

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO
TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

SAMIRA PIROLA SANTOS MANTILLA

Listeria spp. EM CARNE BOVINA PRÉ-MOÍDA:
isolamento, sorologia, sensibilidade das cepas aos
antimicrobianos e relação com a presença de sulfito de sódio.

UNIVERSIDADE
FEDERAL
FLUMINENSE

Niterói
2006

SAMIRA PIROLA SANTOS MANTILLA

Listeria spp. EM CARNE PRÉ-MOÍDA BOVINA: isolamento, sorologia, sensibilidade das cepas aos antimicrobianos e relação com a presença de sulfito de sódio.

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: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de P.O.A.

Orientador: Prof. Dr. ROBSON MAIA FRANCO
Co-orientador: Prof. Dr. LUIZ ANTÔNIO TRINDADE DE OLIVEIRA

Niterói
2006

SAMIRA PIROLA SANTOS MANTILLA

Listeria monocytogenes EM CARNE BOVINA MOÍDA: isolamento, sorologia, sensibilidade das cepas aos antimicrobianos e relação com a presença de sulfito de sódio.

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: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de P.O.A.

Aprovada em agosto de 2006

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Robson Maia Franco – Orientador
UFF

Prof.^a Dr.^a Maria da Graça Fichel do Nascimento
Pesquisadora aposentada, EMBRAPA Agroindustrial de Alimentos-CTAA

Prof.^a Dr.^a María Isabel González Alonso
Universidad Complutense de Madrid

Niterói
2006

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ramiro Froilan Mantilla Carrasco e Ângela Maria Santos Mantilla pelo total apoio e incentivo durante a realização do curso de Mestrado, sem os quais não conseguiria realizar este sonho.

Aos irmãos, Camila Pirola Santos Mantilla e Ramiro Santos Mantilla, pela amizade e auxílio prestados.

Ao meu noivo, Alexandre Cordeiro Vieira, pela compreensão e incentivo durante esta importante etapa de minha vida .

Ao professor Orientador Doutor Robson Maia Franco pela total dedicação, paciência e amizade desde a época da graduação até os dias atuais. Agradeço por ter me ensinado o verdadeiro objetivo da pesquisa científica, por todo o conhecimento de microbiologia que me foi passado e por acreditar sempre no meu potencial.

Ao professor Co-orientador Doutor Luiz Antônio Trindade de Oliveira pelo apoio durante a realização da pesquisa.

À professora Doutora Mônica Queiroz dos Santos pelo espaço cedido para a realização das práticas laboratoriais.

Às amigas Érica Barbosa dos Santos e Raquel Gouvêa pela ajuda durante a realização do experimento e confecção da dissertação.

Aos professores Delson Braz e Edgar Francisco Oliveira de Jesus, pela realização do processo de irradiação das amostras de carne moída na COPPE-UFRJ.

Ao médico veterinário Marlon o qual cedeu o sangue desfibrinado de carneiro para realização do teste de hemólise.

Ao pesquisador Dr. Ernesto Hoffer, à bióloga Cristhiane Moura Falavina dos Reis e ao técnico André Victor Barbosa do Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Fundação Oswaldo Cruz, pela realização das análises sorológicas nas cepas de *Listeria* spp. isoladas no presente trabalho.

RESUMO

Foram analisadas 30 amostras de carne bovina pré-moída, provenientes de estabelecimentos comerciais do município de Niterói, RJ, com o objetivo de se detectar a presença de bactérias do gênero *Listeria* e verificar a ocorrência de fraude por adição de sulfito de sódio em carnes frescas. As bactérias isoladas foram submetidas a provas bioquímicas e caracterização sorológica, bem como ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos utilizados rotineiramente no tratamento de infecções ocasionadas por microrganismos Gram-positivos. Testou-se a eficiência dos enriquecimentos primário e secundário no isolamento de *Listeria* spp., e de três meios de plaqueamento. Realizou-se também, experimentação "in vitro" para observar a influência do sulfito de sódio, administrado em diferentes concentrações, no crescimento de *L. monocytogenes* inoculada em carnes irradiadas. Além disso, verificou-se a eficiência do processo de irradiação na eliminação de *L. monocytogenes* 4b, isolada a partir das amostras examinadas utilizando-se três doses: 4, 5,7 e 7 kGy. Das 30 amostras analisadas, 15 (50%) foram positivas para bactérias do gênero *Listeria*, sendo que duas (6,7%) amostras apresentaram-se contaminadas com *L. monocytogenes*. O enriquecimento secundário aumentou a frequência de isolamentos quando comparado com o enriquecimento primário utilizado isoladamente. O meio de plaqueamento no qual se obteve maior número de isolamentos foi o ágar MOX seguido pelo LPM e MMA. Na tipificação sorológica, observou-se maior prevalência de *L. monocytogenes* pertencente ao sorotipo 4b (50%), porém, os sorotipos 1/2 e 1/2 c também foram identificados. No teste de sensibilidade aos antimicrobianos, todas as cepas de *L. monocytogenes* foram resistentes aos seguintes antimicrobianos testados: gentamicina, cefoxitina, ampicilina, clindamicina, oxaciclina e sulfazotrim. Em relação à presença de sulfito de sódio nas carnes bovinas pré-moídas, das 30 amostras analisadas, 17 (56,7%) foram positivas no teste qualitativo para sulfito. Porém, o sulfito de sódio na concentração de até 15 g não interferiu significativamente no crescimento de *L. monocytogenes*. O processo de irradiação em nenhuma das doses testadas foram suficientes na total eliminação de *Listeria* spp. em amostra de carne moída bovina contaminada naturalmente, mas diminuiu consideravelmente a população bacteriana presente. As amostras que se apresentaram contaminadas com *L. monocytogenes* e as que foram adicionadas com sulfito de sódio, caracterizaram-se como potencialmente capazes de ocasionar enfermidades transmitidas por alimentos, sendo consideradas impróprias para o consumo de acordo com a legislação vigente.

