à utilizada nesta pesquisa. Entretanto, o meio que mais proporcionou isolamentos a Franco (2002) foi o Mac Conkey lactose, seguido por EMB. Segundo a literatura, a *E. coli* se desenvolve bem em meios com presença de lactose, que é considerada o substrato de eleição para coliformes (VARNMAN; EVANS, 1996b; MENG et al.; 2001).

Embora o método três seja indicado para detecção de EHEC, seu isolamento não foi obtido com esta metodologia. Todavia, no método dois, que é usado para isolamento de EPEC, EIEC e ETEC, foi detectada a presença de uma cepa de EHEC O157 em uma amostra de carne inteira, ao efetuar-se o estudo sorológico. Este achado está respaldado na literatura que menciona serem a temperatura de incubação e procedimentos de enriquecimento, como o uso de caldo lauril sulfato triptose, fatores capazes de inibir o crescimento deste microrganismo (MENG et al., 2001). Por isso, a importância de se identificar bioquimicamente as cepas isoladas, antes de se realizar a sorologia e a verificação dos fatores de virulência (ibid.). Também é relevante o desenvolvimento de novas pesquisas tendendo aperfeiçoar as técnicas de isolamento e identificação bacteriana, em função das variáveis que possam influenciar nos diagnósticos.

Apesar de no Brasil não haver registros de surtos epidemiológicos envolvendo EHEC, estudos realizados demonstram que mais de 80% do rebanho bovino brasileiro é portador do microrganismo (TRABULSI, 1999). Deste modo é considerado um reservatório natural desta bactéria, a qual potencialmente pode entrar na cadeia alimentar humana pela contaminação de carcaças com esterco ou pelo conteúdo intestinal de portadores sadios em matadouros (SCARCELLI; PIATTI, 2002). Convém ressaltar o isolamento de uma cepa de EHEC O157 no presente trabalho, frente a sua importância em Saúde Pública pela possibilidade de causar a colite hemorrágica, a SUH e a PTT.

A realização do teste de sensibilidade antimicrobiana de *E. coli* é fundamental pelo fato de a literatura advertir que os sorotipos mais isolados são resistentes à maioria dos antimicrobianos. Esta afirmação é fundamentada nesta pesquisa em que a maioria das cepas patogênicas de *E. coli* apresentou grande espectro de resistência aos antimicrobianos testados, principalmente a ampicilina (54 cepas), cefalotina (53 cepas) e amicacina (48 cepas). A susceptibilidade foi equivalente para cefoxitina (20 cepas), gentamicina (20 cepas) e tetraciclina (20 cepas).

No trabalho desenvolvido por Petri et al (1989a), a ampicilina foi igualmente o antimicrobiano com maior número de cepas resistentes; entretanto a tetraciclina foi a segunda com maior frequência de resistência e a cefalotina apresentou somente cepas sensíveis, divergindo dos resultados contidos na Tabela 13. MENG et al (1998) também ressaltaram a importância da variabilidade de resistência antibiótica de cepas de *E. coli*, demonstrando, entretanto, maior frequência em relação a estreptomicina e a tetraciclina, contradizendo o achado na atual pesquisa. Oliveira et al. (1999) corroboraram com os resultados deste trabalho ao verificarem que os cultivos de *E. coli* isolados de hambúrgueres eram 100% sensíveis a gentamicina.

Por sua vez, Schroeder et al. (2002), ao isolarem 361 cepas de *E. coli* O157, demonstraram que 220 (61%) foram sensíveis aos 13 antibióticos testados. De maneira similar aos resultados deste estudo, diagnosticaram resistência a cefalotina (17%) e a ampicilina (13%). Porém o maior índice de resistência foi de 27% para tetraciclina, que, no presente trabalho, inversamente mostrou maior susceptibilidade.

Os achados inclusos na Tabela 13 estão em conformidade com os de Franco (2002), que afirma serem as cepas de *E. coli*, patogênicas ou não, resistentes em sua grande maioria aos antibióticos testados. A similaridade também é demonstrada na susceptibilidade a gentamicina (100%).

Resultados semelhantes foram encontrados por Martins et al. (2003), ao utilizarem a mesma metodologia para analisar o perfil antimicrobiano das 124 cepas de *E. coli*, isoladas frente a 11 antibióticos, onde aproximadamente 63% demonstraram resistência entre dois a 11 antibióticos. Apenas 12 (9,6%) cepas foram sensíveis a todos antibióticos, aproximadamente 27% dos isolados apresentaram resistência à somente um antibiótico e na maioria das linhagens foi constatado o caráter de múltipla resistência, destacando-se uma cepa com resistência aos 11 antibióticos testados. Contudo, ao contrário do presente estudo, os autores observaram que o maior nível de resistência individual foi para a

sulfonamida (69,3%) seguida da tetraciclina (43,4%) e que as cepas testadas apresentaram maior susceptibilidade a cefalotina e amicacina. Igualmente ao achado neste trabalho, a maior parte das cepas foi sensível a gentamicina.

A literatura consultada e os dados obtidos neste trabalho advertem para uma possível evolução quantitativa de cepas de *Escherichia coli* resistentes. Por exemplo, Vasconcelos<sup>11</sup> em 1979 e Falcão et al.<sup>12</sup> em 1982 (apud MARTINS et al., 2003) registraram 100% e 47% respectivamente de cepas sensíveis em relação a todos antibióticos testados. Este aumento pode ser atribuído à seleção imposta pelo uso indiscriminado de antimicrobianos na terapêutica de humanos e animais, assim como na profilaxia na produção animal, associado à transferência dos genes responsáveis pela resistência através dos plasmídios e transposons, como mencionado anteriormente.

A presença de bactérias patogênicas na carne bovina e em produtos cárneos constitui um sério problema de Saúde Pública em virtude desses agentes causarem ETA e conseqüentemente prejuízos econômicos. Os resultados encontrados nesta pesquisa alertam para a necessidade da atualização dos padrões da carne bovina comercializada no Brasil, uma vez que a Resolução RDC n° 12 (BRASIL, 2001) não estabelece como provas analíticas, análises quantitativas ou qualitativas para este alimento em referência à *Listeria monocytogenes* e aos coliformes a 45°C, inclusive a *Escherichia coli*.

Além disso, a presença de *Listeria monocytogenes* e de cepas patogênicas de *Escherichia coli* em alimentos é indicativa da necessidade de se colocar em prática programas de monitoramento como o BPF, PPHO e APPCC. Também é relevante o trabalho das autoridades sanitárias visando uma inspeção mais rigorosa com a finalidade de proporcionar ao consumidor um alimento de melhor qualidade e seguro.

---

<sup>11</sup> VASCONCELOS, J.C. Colibacilos enteropatogênicos em alimentos semiprocessados de origem animal. Dissertação, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1979

<sup>12</sup> FALCÃO, D.P.; et al. Enterobactérias isoladas de alimentos. Ver. Microbiologia. V.13, n.4, p. 402-411, out./dez..1982.

## 6 CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos e discutidos neste estudo, pode-se concluir que:

- As condições higiênico-sanitárias da carne bovina comercializada no Rio de Janeiro estão deficientes e devem ser melhoradas através da implementação de programas como BPF, PPHO e APPCC, abrangendo todas as etapas de processamento desde o abate até a conservação das carnes comercializadas, inclusive melhorando a qualificação dos manipuladores de alimentos.
- As amostras que apresentaram contaminação por coliformes a 35°C, coliformes a 45°C, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* devem ser consideradas impróprias para o consumo em conformidade com o Anexo II da RDC nº12, pelo fato de a citada resolução não estabelecer um padrão específico para cada germe em questão;
- A *Listeria innocua* é a espécie mais freqüentemente isolada de alimentos, podendo ser considerada presuntiva ao risco de contaminação por *L. monocytogenes*;
- Os sorovares de *Listeria monocytogenes* mais isolados foram 4b e 1/2b, considerados os mais incriminados nos surtos de listeriose de origem alimentar, confirmando, portanto, a possibilidade de o alimento analisado ser um veiculador deste patógeno;
- Para a análise de *Listeria* spp., a partir de amostras de carne, foi comprovada a eficiência da metodologia do USDA e a necessidade da utilização permanente do enriquecimento secundário, como forma de aumentar o percentual de isolamento do germe e garantir a eficácia na análise do alimento. Entretanto, estatisticamente isso só foi verificado em relação ao isolamento das cepas de *L. innocua* 6a;

- O meio ágar Mox pode ser recomendado para o isolamento de *Listeria* spp., entretanto, sugere-se o uso de mais de um meio de plaqueamento seletivo para o isolamento de maior número de colônias e diferentes sorogrupos;
- A confirmação da existência de cepas resistentes aos antimicrobianos utilizados no tratamento da listeriose humana constitui um problema de Saúde Pública, especialmente para os indivíduos pertencentes ao grupo de risco;
- O método 2 de isolamento de *E. coli* proporcionou um maior número de colônias isoladas, sendo os meios EMB e SS, seguido por MacLac, os que apresentaram maior percentual de colônias confirmadas. Sobretudo, a análise estatística confirma a eficiência do método 2 somente nos isolamentos de cepas de EPEC;
- As cepas de *E. coli* isoladas e sorotipadas como patogênicas apresentaram grande espectro de resistência aos antimicrobianos testados e usados rotineiramente no tratamento das ETA, apresentando susceptibilidade equivalente para gentamicina, cefoxitina e tetraciclina;
- A probabilidade do aparecimento de bactérias com relevante potencial patogênico, selecionadas quanto ao caráter de resistência a antibióticos e à capacidade de transmissão desta característica, reafirma a importância das pesquisas envolvendo microrganismos emergentes associados ao perfil antimicrobiano.
- Os achados da presente pesquisa associados à possibilidade de emergência de bactérias patogênicas servem de alerta aos órgãos fiscalizadores, à comunidade científica, às instituições de ensino e pesquisa e aos consumidores em geral para a prevenção de ETA.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. *Preparo da amostra para exame microbiológico*. Rio de Janeiro: ABNT, mar. 1988. 03p. (NBR 10203)

ARAÚJO, P.C.C. *Listeria monocytogenes: Ocorrência, Verificação da Eficiência de Dois Meios de Plaqueamento, Sorovares Predominantes e Sensibilidade aos Antimicrobianos de Cepas Isoladas em Produtos de Carne de Peru Comercializados na Cidade de Niterói-RJ-Brasil*. Niterói-RJ.1998. 90f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense, UFF, Niterói.1998.

AYMERICH; et. al. Biochemical and Genetic Characterization of Enterocin A from *Enterococcus faecium*, a New Antilisterial Bacteriocin in the Pediocin Family of Bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, n.5, p.1676-1682.1996.

BAHK, J.; MARTH, E.H. Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. In: CLIVER, D.O . *Foodborne diseases*. San Diego: Academic Press, 1990. 395p., cap.18, p. 248- 159.

BAIRD-PARKER, AC. Foods and microbiological risks. *Microbiology*. v.140, p. 687 – 695. 1994.

BENEDICT, R.C.; SCHULTZ, F.J. An effect of iron level and food type on production of hemolysin and catalase of *Listeria monocytogenes* strain Scott A. *Journal of Food Protection*, v. 54, n.7, p. 528 – 531. 1991.

BILLE, J. et al..*Listeria*, a new and promising one-day syatem to identify *Listeria* isolates. *Applied and Evironmental Microbiology*, v.58, n.6, p.1.857 –1.860. 1992

BORGES, J.T.S.; FREITAS, A S. Aplicação do Sistema Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) no Processamento de Carne Bovina Fresca. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*. Universidade Federal do Paraná. Curitiba; v. 20, n. 2, p. 1-174, jan/jun.. 2002.

BRACKETT, R.E. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. *Food Technology*. v.42, n.4, p.162 -164. 1988.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001. *Diário Oficial da União*, Brasília, 10/01/2001.

BRASIL. Centro de Vigilância Sanitária - Divisão de Doenças e Transmissão Hídrica e Alimentar. In: *Manual das Doenças Transmitidas por Alimentos. Escherichia coli O157:H7 – enterohemorrágica*. São Paulo. 2002.

Disponível em : <<http://www.cve.saude.sp.gov.br>. Acesso: nov.2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria 304, de 22/04/1996. *Diário Oficial da União*. DIPOA: Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Brasília, 15/08/1996.

Disponível em:<http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/pot304.html>

Acesso: 22/09/2002

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria n. 46 de 10/02/1998. *Diário Oficial da União*, Brasília, 16/03/1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria 145, de 01/09/1998. *Diário Oficial da União*. DIPOA: Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Brasília, jan. 1999a.

Disponível em:<http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/pot145.html>

Acesso: 22/09/2002

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria 26, de 05/04/1999. *Diário Oficial da União*. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, 12/05/1999. 1999c

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 1.428 de 26/11/1993. *Diário Oficial da União*, Brasília, 02/12/1993.

BRASIL. Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. Portaria CVS6/99 de 10/03/1999. *Diário Oficial da União*, Brasília, 12/03/1999. 1999b.

BRYAN, F.L. Miscellaneous Pathogenic Bacteria in Meat and Poultry Products. In: PEARSON, AM.; DUTSON, T.R. *Advances in Meat Research*. Meat and Poultry Microbiology. AVI Publishing Company: Westport, Connecticut. v.2, c.9, p. 241-269.1986.436p.

BUCHANAN,R.L; DOYLE,M.P. Foodborne disease significance of *Escherichia coli O157:H7* and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Food Technology*. v. 51,n. 10, p. 69-76, out. 1997.

CASTRO, A F.P. *Listeria*. In: TRABULSI, L.R. *Microbiologia*. 2ed. Rio de Janeiro, São Paulo: Atheneu, cap.26, p. 131-132. 1989. 386p.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Community Outbreak of Hemolytic Uremic Syndrome Attributable to *Escherichia coli O111:NM*. South Australia, *Morbidity, Mortality Weekly Rept*, v.44,p.550-551, 557-558, 1995.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Division of Bacterial and Mycotic Diseases. Disease Information. *Escherichia coli O157:H7* . Disponível: [http://www.cdc.gov/mcidod/dbmd/diseaseinfo/escherichiacoli\\_t.htm](http://www.cdc.gov/mcidod/dbmd/diseaseinfo/escherichiacoli_t.htm)

Acesso: 10 de novembro de 2003.

CERQUEIRA, AM.F.; TIBANA, A; GUTH, B.E.C. High Occurrence of Shiga-Like Toxin Producing Strains among Diarrheagenic *Escherichia coli* Isolated from Raw Beef Products in Rio de Janeiro City, Brazil. *Journal of Food Protection*, v. 60, n.2, p. 177-180. 1997.

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

COSTA, F.N.; ALVES, L.M.C.; MONTE, S.S. Avaliação das Condições Higiênico-Sanitárias de Carne Bovina Moída, Comercializada na Cidade de São Luís, MA. *Higiene Alimentar*. São Paulo, v.14, n.77, p. 49-52, out. 2000.

CRESPO, M.P.; et al. *Aislamiento de Listeria monocytogenes em un Hospital de tercer Nivel*.

Disponível em: <http://www.colombiamedica.univalle.Edu.co//vol30no2/listeria.html>. Acesso: agosto 2003.

DEDIOL,C.; et al. Incidência de *Listeria monocytogenes* en Carne Vacuna Fresca en el Área del Gran Mendoza. *Higiene Alimentar*. São Paulo, v.16, n.102/103, p. 13-16, nov./dez. 2002.

DESMARCHELIER, P.M.; GRAU, F.H. *Escherichia coli*. In: HOCKING, AD. et al. Foodborne Microorganisms of Public Health Significance. AIFST (NSW. Branch): Australia. 5 ed., c.7, p. 233-259.1997.

DESTRO, M.T.; SERRANO, A.M. *Listeria* spp. em Alimentos. *Boletim SBCTA*. Campinas,v.24,n.1/2,p.13-37,jan/jun.1990.

DESTRO, M.T.; SERRANO, A.M.; KABUKI, D.Y. Comparison of Two Plating Media for the Isolation of *Listeria* spp. from some Brazilian Dairy and Meats Products. *Revista de Microbiologia*, v. 52, n.4, p.689-695. 1992.

DI GIACOMO, R.F.; KOEPESELL, T.D. Sampling for Detection of Infection or Disease in Populations. *Journal American Veterinary Medical Association*, v.189, p.22-23. 1986.

DONKER-VOET, J. A Sorological Study on Some Strains of *Listeria monocytogenes* Isolated in Michigan. *American Journal of Veterinary Research*, v.20, p. 176-179. 1959.

FADDIN, J.F.M. *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bactérias de Importancia Clínica*. Buenos Aires: Panamericana, 1985. 301 p.

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

FARBER, J.M.; SANDERS, G.W., JOHNSTON, M.A. A Survey of Various Foods for the Presence of *Listeria* species. *Journal of Food Protection*, v.52, n.7, p.456-458. 1989.

FEDERAL REGISTER. *Food Safety and Inspection Service, United State Departament of Agriculture*, v.61, p.144. 1996.

FELÍCIO, P.E. Desdobramento da Qualidade de Carne Bovina. *Higiene Alimentar*. São Paulo, v.12, n.54, mar/abr. 1998.

FERREIRA, M.G.A.B.; SOBRINHO, A .J.C. Avaliação da Qualidade Bacteriológica das Carnes Bovina Moída e Suína (Pernil) “In Natura” e/ou Refrigerada, em Supermercados, Frigoríficos e Feiras Livres do Município de São Luís, MA. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v.17, n.104/105, p. 87-93, jan/fev. 2003.

FLORENTINO, E.R.; et al. Avaliação da Qualidade Microbiológica da Carne Moída Comercializada em Campina Grande- PB. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 11, n.47, jan/fev. 1997.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Microrganismos Patogênicos de Importância em Alimentos. In: *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 1996, cap.4, p. 33 –82, 182p.

FRANCO,R.M. *Escherichia coli: Ocorrência em Suínos Abatidos na GrandeRio e sua Viabilidade Experimental em Lingüiça Frescal Tipo Toscana*. Niterói-RJ.2002. 153f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense, UFF, Niterói.2002

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. *Microbiologia de los Alimentos*. Zaragoza: Acribia, 1993.

FSIS. Food Safety and Inspection Service. United States Departament of Agriculture.USDA. *Urges consumers to use food thermometer when cooking ground beef patties*. Disponível: <http://www.fsis.usda.gov/OA/news/colorpr.htm>  
Acesso: 18 de dezembro de 2003a.