Palavras chave: *Listeria* spp., carne bovina pré-moída, sulfito de sódio

ABSTRACT

Thirty bovine ground meat samples were obtained from different markets at Niterói city, RJ, with the objective to detect the presence of bacterias of the genus *Listeria* and to evaluate the occurrence of frauds by the addition of sodium sulfite into fresh meat. The isolated bacterias were submitted to biochemical and sorological tests, also to the antibiotic sensibility tests against the drugs most used on Gram positive infectious treatments. The efficiency of primary and secondary enrichment broths to isolate *Listeria* spp as well as of three different solid media were tested. In addition, *in vitro* tests were realized to observe the effect of different concentrations of sodium sulfite applied on the growth of *L. monocytogenes* inoculated into irradiated meat. Irradiation treatment were also used to test its efficacy to eliminate *L. monocytogenes* 4b, which were isolated from the meat samples by using three doses: 4; 5,7 and 7 KGy. Among 30 samples, 15 (50%) were confirmed as positive to genus *Listeria*, and 2 (6,7%) samples were contaminated by *L. monocytogenes*. The secondary medium of enrichment increased isolations frequency rather than primary one used alone. The largest number of bacteria isolation were detected in MOX agar, followed by LPM agar and MMA agar. On sorological typing, the greatest prevalence number was reached by sorotyped 4b of *L. monocytogenes* (50%), but 1/2 and 1/2 c sorotypes were also identified. All *L. monocytogenes* cepas tested on their antibiotic sensibility showed resistance to the followings antibiotics: gentamicine, cefoxitine, ampiciline, clindamicine, oxaciclina and sulfazotrim. In relation to the presence of sodium sulfite into the ground meat, 17/30 (56,7%) samples were positively confirmed on sulfite qualitative test. However, on concentrations up to 15g, sodium sulfite did not make any effect on *L. monocytogenes* growth. Irradiation treatment, in none of the employed dose, could completely eliminate *Listeria* spp. into bovine ground meat samples naturally contaminated, but decreased considerably the present bacterias population. Samples contaminated with *L. monocytogenes* and the samples which were added with sodium sulfite were considered as potentially capable of provoking diseases of food origin, being considered as improper for consumption, according to the in actual laws.

Key words: *Listeria* spp., bovine ground meat, sodium sulfite

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

GRÁFICO 1- Número de cepas de *Listeria* spp. isoladas de amostras de carne bovina pré-moída usando-se o enriquecimento primário e secundário da metodologia do USDA com e sem prévia passagem pela solução de KOH . f. 102

GRÁFICO 2- Número de cepas de *L. monocytogenes* isoladas de amostras de carne bovina pré-moída usando-se o enriquecimento primário e secundário da metodologia do USDA com e sem prévia passagem pela solução de KOH. f. 102

GRÁFICO 3- Percentual de isolamentos de cepas de *L. innocua* de amostras de carne bovina pré-moída através dos meios de plaqueamento com e sem prévia passagem pela solução de KOH no enriquecimento primário. f. 103

GRÁFICO 4- Número de cepas de *L. monocytogenes* isoladas de amostras de carne bovina pré-moída sensíveis e resistentes aos antimicrobianos testados. f. 103

GRÁFICO 5- Percentual de isolamentos de cepas de *Listeria* spp. de amostras de carne bovina pré-moída através dos meios de plaqueamento com e sem prévia passagem pela solução de KOH no enriquecimento secundário (amostras 1 até 22). f. 104

GRÁFICO 6- Percentual de isolamentos de cepas de *L. monocytogenes* de amostras de carne bovina pré-moída através dos meios de plaqueamento com e sem prévia passagem pela solução de KOH no enriquecimento secundário (amostras 1 até 22). f. 104

GRÁFICO 7- Percentual de isolamentos de cepas de *Listeria* spp. de amostras de carne bovina pré-moída através dos meios de plaqueamento com e sem prévia passagem pela solução de KOH no enriquecimento secundário (amostras 23 até 30). f. 104

FIGURA 1- Esquema da metodologia de isolamento de *Listeria* spp. do USDA. f. 106

FIGURA 2- Preparação das amostras para o processo de irradiação e teste de verificação da eficiência do processamento. f. 107

FIGURA 3- Contagem de *L. monocytogenes* em carnes moídas irradiadas adicionadas com diferentes concentrações de sulfito de sódio (1° experimento).f. 108