FSIS. Food Safety and Inspection Service. United States Departament of Agriculture.USDA. *Strengthens Regulations to Reduce Listeria monocytogenes in Ready-to-Eat Meat and Poultry Products*. Junho, 2003. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov>. Acesso: 18 de dezembro de 2003b.

GERMANO, M.I.S.; GERMANO, P.M.L. *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. São Paulo: Varela. 2001, 629p., parte 12, p. 217-227.

GERMANO, et. al. Manipuladores de Alimentos: Capacitar? É Preciso. Regulamentar? Será Preciso??? *Higiene Alimentar*. São Paulo, v. 14, n. 78/79, nov./dez. 2000.

GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; TARELLI, G.T. Inhibition of *Listeria innocua* in Milk by Bacteriocin Producing *Enterococcus faecium* 7C5. *Journal of Food Protection*, v. 58, n. 6, p. 621-623. 1995.

GODOY, C.V.F. Listeriose. In: VERONESSI, R. *Doenças Infeciosas e Parasitárias.*, 8 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 1082p., cap. 62, p.477 – 478.

GOMES, T.AT.; TOLEDO, M.R.F., TRABULSI, L.R. Genética Bacteriana. In: TRABULSI, L.R. *Microbiologia*. 2ed. Rio de Janeiro, São Paulo: Atheneu, 1989, 368p. cap. 4, p.25-35.

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-RJ. 111f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense, UFF, Niterói, 1998.

GUERRA, M.M.M.; BERNARDO, F.M.A Ocorrência Natural de *Listeria* spp. em Queijos Alentejanos (Portugal). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. v. XCIV, n. 531, p. 142-147, jul/set. 1999.

HEUVELINK, AE.; WERNARS, K.; BOER, E. Occurrence of *Escherichia coli* O157 and Other Verocytotoxin-Producing *E. coli* in Retail Raw Meats in Netherlands. *Journal of Food Protection*. v. 59, n.12, p. 1267-1271. 1996.

HOBBS, B.C; ROBERTS, D. *Toxinfecções e Controle Higiênico - Sanitário de Alimentos*. São Paulo: Varela. Parte I, cap 3, p. 25 –47. 1992.

HOFER, E. Isolamento e caracterização de *Listeria monocytogenes* em água de esgoto. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro, v.73, n.1/2, p.31-38. 1975.

HOFER, E.; PESSOA, G.V.A; MELLES, C.E.A Listeriose Humana. Prevalência dos sorotipos de *Listeria monocytogenes* isolados no Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.44, n.2, p.125-131. 1984.

HOFER, E.; PÓVOA, M.M. Pesquisa de *Listeria* em solos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro, v. 79, n.1, p. 45-53. 1984.

INTERLAB. *Internews Industrial.Listeria – Um inimigo silencioso*. Ano II, n.3, 1 sem. 2002. Disponível em: [www.interladist.com.br/ind\\_htm/internws\\_ind\\_3.htm](http://www.interladist.com.br/ind_htm/internws_ind_3.htm)  
Acesso: outubro 2003.

JOHNSON, J.L.; DOYLE, M.P.; CASSENS, R.G. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in Meat and Meat Products – a Review. *Journal of Food Protection*, v.53, n.1, p. 81-91. 1990.

LAGE, M.E. *Ocorrência de Listeria spp em Carne de Frango no Mercado da Cidade de Belo Horizonte, MG*.1993. 85f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte.1993

LAWRENCE, L.M.; GILMOUR, A . Incidence of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environment and in poultry products and their rapid conformation by multiples PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, v.60, n.12, p. 4.600 – 4.606. 1994.

LEITE, C.Q.F.; VALENTINI, S.R.;FALCÃO, D.P. Pesquisa de Enteropatógenos em Alimentos Cárneos Crus. *Ciência e Tecnologia de Alimentos (SBCTA)*.Campinas, v.8, n.2, p.115-227, jul/dez. 1988.

LEMAÎTRE, J.P.; et al. Plasmid-Mediated resistance to Antimicrobial Agents among *Listeriae*. *Journal of Food Protection*. v. 61, n.11, p.1.459-1.464. 1998.

LOGUERCIO, A P.; et al. *Listeria monocytogenes*: Um Importante Patógeno de Origem Alimentar. *Higiene Alimentar*, v.15, n.80/81, p.39-48, jan/fev. 2001

LOVETT, J. Isolation and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. *Food Thecnology*, v. 42, n. 51, p. 172 – 175. 1988.

LOVETT, J. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M.P. *Foodborne bacterial pathogens*. New York: Marcel Deckker, Inc. 1989. cap. 7, p.283-310.

LOVETT, J.; TWEDT, R.M. Bacteria associated with foodborne diseases *Listeria*. *Food Technology*, v.42, n.2, p.188 –191. 1988.

MANO, S.B. *Ê Comportamiento de la Microbiota Natural y Listeria monocytogenes, Aeromonas hydrophila y Yersinia enterocolitica em Carne Envasada en Atmosferas Modificadas*. Madrid, 1997. 225f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidad Complutense de Madrid. Madrid. 1997.

MARTH,E.H. Disease characteristics of *Listeria monocytogenes*. *Food Technology*, v. 42, n. 51, p. 165 –168. 1988.

MARTIN, S.W.; MEEK, AH.; WILLEBERG, P. *Veterinary Epidemiology- Principles and Methods*. Iowa State University Press: Anes, Iowa,1987.343p.

MARTINIS, E. C. P.; et al. Influence of pH, Salt, and Temperature on Nisin Resistance in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, v. 60, n. 4, p. 420-423. 1997.

MARTINS, S.C.S.; et al. “Sreening” de linhagens de *Escherichia coli* multiresistentes a antibióticos, em alimentos de origem animal no estado do Ceará, Brasil. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v.17, n.104/105, p.71-76, jan/fev. 2003.

MC CLAIN, D.; LEE, W.H. Desenvolpente of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. *Journal of the Association of Official Analytical Chemistis*. v.71, n.3, p.660-664.1988.

MEHLMAN,I.J.; LOVETT,J. Enteropathogenic *Escherichia coli*. In: *Bacteriological Analytical Manual*. Food and Drug Administration. Virginia.U.S. 4 ed., p.6-01.1984.

MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, M.P. Pathogenic *Escherichia coli*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K.. *Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods*. 4 ed., Washington: APHA, 2001, cap. 35, p. 331- 341.

MENG, J.; et al. Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM Isolated from Animals, Food, and Humans. *Journal of Food Protection*. v.61, n.11, p.1511-1514. 1998.

MERCK. *Microbiology Manual Cultura Media*. Dormstadt, Germany, 405p. 1996.

MERCK. Diagnóstico rápido de *E. coli* com os Meios de Cultura Fluorocult. 2000.

MESQUITA, AJ. Bactérias do Gênero *Listeria* em Carne e Água Residuária de Lavagem de Carcaça de um Matadouro Frigorífico e em Carne Bovina Moída Comercializada na Cidade de Goiânia, Goiás. São Paulo, 1990, 142p.(Tese de Doutorado). Disponível em: <http://dedalus.usp.br>. Acesso: abril 2004.

MICHANIE, S. *Escherichia coli* O157:H7 – La Bacteria que Disparó el HACCP en la Industria de Carne. *Revista de la Unión de la Industria Carnica Argentina*. año 4, n.17, p.40-42, set. 2003.

MILLER, A . J.; et al. Use of risk assessment to reduce listeriosis incidence. *Food Technology*, v. 51, n.4, p. 100 – 103. 1997.

MILLER, L.G.; KASPAR, C.W. *Escherichia coli* O157:H7 Acid Tolerance and Survival in Apple Cider. *Journal of Food Protection*, v.57, n.6, p.460-464. 1994.

MING, X.; et al. Bacteriocins Applied to Food Packaging Materials to Inhibit *Listeria monocytogenes* on Meats. *Journal of Food Science*, v. 62, n.2, p.413-415. 1997.

MIOKO, J.; FRANCO, B.D.G.M.. Freqüência de Isolamento de Cepas de *Escherichia coli* Patogênica em Alimentos de Origem Animal. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* , v.11, n.2, p.170-181. 1991.

MOTTA, M. R. A; BELMONTE, M. A; PANETTA, J. C.. Avaliação microbiológica de amostras de carne moída comercializada em supermercados da região oeste de São Paulo. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v.14, n.78/79, p.59-62, nov./dez. 2000.

MURIANA, P.M. Bacteriocins for control of *Listeria spp.* in food. *Journal of Food Protection*, Supplement, p. 54 – 63. 1996.

NASCIMENTO, M.G.F.; CULLOR, J.S. Listeriose Humana – Epidemiologia e Fontes de Contaminação. *Higiene Alimentar*, v.8, n.32, p.13 – 17, jul. 1994.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Test. v. 10, n. 7, abr. 1990.

OLIVEIRA, A.N. *Bactérias do Gênero Listeria em Leite e derivados no Comércio Varejista de Goiânia – Goiás*. 101f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte. 1993.

OLIVEIRA, L.A.T.; FERREIRA, T.; FRANCO, R.M.; CARVALHO, J.C.A.P. Enumeração de *Escherichia coli* e *Enterococcus* em amostras de hambúrguer de frango, comercializadas em Niterói- RJ. Avaliação da sensibilidade a antimicrobianos das cepas isoladas. *Higiene Alimentar*, v.13, n.63, p.49-55. 1999.

OLIVEIRA, N.M.S.; NASCIMENTO, L.C.; FIORINI, J.E. Isolamento e Identificação de Bactérias Facultativas Mesófilas em Carnes Frescas Bovinas e Suínas. *Higiene Alimentar*, v. 16, n. 91, p.68-74, mar. 2002.

OXOID. *Selective Microbiology for Food & Dairy Laboratories*. Quality Culture Media. Inglaterra. fev., 36p. 1991.

PATOLOGIA. *Nós e a Radiação*. Patógenos e Doenças do Trato Gastrointestinal. *Escherichia coli* O157:H7 – Enterohemorrágica (EHEC).

Disponível em: <http://www.nuclear.radiologia.nom.br/trabalho/estudo/patology/patogeno/eschcoli.htm>

Acesso: nov.2003

PEREIRA, M.L.; ROCOURT, J. *Listeria monocytogenes* – Uma Revisão sobre Aspectos Taxonômicos, Importância Médica e em Alimentos. *Higiene Alimentar*, v. 7, n. 26, p. 5- 12, jun. 1993.

PETRI, C.M.; ANTUNES, L.A .F.; SARIDAKIS, H.O . *Escherichia coli* em Produtos Carneos Comercializados em Londrina – PR. Frequência de *Escherichia coli* Enteropatogênica Clássica (EPEC). *Revista Microbiologia*, São Paulo, v. 20, n.4, p.421-426, out/dez. 1989a.

PETRI, C.M.; ANTUNES, L.A .F.; SARIDAKIS, H.O . *Escherichia coli* em Produtos Carneos Comercializados em Londrina – PR. Frequência de *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC). *Revista Microbiologia*, São Paulo, v. 20, n.4, p.427-431, out/dez. 1989b.

PICCHI, V.; et al. Isolamento e Identificação de *Listeria* spp em quartos dianteiros de bovino desossados.

Disponível em: <http://www.bichoonline.com.br/artigos/ha0017.htm>

Acesso: out. 2003.

PIGATTO, C.P.; BARROS, A R. Qualidade da Carne Moída Bovina Resfriada, Comercializada em Açougues da Região de Curitiba. *Higiene Alimentar*, v. 17, n. 108, p. 53- 57, mai. 2003.

PROBAC DO BRASIL. *Produtos Bacteriológicos Ltda*. Meios para identificação de enteropatógenos. Soros para identificação bacteriana. São Paulo. Brasil. 1998.

PROTESTE. Carnes moídas, muitas vezes sem higiene. *PROTESTE*: Associação Brasileira de Defesa do Consumidor, ano II, n.20, nov., 2003. Disponível em: [www.proteste.org.br](http://www.proteste.org.br). Acesso: dezembro, 2003.

RIJPENS, N.C.; et al. Incidence of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat chicken and turkey products determined by polymerase chain reaction and line probe assay hybridization. *Journal of Food Protection.*, v.60, n.5, p. 548 –550. 1997.

RITTER, R; SANTOS, D.; BERGMANN, G.P. Contaminação Bacteriana da Carne Moída Bovina Comercializada em Bancas do Mercado Público de Porto Alegre, RS. *Higiene Alimentar*, v.15, n. 85, p. 50- 56, jun. 2001.

ROBERTS, M.C.; FACINELLI, B.; GIOVANNETTI, E.; VARALDO,P. Transferable erythromycin resistance in *Listeria ssp* isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, n.1, p.269-270. 1996.

ROBERTS, W.T.; WEESE, J.O. Shelf Life of Ground Beef Patties Trated by Gamma Radiation. *Journal of Food Protection*, v.61, n. 10, p. 1387-1389. 1998.

RYSER, E.T.; DONNELLY, C.W. In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Listeria*. 4 ed., Washington: APHA, 2001. 1912 p., cap.36 , p.343-354.

RYSER, E.T.; MARTH, E.H. In: *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. Incidence and Behavior of *Listeria monocytogenes* in Meat Products. New York. 1991. 632p., cap. 11, p. 405-462.

SALLAM, S.S.; DONNELLY, C.W. Destruction, injury and repair of *Listeria spp* exposed to sanitizing compounds. *Journal of Food Protection*, v. 55, n. 10, p. 771 - 776. 1992.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R.M. Patógenos Emergentes Relacionados à Contaminação de Alimentos de Origem Animal. *Biológico*, São Paulo, v.64, n.2, p.123-127, jul/dez. 2002.

SCHLECH III, W.F. Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes*. *Food Technology*, p. 176 –178, abr. 1988.

SCHROEDER, C.M.; et al. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* O157 Isolated from Humans, Cattle, Swine, and Food. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n.2, p.576-581, fev. 2002.

SEELIGER, H.P.H.; HÖHNE,K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. *Methods Microbiology*, v.13, p.31-49, 1979.

SEELIGER, H. P. R.; JONES, D. Genus *Listeria*. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S., SHAPE, M.E. *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*. 9ed. Baltimore: Williams & Wilkins.,1986, v.2, p. 1235 -1245.

SILVA, N.; et al. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*.São Paulo: Varela. 1997,p. 149-151.

SILVA, M.C.C. *Ocorrência de Listeria spp em Embutidos Carneos Artesanais Comercializados no Mercado Varejista da Cidade de Contagem, MG*.1996. 76f.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte.1996

SILVA,M.C.D.; TIBANA, A . *Listeria monocytogenes* em Alimentos: seu Significado nos Dias Atuais. *Higiene Alimentar*, v. 9, n.38, p. 7 – 10. 1995.

TODAR, K. *Listeria monocytogenes* and *Listeriosis*. *Todar's On line Textbook of Bacteriology*. University of Wisconsin- Madison. Department of Bacteriology. 2003. Disponível em : <http://textbookofbacteriology.net/Listeria.html>  
Acesso: jan.2004.

TOLEDO, M.R.F; FONTES, C.F; TRABULSI, L.R. Mili – Um Meio para Realização dos Testes de Motilidade, Indol e Lisina Descarboxilase. *Revista de Microbiologia*. v.13, n.3, p.230-235, jul/set. 1982a.

TOLEDO, M.R.F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L.R. EPM- Modificação do Meio de Rugai e Araújo para a Realização Simultânea dos Testes de Produção de Gás A Partir da Glicose, H<sub>2</sub>S, Urease e Triptofano Desaminase. *Revista de Microbiologia*, v.13, n.4, p.309-315, out/dez. 1982b.

TRABULSI, L.R. Controle Laboratorial do Tratamento das Infecções Bacterianas. In: *Microbiologia*. 2ed. Rio de Janeiro, São Paulo: Atheneu, 1989. 386p. cap.14, p.91-94.

TRABULSI, L.R. Bactéria Encontrada no Hambúrguer Pode ser Mortal. Agência USP de Notícias, São Paulo, n. 389/99, abr. 1999.

TRABULSI, L.R; TOLEDO, M.R.F. *Escherichia*. In: TRABULSI, L.R. *Microbiologia*. 2ed. Rio de Janeiro, São Paulo: Atheneu, 1989. 386p. cap.26, p.149-155. 1989a.

TRABULSI, L.R.; TOLEDO, M.R.F. Resistência Bacteriana a Droga. In: TRABULSI, L.R. *Microbiologia*. 2ed. Rio de Janeiro, São Paulo: Atheneu, 1989. 386p. cap.13, p.86-89. 1989b.

UBOLDI EIROA, M.N. *Listeria monocytogenes* – Características, Ocorrência e Desenvolvimento em Alimentos. *ITAL*. Campinas, v.20, n.1, p.13-22, jan/jun.1990.

VARNMAM, A H.; EVANS, M.G. *Listeria monocytogenes*. In: *Foodborn Pathogens AN. Illustrated Text*. Manson Publishing LTA: Londres,1996, 557p., cap. 16, p.327-345. 1996a.

VARNMAM, A H.; EVANS, M.G. *Escherichia coli*. In: *Foodborn Pathogens AN. Illustrated Text*. Manson Publishing LTA: Londres,1996, 557p., cap. 6, p.101-128. 1996b.

WONG, H.C.; CHAO, W.L., LEE. S.J. Incidence and Characterization of *Listeria monocytogenes* in Foods Available in Taiwan. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, n.10, p.3101-3104. 1990.

## 8 APÊNDICES

**TABELA 1-** Número de cepas de *Listeria* spp. isoladas das amostras de carne (alcatra) inteira e carne (alcatra) moída

Amostra	L.i. 6a	L.i. 6b	L.i. rug.	L.i. não tip.	L.m. 4b	L.m.1/2 b	Total
C.I.	34 (37,36%)	4 (36,36%)	1 (100%)	15 (83,33%)	13 (28,89%)	5 (71,43%)	72 (41,62%)
C.M.	57 (62,64%)	7 (63,64%)	0 (0%)	3 (16,67%)	32 (71,11%)	2 (28,57%)	101 (58,38%)
Total	91	11	1	18	45	7	173

CI = Carne Inteira

CM = Carne Moída

L.i. 6a = *Listeria innocua* 6aL.i.6b= *Listeria innocua* 6bL.i.rug. = *Listeria innocua* rugosaL.i. não tip. = *Listeria innocua* não tipávelL.m.4b= *Listeria monocytogenes* 4bL. m. 1/2b = *Listeria monocytogenes* 1/2b**TABELA 2-** Número de cepas isoladas de acordo com o meio de enriquecimento das amostras de carne inteira e moída.