FIGURA 4- Contagem de *L. monocytogenes* em carnes moídas irradiadas adicionadas com diferentes concentrações de sulfito de sódio (2° experimento).f. 109

FIGURA 5- “CAMP test” para *Listeria monocytogenes*: Teste padrão esquemático de inoculação em placa de ágar sangue de carneiro. f. 110

FIGURA 6- Mecanismo de penetração de *L. monocytogenes* na célula do hospedeiro. f. 110

FIGURA 7- Esfregaço em lâmina corado pelo método de Gram – *Listeria* spp. f. 111

FIGURA 8- Crescimento de bactérias do gênero *Listeria* spp. no ágar MOX. f. 111

FIGURA 9- Crescimento de *Listeria monocytogenes* em ágar tripticase de soja com sangue de carneiro desfibrinado. f. 112

FIGURA 10-“CAMP test”. f. 112

FIGURA 11- Carne pré-moída bovina sem sulfito e com sulfito da esquerda para a direita. f. 113

QUADRO 1- Comportamento das espécies de *Listeria* no “CAMP test”. f. 113

QUADRO 2- Diferenciação bioquímica entre as cepas de *Listeria* spp. 114

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Número de amostras de carnes bovinas pré-moídas positivas para as diferentes espécies do gênero *Listeria*. f. 96

TABELA 2 - Sorotipos de *Listeria* spp. isolados das amostras de carne moída. f. 96

TABELA 3 - Número de cepas de *L. innocua* e *L. monocytogenes* isoladas de amostras de carne bovina pré-moída a partir do plaqueamento com enriquecimento primário, segundo metodologia do USDA. f. 96

TABELA 4 - Número de cepas de *L. innocua* e *L. monocytogenes* isoladas de amostras de carne bovina pré-moída a partir do plaqueamento com enriquecimento secundário, segundo metodologia do USDA. f. 96

TABELA 5 - Número de cepas de *Listeria* spp. isoladas de amostras de carne bovina pré-moída a partir do plaqueamento com e sem prévia passagem pela solução de KOH. f. 97

TABELA 6 - Número de cepas isoladas de amostras de carne bovina pré-moída a partir dos diferentes meios de plaqueamento com ou sem prévia passagem pelo KOH no enriquecimento primário. f. 97

TABELA 7- Número de cepas isoladas de amostras de carne bovina pré-moída a partir de três meios de plaqueamento com ou sem prévia passagem pelo KOH no enriquecimento secundário (amostras número 1 até 22). f. 97

TABELA 8 - Número de cepas isoladas de amostras de carne bovina pré-moída a partir de dois meios de plaqueamento com ou sem prévia passagem pelo KOH no enriquecimento secundário (amostras número 23 até 30). f. 98

TABELA 9 - Resultado do teste qualitativo para o sulfito de sódio nas 30 amostras de carne bovina pré-moída. f. 98

TABELA 10 - Número de cepas isoladas de amostras de carne bovina pré-moída a partir de amostras de carne pré-moída com e sem sulfito. f. 98

TABELA 11 - Resultado da contagem de *L. monocytogenes* 4b, isoladas de amostras de carne bovina pré-moída, em ágar MOX a partir das culturas adicionadas com diferentes concentrações de sulfito de sódio. f. 99

TABELA 12 - Distribuição dos valores de pH das amostras. f. 99

TABELA 13 - Valores máximo e mínimo de pH das amostras de carne bovina pré-moída onde isolou-se *Listeria* spp. f. 99

TABELA 14 - Comportamento das seis cepas de *L. monocytogenes* isoladas de amostras de carne bovina pré-moída frente aos antimicrobianos testados. f. 100

TABELA 15 - Comportamento das sete cepas de *L. innocua* 6a isoladas de amostras de carne bovina pré-moída frente aos antimicrobianos testados. f. 100

TABELA 16 - Comportamento das sete cepas de *L. innocua* 6b isoladas de amostras de carne bovina pré-moída frente aos antimicrobianos testados. f. 101

TABELA 17 - Comportamento das quatro cepas de *L. innocua* não tipáveis isoladas de amostras de carne bovina pré-moída frente aos antimicrobianos testados. f. 101