Enriquecimento	<i>Listeria spp</i>		Total
Primário	10 I (58,82%)	7 M (41,18%)	17
secundário	62 I (39,74%)	94 M (60,26%)	156

I= inteira

M= moída

**TABELA 3** - Valores médios de isolamentos de cepas de *Listeria* spp. em amostras de carne bovina (alcatra) inteira e moída

<b>Tratamento</b>	<b>cepa 1</b>	<b>cepa 2</b>	<b>cepa 3</b>	<b>cepa 4</b>	<b>cepa 5</b>	<b>cepa 6</b>
Inteira	1,13 <sup>a</sup>	0,13 <sup>a</sup>	0,03 <sup>a</sup>	0,50 <sup>a</sup>	0,17 <sup>a</sup>	0,43 <sup>a</sup>
Moída	1,90 <sup>a</sup>	0,23 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,10 <sup>a</sup>	0,07 <sup>a</sup>	1,07 <sup>a</sup>

cepa 1 = *Listeria innocua* 6a  
 cepa 2 = *Listeria innocua* 6b  
 cepa 3 = *Listeria innocua* rugosa  
 cepa 4 = *Listeria innocua* não tipável  
 cepa 5 = *Listeria monocytogenes* 1/2b  
 cepa 6 = *Listeria monocytogenes* 4b

**TABELA 4** - Valores médios de isolamentos de cepas de *Listeria* spp. quanto ao enriquecimento primário e secundário aos enriquecimentos primários e secundários utilizados na metodologia

<b>Fatores</b>	<b>cepa 1</b>	<b>cepa 2</b>	<b>cepa 3</b>	<b>cepa 4</b>	<b>cepa 5</b>	<b>Cepa 6</b>
Primário	0,33 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,03 <sup>a</sup>	0,10 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,10 <sup>a</sup>
Secundário	2,70 <sup>b</sup>	0,37 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,50 <sup>a</sup>	0,23 <sup>a</sup>	1,40 <sup>a</sup>

Médias na mesma coluna seguidas com letras diferentes diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

cepa 1 = *Listeria innocua* 6a  
 cepa 2 = *Listeria innocua* 6b  
 cepa 3 = *Listeria innocua* rugosa  
 cepa 4 = *Listeria innocua* não tipável  
 cepa 5 = *Listeria monocytogenes* 1/2b  
 cepa 6 = *Listeria monocytogenes* 4b

**TABELA 5** – Comportamento das cepas de *Listeria* spp. isoladas frente aos antimicrobianos

<b>Listeria</b>	<b>PEN</b>	<b>OXA</b>	<b>TEC</b>	<b>VAN</b>	<b>ERI</b>	<b>CLI</b>	<b>CRO</b>	<b>AMP</b>	<b>CFL</b>	<b>CFO</b>	<b>GEN</b>	<b>TET</b>
<i>monocytogenes</i> 1/2b	3R/3	3R/3	1I/3 2R/3	3R/3	3R/3	3R/3	3R/3	3R/3	3R/3	3R/3	1S/3 1I/3 1R/3	3R/3
<i>monocytogenes</i> 4b	16R/16	16R/16	5S/16 1I/16 10R/16	7S/16 9R/16	16R/16	3I/16 13R/16	16R/16	16R/16	16R/16	16R/16	16R/16	16R/16
<i>innocua</i> 6a	6R/6	6R/6	6R/6	6R/6	6R/6	6R/6	6R/6	6R/6	1S/6 5R/6	6R/6	1S/6 5R/6	1S/6 5R/6
<i>innocua</i> 6b	6R/6	6R/6	6R/6	6R/6	6R/6	6R/6	6R/6	6R/6	6R/6	6R/6	1S/6 5R/6	6R/6
<i>innocua</i> rugosa	1R/1	1R/1	1R/1	1R/1	1R/1	1R/1	1R/1	1R/1	1R/1	1R/1	1R/1	1R/1
<i>innocua</i> não tipável	6R/6	6R/6	6R/6	6R/6	6R/6	6R/6	1I/6 5R/6	6R/6	6R/6	6R/6	1S/6 5R/6	1S/6 5R/6

R = resistente

I = intermediária

S = sensível

Resultado/amostras analisadas

PEN= Penicilina; OXA= Oxacilina; TEC= Teicoplanina; VAN= Vancomicina; ERI= Eritromicina; CLI= Clindamicina; CRO= Ceftriaxona;

AMP= Ampicilina; CFL= Cefalotina; CFO= Cefoxitina; GEN= Gentamicina; TET= Tetraciclina.

**TABELA 6** - Resultados das análises de NMP pelo método 1 de amostras de carne (alcatra) inteira (CI) e carne moída (CM)- Enumeração de *Escherichia coli*.

<b>MÉTODO 1</b>				
<b>Amostras</b>	<b>Coliformes a 35°C</b>		<b>Coliformes a 45°C</b>	
	<b>C.I.</b>	<b>C.M.</b>	<b>C.I.</b>	<b>C.M.</b>
1	2,3x10 <sup>5</sup>	7,0x10 <sup>6</sup>	0	0,4x10
2	4,0x10 <sup>3</sup>	4,0x10 <sup>6</sup>	0	0
3	4,6x10 <sup>4</sup>	1,1x10 <sup>4</sup>	2,3x10	4,3x10
4	7,5x10 <sup>5</sup>	2,0x10 <sup>6</sup>	7,5x10	3,0x10 <sup>5</sup>
5	4,6x10 <sup>4</sup>	1,1x10 <sup>6</sup>	0,4x10	2,8x10
6	4,6x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>5</sup>	0	7,5x10
7	2,4x10 <sup>5</sup>	1,5x10 <sup>5</sup>	2,1x10 <sup>2</sup>	1,1x10 <sup>3</sup>
8	1,5x10 <sup>4</sup>	1,1x10 <sup>6</sup>	0	2,3x10
9	4,6x10 <sup>5</sup>	2,1x10 <sup>7</sup>	2,4x10 <sup>2</sup>	1,5x10 <sup>2</sup>
10	4,6x10 <sup>5</sup>	2,1x10 <sup>6</sup>	2,1x10 <sup>2</sup>	4,6x10 <sup>2</sup>
11	1,1x10 <sup>6</sup>	2,5x10 <sup>7</sup>	2,4x10 <sup>3</sup>	4,6x10 <sup>4</sup>
12	1,5x10 <sup>4</sup>	4,4x10 <sup>4</sup>	1,5x10	1,1x10 <sup>3</sup>
13	9,0x10 <sup>3</sup>	2,8x10 <sup>5</sup>	2,4x10 <sup>2</sup>	4,6x10 <sup>4</sup>
14	2,4x10 <sup>4</sup>	4,4x10 <sup>3</sup>	0,9x10	0,4x10
15	6,4x10 <sup>4</sup>	2,0x10 <sup>7</sup>	4,3x10	2,4x10 <sup>2</sup>

CI = carne inteira

CM = carne moída

**TABELA 7** - Valores médios de NMP de coliformes a 35°C e coliformes a 45°C em amostras de carne bovina (alcatra) inteira e moída.

<b>Tratamento</b>	<b>C35°C</b>	<b>C45°C</b>
Inteira	4,80 <sup>b</sup>	1,36 <sup>b</sup>
Moída	5,89 <sup>a</sup>	2,38 <sup>a</sup>

Médias na mesma coluna seguidas com letras diferentes diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

C35°C = Coliformes a 35°C

C45°C = Coliformes a 45°C

**TABELA 8** - Número de colônias de *Escherichia coli* isoladas de amostras de carne bovina (alcatra) pelo método 2

Tipo de Amostra	Nº. Total de Colônias Confirmadas	Nº. de UFC de <i>E.coli</i> pertencentes a categoria das			Total
		EPEC	EHEC	EIEC	
Carne inteira	110 (49,33%)	23 (44,23%)	1 (100%)	3 (37,50%)	27 (44,26%)
Carne moída	113 (50,67%)	29 (55,77%)	0 (0%)	5 (62,50%)	34 (55,74%)
<b>Total</b>	<b>223</b>	<b>52</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>61</b>

**TABELA 9** - Número de colônias de *Escherichia coli* isoladas de amostras de carne bovina (alcatra) pelo método 3

Tipo de Amostra	Nº. Total de Colônias Confirmadas	Nº. de UFC de <i>E.coli</i> pertencentes aos grupos sorológicos			Total
		EPEC	EHEC	EIEC	
Carne inteira	12 (42,86%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)	1 (50%)
Carne moída	16 (57,14%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)	1 (50%)
<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>2</b>

**TABELA 10** - Valores médios de isolamento de cepas de *E. coli* de amostras de carne bovina (alcatra) quanto ao fator tratamento (inteira e moída)

Tratamento	cepa 1	cepa 2	cepa 3
Inteira	0,77 <sup>a</sup>	0,13 <sup>a</sup>	0,03 <sup>a</sup>
Moída	0,97 <sup>a</sup>	0,20 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>

cepa 1= EPEC  
 cepa 2= EIEC  
 cepa 3= EHEC

**TABELA 11** - Valores médios de cepas de *E. coli* oriundas de amostras de carne bovina (alcatra) inteira e moída quanto ao fator método de isolamento 2 e 3.

<b>Fatores</b>	<b>cepa 1</b>	<b>cepa 2</b>	<b>cepa 3</b>
Método 2	1,73 <sup>a</sup>	0,27 <sup>a</sup>	0,03 <sup>a</sup>
Método 3	0,00 <sup>b</sup>	0,07 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>

Médias na mesma coluna seguidas com letras diferentes diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

cepa 1= EPEC  
 cepa 2= EIEC  
 cepa 3= EHEC

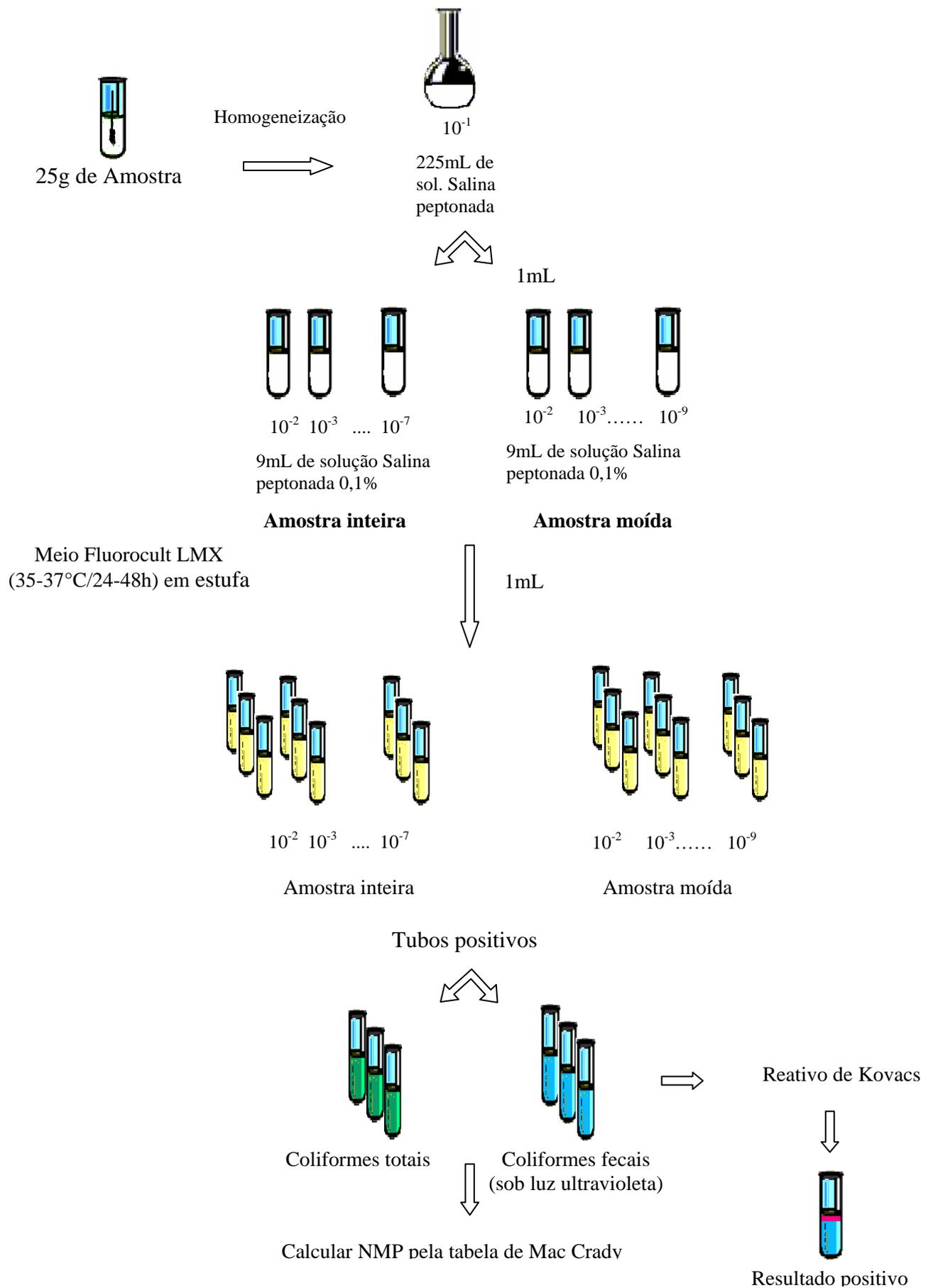
**TABELA 12** - Sorogrupos Indicadores de *Escherichia coli* considerados patogênicos isolados de meios de cultura seletivos

Meios de Cultura	SOROGRUPOS															Total
	EPEC A			EPEC B				EPEC C		EIEC A			EIEC B	EIEC C	EHEC	
	0111	055	0119	0142	0125	0158	0114	0128	086	0144	028ac	029	0143	0112a	O157	
<b>EMB</b>	1	1	1	8	5	1	1	1	1	0	1	1	2	0	0	24 (38,09%)
<b>Mac Lact</b>	2	1	0	5	1	0	0	0	2	0	1	1	0	0	0	13 (20,63%)
<b>SS</b>	2	1	0	14	3	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	24 (38,09%)
<b>Mac Sorb</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0%)
<b>0157 H7</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2 (3,17%)
<b>Total</b>	5	3	1	27	9	1	1	2	3	1	3	3	2	1	1	63

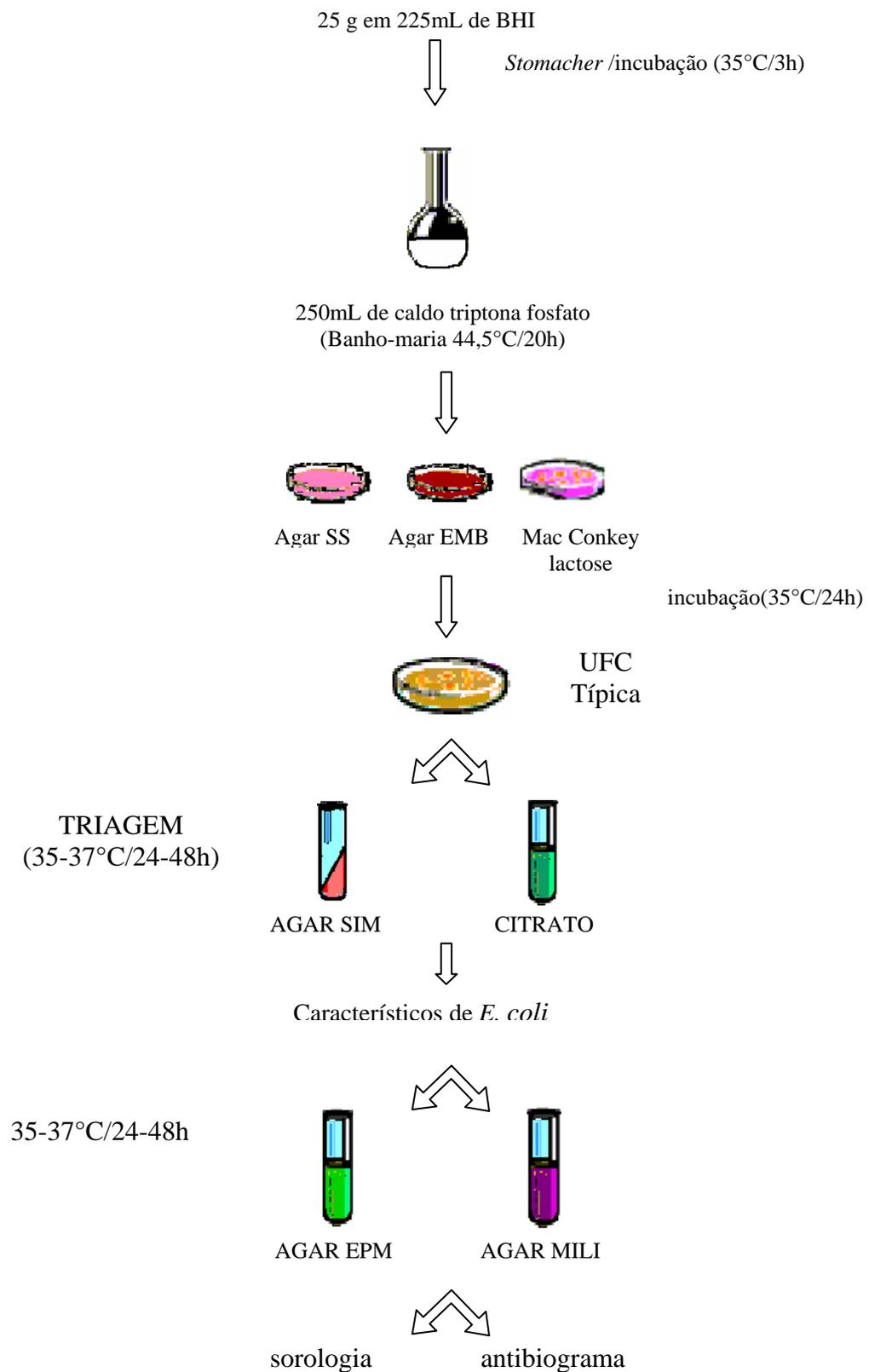
**TABELA 13** - Comportamento das cepas de *E. coli* isoladas e sorotipadas como patogênicas frente aos antimicrobianos