LISTA DE ABREVIATURAS

UVM-	“University of Vermont Broth”
MMA-	“Modified McBride Agar”
LPM-	“Lithium Chloride Phenylethanol Moxalactam”
USDA-	“United States Department of Agriculture”
FDA-	“Food and Drug Administration”
LEB I-	“ <i>Listeria</i> Enrichment Broth I”
LEB II-	“ <i>Listeria</i> Enrichment Broth II”
MOX-	“Modified Oxford Agar”
ATS-	Ágar Trypticase de Soja
LMBA-	“ <i>L. monocytogenes</i> Blood Agar”
AHCL-	Ágar Hemolítico Ceftazidima Cloreto de Lítio
SIDA-	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APPCC-	Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle
BPF-	Boas Práticas de Fabricação
PPHO-	Procedimentos padrões de Higiene Operacional
ICMSF-	“International Commission on Microbiological Specifications for Foods”
MLD-	“Mean Lethal Dose”
TSI-	“Triple Sugar Iron”
UFF-	Universidade Federal Fluminense
COPPE-	Coordenação dos Programas de Pós-Graduação de Engenharia
UFRJ-	Universidade Federal do Rio de Janeiro
FIOCRUZ-	Fundação Oswaldo Cruz
NCCLS-	“National Commottee for Clinical Laboratory Standards”
SSP-	Solução Salina Peptonada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	p.14
2	OBJETIVOS	p.16
1.1	OBJETIVOS GERAIS	p.16
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	p.16
3	JUSTIFICATIVA	p.17
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	p.19
4.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	p.19
4.1.1	Taxonomia e sorotipagem	p.19
4.1.2	Características do microrganismo	p.20
4.1.3	Mecanismos de virulência	p.22
4.1.4	Fatores que afetam o crescimento e a sobrevivência	p.24
4.1.5	Comportamento frente às bactérias lácticas	p.27
4.1.6	Resistência aos antimicrobianos	p.28
4.1.7	Meios de isolamento de <i>Listeria</i> spp.	p.30
4.2	LISTERIOSE	p.35
4.2.1	Epidemiologia	p.35
4.2.2	Características da doença	p.37
4.2.2.1	Nos homens	p.37
4.2.2.2	Nos bovinos	p.40
4.2.3	Medidas de controle da listeriose	p.41
4.3	<i>Listeria</i> spp. EM ALIMENTOS	p.42
4.3.1	Regulamentações sobre <i>L. monocytogenes</i> em alimentos	p.46
4.4	USO DE SULFITO DE SÓDIO EM CARNES FRESCAS	p.46
4.4.1	Finalidade	p.47
4.4.2	Toxicidade	p.48
4.4.3	Legislação	p.50
4.5	IRRADIAÇÃO DE ALIMENTOS	p.51
5	MATERIAL E MÉTODOS	p.55
5.1	MATERIAL PERMANENTE	p.55
5.2	MATERIAL DE CONSUMO	p.55
5.3	AMOSTRAGEM	p.57
5.4	METODOLOGIA	p.58
5.4.1	Isolamento e identificação de bactérias do gênero <i>Listeria</i> (USDA,data)	p.58
5.4.1.1	Enriquecimento primário e plaqueamento	p.58
5.4.1.2	Enriquecimento secundário e plaqueamento	p.59

5.4.1.3	Provas bioquímicas,	p.60
5.4.2	Identificação sorológica,	p.63
5.4.3	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos,	p.63
5.4.4	Determinação qualitativa de sulfito em amostra de carne fresca (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985),	p.64
5.4.5	Contagem de <i>L. monocytogenes</i> em carnes moídas irradiadas adicionadas com diferentes concentrações de sulfito de sódio,	p.64
5.4.6	Análise estatística,	p.66
6	RESULTADOS,	p.67
7	DISCUSSÃO,	p.71
8	CONCLUSÕES,	p.80
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS,	p.82
10	APÊNDICES,	p. 95
11	ANEXOS,	p. 105

1 INTRODUÇÃO

A carne bovina é considerada um alimento de origem animal com elevado teor de proteínas de alto valor biológico, necessárias para a manutenção da higidez orgânica. Além disso, sua comercialização é de grande importância para o ganho de capital em nível nacional e internacional. Estes aspectos são corroborados através do elevado número de bovinos criados no Brasil para consumo no mercado nacional e internacional que atingiu em 2004 em torno de 204.512.000 cabeças conforme dados do IBGE (2004). Entretanto, o preço de cortes bovinos ainda é elevado e em muitas vezes não atinge todas as camadas sociais, principalmente as de baixo poder aquisitivo. Logo, há necessidade de obter-se carne mais barata para atender a estas populações e determinados pratos da culinária nacional.

A carne moída bovina é um alimento largamente consumido no Brasil, porém, ao cominuir este alimento nobre com alto valor nutricional, muitos fatores podem colaborar em comprometer este alimento nos aspectos de inocuidade, pois a moagem ao aumentar a área de superfície, facilita o crescimento e desenvolvimento microbiano. Aliado a este fato, a alta manipulação com baixo padrão higiênico-sanitário permite a multiplicação bacteriana. Uma maneira de se conseguir comercializar a carne moída bovina por um preço mais acessível ao mercado consumidor, é a forma conhecida como carne pré-moída. Como esta carne não é moída na frente do comprador alguns setores da produção podem misturar carnes de má qualidade tais como : aparas, carne de cabeça e cortes em deterioração insipientes, fornecendo ao consumidor um alimento de baixa qualidade. Também há de considerar-se que a forma de comercialização, na maioria das vezes, não é a mais adequada tendo em vista que o uso inadequado da frigidificação permite o

aumento da microbiota indígena e contaminante que inevitavelmente reduz o prazo de vida comercial, tornando o alimento potencialmente perigoso à saúde coletiva.

De acordo com O Guia SUS do cidadão, da Secretaria de Estado da Saúde do RJ (2006), é proibida a comercialização de carne pré-moída, uma vez que esta pode deteriorar-se mais rapidamente, pela elevada contaminação bacteriana e, quando elaborada por maus comerciantes, podem servir de veículo para substâncias tóxicas adicionadas (sulfitos por exemplo), misturas elevadas de gordura, e outros tipos de fraudes.