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Nº. cepas resistentes</b>	<b>Nº. cepas intermediárias / Moderada / Sensível</b>	<b>Nº. cepas sensíveis</b>
Cloranfenicol (CLO)	36 (7,55%)	9 (9,68%)	18 (9,68%)
Aztreonam (ATM)	27 (5,66%)	17 (18,28%)	19 (10,21%)
Sulfazotrim (SUT)	40 (8,38%)	8 (8,60%)	15 (8,06%)
Ceftadizima (CAZ)	44 (9,22%)	1 (1,07%)	18 (9,68%)
Cefotaxima (CTX)	25 (5,24%)	19 (20,43%)	19 (10,21%)
Amicocina (AMI)	48 (10,06%)	5 (5,38%)	10 (5,38%)
Netilmicina (NET)	40 (8,38%)	5 (5,38%)	18 (9,68%)
Ampicilina (AMP)	54 (11,32%)	6 (6,45%)	3 (1,61%)
Cefalotina (CFL)	53 (11,11%)	4 (4,30%)	6 (3,22%)
Cefoxitina (CFO)	40 (8,38%)	3 (3,22%)	20 (10,75%)
Gentamicina (GEN)	39 (8,18%)	4 (4,30%)	20 (10,75%)
Tetracilina (TET)	31 (6,50%)	12 (12,90%)	20 (10,75%)

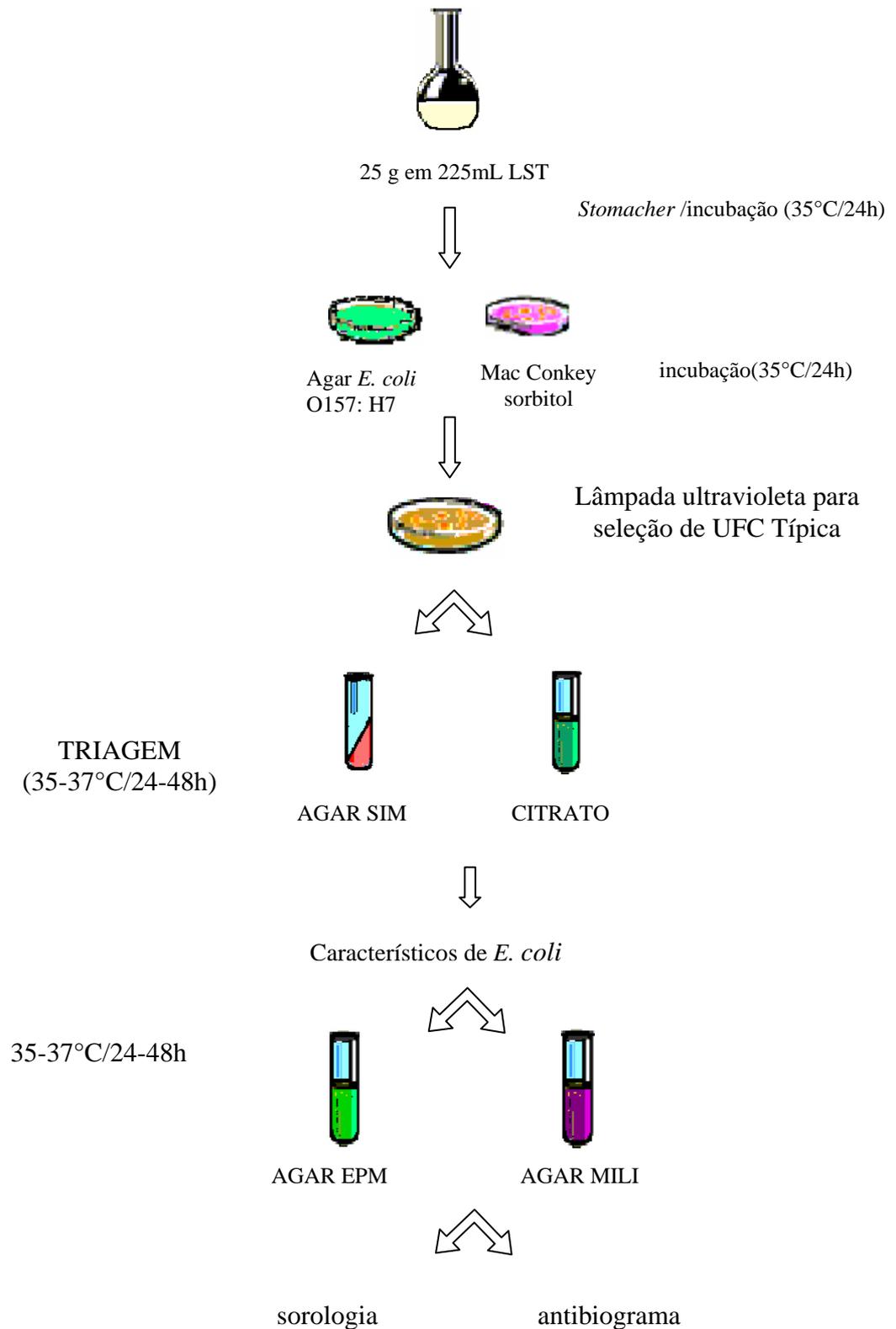
**Figura 1-** Isolamento de *Listeria* spp. pelo método USDA



**Figura 2-** NMP de *Escherichia coli* (MERCK, 2000) – **Método 1**



**Figura 3-** Isolamento e identificação de cepas de *E.coli* patogênicas (EIEC, EPEC, EHEC) (Mehlman; Lovett, 1984) **Método 2**



**Figura 4-** Isolamento e identificação de *E.coli* O157:H7 e diferenciação de cepas enterohemorrágicas (EHEC) (MERCK, 1996) – **Método 3**

## 9 ANEXOS

TABELA 14 – Características diferenciais de *Listeria* spp.

	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. gravi</i>	<i>L. murrayi</i>	<i>L. denitrificans</i>
Motilidade	+	+	+	+	+	+	+	+
βhemólise	+a	-	+	-	+b	-	-	-
CAMP-test ( <i>S. aureus</i> )	+c	-	+	-	-	-	-	-
CAMP-test ( <i>R. equi</i> )	-	-	-	-	+	-	-	-
Bile esculina	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Redução do Nitrato	-	-	-	-	-	-	+	+
Hidrólise da uréia	-	-	-	-	-	-	-	-
VM/VP	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-
TSI	a/a	a/a	a/a	a/a	a/a	a/a	a/a	a/a
Glicose O/F	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-	-	+	+	-
Rhamnose	+	V	-	V	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
Xilose	-	-	+	+	+	-	-	+

Fonte: Seeliger e Jones, 1986. V.2, p.1241; Lovett, 1988. p. 175.; Ryser; Donnelly, 2001, p. 352.

a) Nem todas as cepas de *L. monocytogenes* exibem β-hemólise

b) Grandes zonas de hemólise são usualmente exibidas pelas cepas de *L. ivanovii*

c) Das 30 cepas listadas, ATCC15313, não dá reação positiva

a/a – superfície ácida/ base ácida

V – variável

O/F – oxidação e fermentação

**TABELA 15** – Características bioquímicas úteis na diferenciação dos gêneros *Brochothrix*, *Erysipelothrix*, *Listeria*, *Lactobacillus* e *Kurthia*.

Gênero	motilidade	Oxigênio	Crescimento a 35°C	Catalase	H <sub>2</sub> S	Glicose/ácido
<i>Brochothrix</i>	-	Facultativo	-	+d	-	+
<i>Erysipelothrix</i>	-	Facultativo	+	-	+	+
<i>Listeria</i>	+a	Facultativo	+	+	-	+
<i>Lactobacillus</i>	-b	Facultativo	+	-e	-	+
<i>Kurthia</i>	+c	Aeróbio	+	+	-f	-

Fonte: Seeliger e Jones, 1986. p.1239.

- a) Todas as cepas são móveis a 20/25°C, porém são poucos móveis ou imóveis a 37°C
- b) A maioria das cepas é móvel, mas algumas cepas móveis podem ocorrer.
- c) A maioria das cepas é móvel, mas algumas cepas imóveis podem ocorrer.
- d) A produção de catalase depende do meio e da temperatura de incubação
- e) Algumas cepas dão reação de catalase positiva
- f) Produção fraca de H<sub>2</sub>S por algumas cepas.

**TABELA 16** – Sorotipos das espécies de *Listeria*

Espécies	Sorotipo
<i>Listeria monocytogenes</i>	½a, ½b, ½c, 3 a, 3 b, 3 c, 4 a, 4 b, 4 c, 4 d, 4 e, 7
<i>Listeria ivanovii</i>	5
<i>Listeria innocua</i>	6 a, 6 b, 4 ab, não tipável
<i>Listeria welshimeri</i>	6 a, 6 b
<i>Listeria seeligeri</i>	½b, 4 c, 4 d, 6 b, não tipável

FONTE: Lovett J, 1989.