Para diminuir as perdas com a deterioração da carne pré-moída, o comércio vem utilizando outro artifício fraudulento que é a adição de conservante intencional como o sulfito de sódio para burlar o consumidor colocando em risco a saúde da população. O sulfito de sódio proporciona aparência fresca e coloração vermelha à carne bem como elimina o forte odor de deterioração. Porém, esta prática é considerada fraude pela legislação brasileira ao enganar o comprador a respeito da qualidade real da carne. Além disso, este aditivo pode ocasionar reações alérgicas no ingestor susceptível.

Considera-se ainda como um outro fator agravante a microbiota natural e/ou contaminante da carne constituída por *Listeria* spp. A *L. monocytogenes* é um patógeno emergente capaz de ocasionar meningite e provocar abortos através da ingestão de alimentos contaminados, que não foram submetidos ao tratamento térmico adequado na eliminação de bactérias.

Objetivando-se minimizar os aspectos interferentes em produzir alimentos seguros, utiliza-se o processo de irradiação, embora em nível experimental. Do ponto de vista de saúde pública, a irradiação é aplicada aos alimentos visando garantir sua qualidade higiênico-sanitária, da mesma forma que outros métodos de conservação de alimentos, através da redução ou eliminação da microbiota saprofítica. Produtos cárneos são bastante susceptíveis à contaminação por diversos microrganismos que são agentes etiológicos de enfermidades transmitidas por alimentos. A maioria destes, podem ser eliminados por doses subesterilizantes e ainda promover a extensão da vida útil dos produtos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Verificar a ocorrência de bactérias do gênero *Listeria* em amostras de carnes bovinas pré-moídas, de diferentes estabelecimentos comerciais, nas condições oferecidas ao consumo e realizar o teste de sensibilidade aos antimicrobianos;
- Detectar a adição fraudulenta de sulfito de sódio nas amostras, através da determinação qualitativa do aditivo, e observar o seu efeito antilisterial.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as espécies e os sorotipos de *Listeria* de maior ocorrência em carnes moídas comercializadas em açougues no município de Niterói-RJ;
- Verificar a eficiência da utilização do enriquecimento secundário e da passagem prévia pela solução de hidróxido de potássio no isolamento de *Listeria* spp.;
- Comparar os métodos de isolamento de *Listeria* spp. usando três meios de plaqueamento seletivo diferentes;
- Determinar a dose de irradiação em kGy necessária para eliminar *Listeria* spp. de uma carne moída naturalmente contaminada;
- Detectar a presença de sulfito de sódio nas amostras e relacionar sua presença com a sobrevivência de listerias presentes na carne moída através de experimentação *in vitro*;
- Realizar o teste de sensibilidade antimicrobiana nas espécies de listerias isoladas na realização do experimento.

3 JUSTIFICATIVA

A carne pré-moída bovina é um alimento largamente comercializado no município de Niterói possuindo menor valor no mercado, tendo em vista que o processo de moagem não foi realizado na frente do comprador, o que possibilitaria a adição fraudulenta de conservantes como o sulfito de sódio com o objetivo de aumentar a vida comercial do produto e enganar o consumidor a respeito da real aparência e frescor da carne. Este tipo de produto, além de possuir maior área de superfície e ser altamente manuseado, possibilitando o crescimento e multiplicação bacteriana, permite o desenvolvimento de bactérias psicrotróficas patogênicas como *L. monocytogenes* por permanecerem estocados sob temperatura de refrigeração até o consumo. Sendo assim, a avaliação bacteriológica deste alimento é de suma importância para a saúde pública.

A ocorrência da listeriose está aumentando em todo mundo, tornando-se uma grande preocupação para as indústrias e autoridades sanitárias, devido a sua alta taxa de mortalidade, larga distribuição em produtos crus, capacidade de crescimento bacteriano em baixas temperaturas e de estabelecer-se nos vários ambientes do processamento de alimentos (MURIANA, 1996)

Por causar doenças em grande variedade de espécies de animais, a Listeriose pode ser considerada uma zoonose, sendo que, a ingestão de alimentos contaminados é uma das principais vias de transmissão.

Os ruminantes são comumente envolvidos, o microrganismo está associado com abortos e encefalites em bovinos e em carneiros. Conseqüentemente, o fato do alimento ser um veículo para a infecção por *L. monocytogenes* em humanos é reconhecido, e este microrganismo é um assunto

não só científico, mas também de interesse considerável em saúde pública (VARNAM; EVANS, et al. 1996).

Existem muitos estudos sobre irradiação em alimentos objetivando diminuir consideravelmente a microbiota patogênica ou até mesmo de eliminar estes microrganismos assegurando, assim, um produto seguro ao consumidor. Porém, os resultados obtidos por diversos pesquisadores com relação à dose letal para *L. monocytogenes* em alimentos são bastante controversos, sugerindo que devem ser realizadas novas pesquisas laboratoriais sobre o assunto.

O sulfito de sódio é um aditivo comumente adicionado em carnes pré-moídas e possui ação conservante melhorando o aspecto geral da carne, porém, é considerado um ato fraudulento, sendo sua ingestão potencialmente perigosa para as pessoas sensíveis ao sulfito. Existem poucas pesquisas a respeito da ação antilisterial do sulfito de sódio, logo, sua presença em alimentos pode representar dois perigos em potencial: ocasionar reações alérgicas nos indivíduos e, ainda, não eliminar *L. monocytogenes* no alimento.

Assim, o controle microbiológico aliado ao controle físico-químico da carne processada, apresentam-se como etapas essenciais para o fornecimento de um alimento aceitável e seguro ao consumo, visto que a presença de *L. monocytogenes* e de sulfito de sódio como aditivo, tornam o seu consumo potencialmente perigoso para a saúde coletiva.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 *Listeria monocytogenes*

4.1.1 Taxonomia e sorotipagem

Segundo Corrêa, Corrêa (1992), em 1929, Munay, Webb e Swann, durante uma epizootia entre coelhos e cobaias de um biotério em Cambridge, isolaram microrganismos que causavam intensa monocitose, nomeando o agente como *Bacterium monocytogenes*. Um ano mais tarde, na África do Sul, observou-se uma doença similar em roedor selvagem e, em honra a Lister, denominou-se o agente como *Listerella hepatolytica*, porém, considerando ser parecido com o agente isolado pelos outros autores ingleses, foi proposta a denominação de *Listerella monocytogenes*. Posteriormente, como havia um gênero vegetal assim denominado, o agente passou a chamar-se *Listeria monocytogenes*.

As listerias são bastonetes Gram positivos, não produtoras de esporo e não ácido resistente. A denominação do gênero foi mudada, em 1940, de *Listerella* para *Listeria*. Em certo momento, acreditou-se que as listerias estivessem relacionadas a bactérias corineformes e, de fato, foram colocadas na família *Corinebacteriaceae*. Contudo, atualmente, está claro que estão mais relacionadas a *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., e *Streptococcus* spp. (JAY, 2005).

O gênero *Listeria* é classificado juntamente com os gêneros *Lactobacillus*, *Erysipelotrix*, *Brochothrix*, *Caryophanon* e *Renibacterium*. As espécies reconhecidas são: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. murrayi*. A espécie *L. denitrificans* foi transferida para o gênero *Jonesia*. No que diz

respeito à sorologia, foram descritos 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 ½ a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4e, 7 (SEELIGER; JONES, 1996).

A classificação sorológica exige tipagem dos antígenos O e H, efetuada em laboratórios de referência. É utilizada basicamente para estudos epidemiológicos e tipificação dos isolados. Os sorotipos 1a, 1b e 4b constituem mais de 90% dos microrganismos isolados em seres humanos. O sorotipo 4b provocou uma epidemia de listeriose associada a queijo feito com leite inadequadamente pasteurizado (JAWETZ, et al., 1998).

Segundo Jay (2005), a *L. monocytogenes* está representada por 13 sorovares, algumas das quais são compartilhadas por *L. innocua* e por *L. seeligeri*. Embora *L. innocua* esteja representada somente por três sorovares, muitas vezes esta é considerada uma variante não patogênica de *L. monocytogenes*. A grande heterogeneidade antigênica desta última espécie pode estar relacionada com o grande número de hospedeiros animais nos quais é capaz de multiplicar-se. Em geral, linhagens 4b são mais freqüentemente associadas com surtos, enquanto linhagens ½ são mais relacionadas com produtos alimentícios.

4.1.2 Características do microrganismo

Os estudos e procedimentos para isolamento e enumeração de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* em alimentos têm aumentado muito nos últimos anos. As mudanças nas características e nos hábitos alimentares, a forma em que os alimentos são produzidos, a habilidade da *Listeria* sobreviver em condições adversas, sua capacidade de crescer em temperatura de refrigeração, aliado à sua resistência ao congelamento, ao calor e aos diversos antibióticos, tornaram esse microrganismo emergente e de grande importância entre os patógenos transmitidos por alimentos e atualmente representa um grande problema para as indústrias de alimentos e órgãos oficiais de regulamentação (DONELLY et al., 1992; FABER; PETERKIN, 1991).

De acordo com Seeliger e Jones (1996), 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 μm de diâmetro e 0,5 a 2,0 μm de comprimento. Podem ocorrer isoladamente, em cadeias curtas ou arranjas em ângulos formando “V” entre si ou em grupos que se mantêm paralelos ao longo dos eixos.

De acordo com Sneath, et al. (1986), o intervalo de temperatura para o crescimento está entre 1 e 45°C sendo a faixa de temperatura ótima de crescimento entre 30 e 37°C. Este microrganismo não sobrevive ao calor a 60°C por 30 minutos, cresce em pH entre 6,0 e 9,0 e em caldo nutriente suplementado com 10% de cloreto de sódio. Segundo Jay (2005), algumas espécies crescem numa faixa de pH 4,1 a 9,6.