**TABELA 17** – Características bioquímicas identificáveis da *Escherichia coli*

<b>Cepas características</b>	<b><i>E. coli</i> Típica</b>	<b><i>E. coli</i> Invasora</b>	<b><i>E. coli</i> Clássica enteropatogênica</b>	<b><i>E. coli</i> O157:H7</b>
Gás	+	+/-	+/-	+/-
Lactose	+	+/-	+	+
Glicose	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-
1-Triptofano Desaminase	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-
Motilidade	[+]	-	+/-	+/-
Indol	+	+	+	+
1-Lisina Descarboxilase	[+]	-	+	+
Citrato	-	-	-	-

FONTE: dados adaptados de Meng et al. (2001); Probac do Brasil (1998) e Silva et al. (1997).

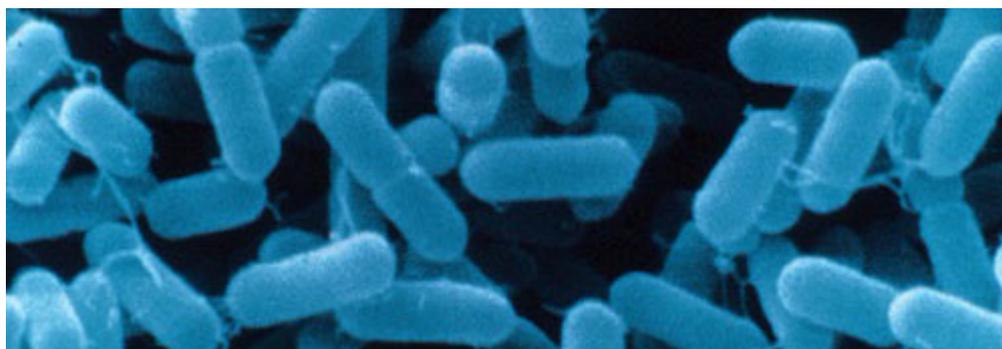
O/F: oxidação e fermentação

+ :reação ou crescimento positivos

-: reação ou crescimento negativos

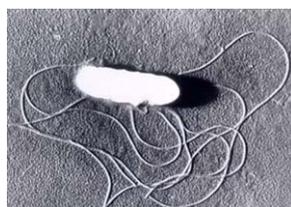
[+]: 76%-98% das cepas são positivas

**Figura 5** - *Listeria* spp.; Microscopia eletrônica



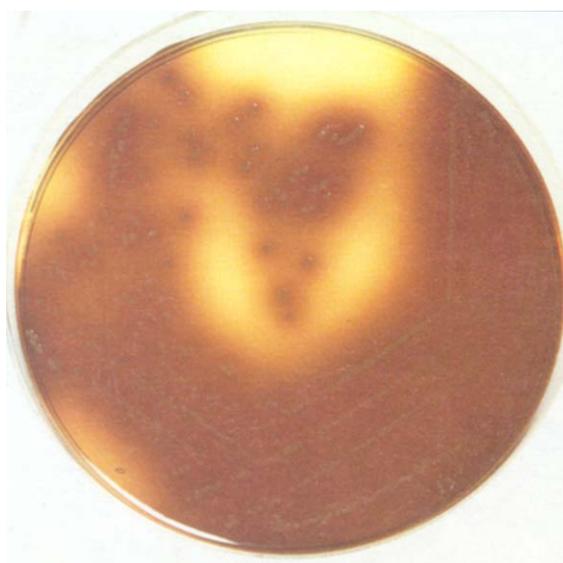
Fonte: Todar, 2003.

**Figura 6** - *Listeria* spp. com presença de flagelos peritríquios (microscopia eletrônica)



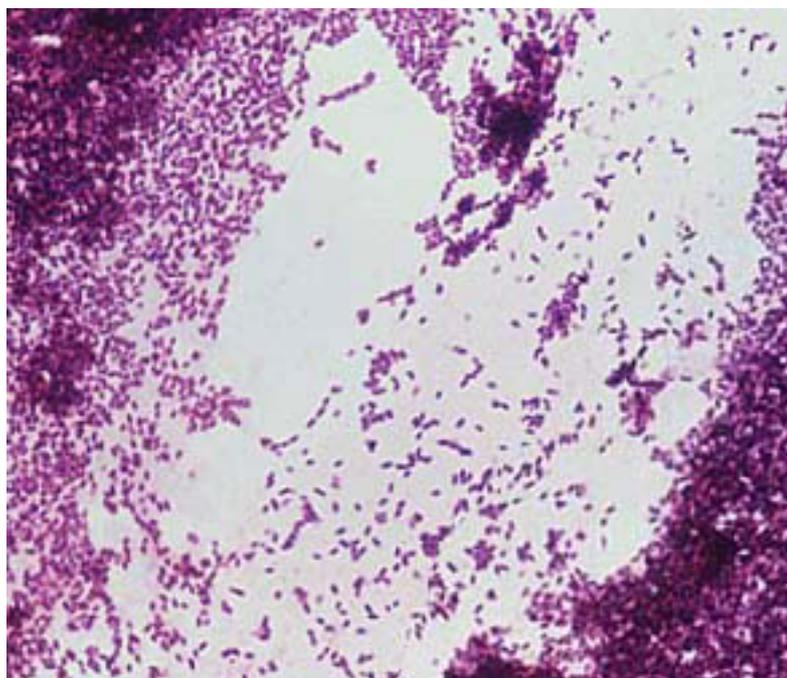
Fonte: Todar, 2003.

**Figura 7** - Colônias de *Listeria* spp. em placas contendo ágar MOX



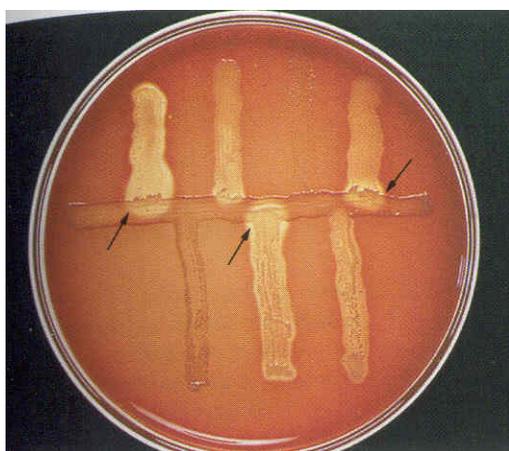
Fonte: MERCK, 1996.

**Figura 8** - *Listeria* spp.; coloração de Gram; microscopia óptica.



Fonte: Todar, 2003.

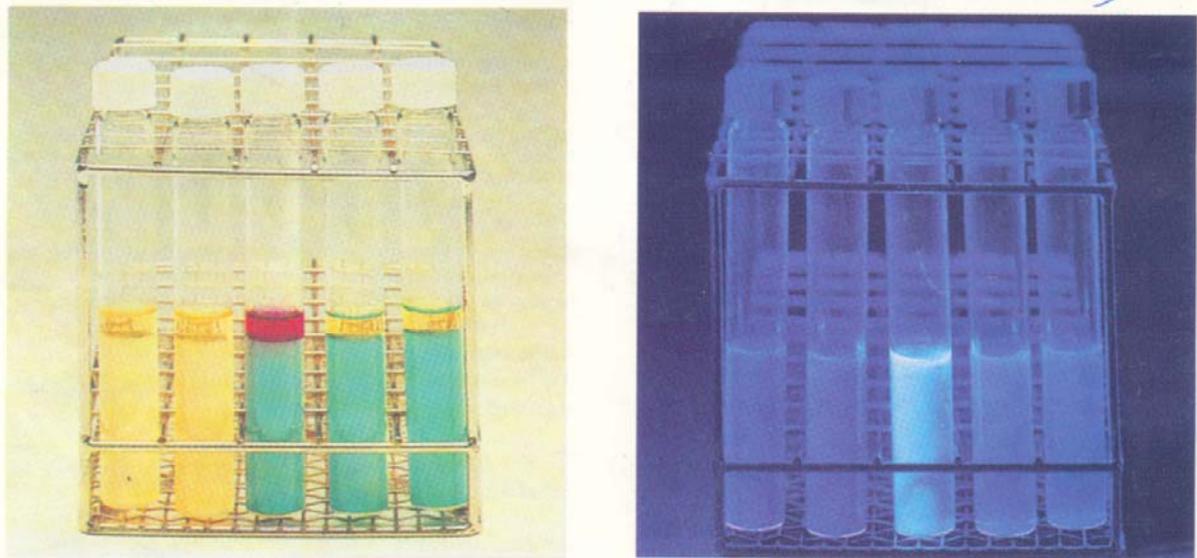
**Figura 9** - CAMP- test. Placa contendo ágar com sangue de carneiro.



Fonte: Varnham; Evans, 1996a.

As zonas mais claras indicam as regiões de hemólise.

**Figura 10** - Caldo Fluorocult com reagente de Kovacs para diagnóstico rápido de *E. coli* e Caldo Fluorocult sob luz UV



1 2 3 4 5

1 2 3 4 5

1+2 = *Salmonella enteritidis*. 3 = *E. coli*. 4 = *Citrobacter freundii*. 5 = *Enterobacter cloacae*

Fonte: MERCK, 2000.

**Figura 11** - Teste de sensibilidade aos antimicrobianos; meio ágar Müller- Hinton