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 sua produção é reduzida notavelmente (FABER; PETERKIN, op. cit.; FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Nos cultivos com três a seis horas de incubação predominam as formas cocóides, mas naqueles de três a cinco dias formam-se longos filamentos em 6 a 20 μm ou mais, especialmente nas colônias rugosas. Em temperaturas de 20 a 25° C, o microrganismo é móvel por meio de flagelos peritríquios, mas a 37°C tem um só flagelo polar (CORRÊA, CORRÊA, op. cit.).

Em relação às características bioquímicas, *Listeria* spp. são catalase positiva, oxidase negativa, motilidade a 20°C, algumas espécies são β hemolíticas em ágar sangue (*L. monocytogenes*, *L. seeligeri* e *L. ivanovii*), D-xilose negativa, D-manitol negativa, L-ramnose positiva, metil-D-manosídeo positiva, indol negativa, esculina positiva e não reduzem nitrato. (BILLE et al., 1992; LOVETT; TWEDT, 1988; SEELIGER; JONES, op. cit.)

A *Listeria* spp. assemelha-se aos *Enterococcus* spp. por serem capazes de hidrolisarem a esculina e crescerem na presença de 10 a 40% de bile, 10% de NaCl, 0,025% de acetato de tálio e 0,04% de tularito de potássio, mas, diferentemente dos enterococos, ela não cresce na presença de 0,02% de azida de sódio (JAY, 2005).

De acordo com Harrigan (1998), em ágar triptose, as colônias são translúcidas e facilmente reconhecidas pela sua coloração azul-esverdeada, quando observadas em luz incidindo obliquamente.

Em ágar-sangue a 37°C, de preferência com 5 a 10% de CO₂, cresce em 24-48 h sob forma de diminutas colônias de 0,2-0,5 mm e algumas maiores, com

estreito halo de hemólise. O seu halo estreito de beta-hemólise serve para diferenciá-la da *L. ivanovii*, também patógena para os animais e que produz um halo maior de beta-hemólise (CORRÊA; CORRÊA, op. cit.).

4.1.3 Mecanismo de virulência

A *L. monocytogenes* é um patógeno intracelular facultativo, que pode crescer em macrófagos, células epiteliais e fibroblastos cultivados. Todas as cepas virulentas produzem uma hemolisina, a listeriolisina O, que está geneticamente relacionada com a estreptomicina O e a pneumolisina (MURRAY, 2000).

De acordo com Jay (2005), das espécies de *Listeria*, a *L. monocytogenes* é o patógeno de importância para os humanos. Embora a *L. ivanovii* possa multiplicar-se em ratos, o grau de crescimento de 10^6 células não causa infecção. *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. seeligeri* não são patogênicas, embora a última produza hemólise.

Os mecanismos pelos quais a *Listeria monocytogenes* causa listeriose ainda não estão bem definidos. Sabe-se, entretanto, que a bactéria produz algumas toxinas, destacando-se 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 produzidas foi isolada uma toxina hemorrágica, uma fração pirogênica e uma toxina capaz de causar alterações eletrocardiográficas (MARTH, 1988).

A *Listeria* spp. após entrar no organismo hospedeiro por via oral, atinge o trato intestinal aderindo e invadindo a mucosa. A partir do momento que atinge a corrente sangüínea, a célula bacteriana é fagocitada por macrófagos e após a lise do fagossoma, é liberada no citoplasma da célula do hospedeiro onde se multiplica rapidamente (FRANCO; LANDGRAF, op. cit.; LOVETT; TWEDT, op. cit.).

Uma vez no citosol, a proteína de superfície ActA (codificada pelo gene *actA*) auxilia na formação da cauda de actina que propulsiona o microrganismo através da membrana citoplasmática, sendo formada uma dupla membrana de vacúolo. Com a ajuda da listeriolisina O e de duas fosfolipases bacterianas, a fosfolipase C fosfatidilinositol específica e uma fosfolipase C não-específica, as bactérias são libertadas. Posteriormente, ocorrem a projeção da membrana e a formação de um filopódio, o qual é absorvido por uma célula adjacente, e o processo de invasão é

repetido. Desta maneira, a *L. monocytogenes* se espalha pelas células sem que a bactéria tenha que sair do interior das células hospedeiras (JAY, op. cit.). Na FIGURA 10 contida no item 11 (ANEXOS), pode-se observar o mecanismo de penetração de *L. monocytogenes* nas células do hospedeiro.

A hemolisina durante a infecção provoca rompimento das membranas, especialmente aquelas formadas entre os vacúolos fagocitários e os lisossomas, não permitindo, portanto, a formação dos fagolisossomas, que poderiam destruir a bactéria por meio das hidrolases ácidas aí existentes. Isto permite que a *Listeria* sobreviva e se multiplique dentro das células fagocitárias. As enzimas hidrolíticas, após a ruptura das membranas dos lisossomas, são liberadas e provocam a destruição dos macrófagos e monócitos (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

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

Franco e Landgraf (1996) descreveram vários fatores de virulência que tentam explicar o mecanismo de patogenicidade, entre os quais listeriolisina O que tem como função mediar a lise dos vacúolos que contêm a célula bacteriana; fosfolipases que hidrolisam os lipídios da membrana causando ruptura da célula; p60 que é uma proteína associada à capacidade invasiva da bactéria; internalina, proteína de membrana também associada ao mecanismo de invasão da célula do hospedeiro.

Todas as linhagens virulentas dessas espécies produzem uma substância específica que é responsável pela beta-hemólise em eritrócitos e pela destruição das células fagocíticas que os engolfam; esta substância é denominada listeriolisina O, sendo altamente homóloga à estreptolisina e à pneumolisina. A listeriolisina O tem sido detectada em todas as linhagens de *L. monocytogenes*, incluindo algumas não hemolíticas, mas não em *L. welshimeri* ou *L. grayi* (JAY, op. cit.; MURRAY, op. cit.).

De acordo com Jay (2005), a entrada do microrganismo nos fagócitos pode ocorrer de duas maneiras: diretamente pelo fagossoma ou do fagossoma para dentro do citoplasma do fagócito. Porém, a passagem para dentro das células não-fagocíticas é diferente, necessitando neste caso de proteínas ligadas à superfície das bactérias como a internalina. Outra proteína associada à invasão de *Listeria* é a p60, esta é secretada por todas as espécies de *Listeria*.

Resistência ou imunidade aos patógenos intracelulares, como viroses, parasitas animais e *L. monocytogenes*, são mediadas por células T, linfócitos produzidos na medula óssea que atingem a maturação no timo. Diferentemente das células B, que aumentam a imunidade humoral (anticorpos circulantes), as células T ativadas reagem diretamente contra as células estranhas. Uma vez o patógeno dentro da célula hospedeira, não pode ser alcançado pelos anticorpos, mas a sua presença é sinalizada pela mudança estrutural da célula parasitada, que é, então, destruída pelas células T, as quais não mais reconhecem as células invadidas como próprias. O que torna os hospedeiros imunocomprometidos mais susceptíveis à listeriose é o efeito amortecedor que agentes imunossupressivos exercem no sistema das células T (JAY, op. cit.).

4.1.4 Fatores que afetam o crescimento e a sobrevivência

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. (FRANCO; LANDGRAF, op. cit.; LOVETT, TWEDT, op. cit.; SEELIGER; JONES, op. cit.)

Novak et al. (2003) examinaram os efeitos da refrigeração ou congelamento antes e depois da exposição de *L. monocytogenes* à temperaturas subletais em carne moída, simulando as condições que podem ocorrer em alimentos preparados requentados pelos consumidores após estocagem no frio. De acordo com os resultados, a sobrevivência de *L. monocytogenes* na carne moída que sofreu choque térmico (46°C) exibiu uma elevada resistência ao tratamento pelo calor a 60°C quando comparadas com aquelas que não sofreram o choque térmico.

A característica psicotrófica depende da integridade celular e do sistema de transporte energético resistente ao frio, que estimula o metabolismo sob baixas temperaturas, propiciando altas concentrações de substratos intracelulares e uma fase lag prolongada em temperaturas de refrigeração (OLIVEIRA, op. 1993).

De acordo com Mossel e Garcia (1981), a conservação dos alimentos em câmaras frigoríficas a temperaturas abaixo de 5°C constitui uma prática muito generalizada. A maioria das bactérias não se multiplica a temperaturas inferiores a 4°C. Existe um número reduzido de exceções a esta regra, entre as quais se

encontram a *Yersinia enterocolitica*, *L. monocytogenes* e os tipos E e B (estirpes não proteolíticas) de *Clostridium botulinum*.

Como este microrganismo é um patógeno intracelular, vários estudos foram desenvolvidos para determinar sua termorresistência relativa dentro e fora dos fagócitos. Em geral, os protocolos convencionais para pasteurização do leite são adequados para a destruição de *L. monocytogenes* em níveis de 10^5 a 10^6 células/mL, tanto aquelas que se encontram livremente suspensas como as que estão no interior das células (JAY, 2005).

Na pesquisa desenvolvida por Chou et al (1999), onde cepas de *L. monocytogenes* foram suspensas em Caldo Triptose de Soja e armazenadas a -28°C, -18°C e -5°C por um período de 21 dias, a população de *L. monocytogenes* declinou com o passar dos dias, principalmente quando foi estocada a -18°C.

No estudo realizado por Hefnawy et al. (1993), onde foi observado o comportamento de *L. monocytogenes* em carnes moídas armazenadas sob refrigeração (4°C) e sob congelamento (-18°C), foi constatado o aumento do número de bactérias nas amostras armazenadas a 4°C durante seis dias. Entretanto, nas amostras acondicionadas sob -18°C, houve pouca ou nenhuma mudança na população bacteriana até o 21º dia, diminuindo consideravelmente o número de listerias após este período.

No mesmo trabalho citado acima, foram preparadas lingüiças de porco adicionadas com diferentes aditivos como sorbato de potássio, nitrato de sódio, nitrito de sódio e uma mistura destes aditivos, sendo as amostras armazenadas a 4°C por seis dias. De acordo com os resultados obtidos, o sorbato de potássio na concentração de 0,26%, sozinho ou combinado com nitrato de sódio foi mais listericida do que os outros tratamentos. O nitrito de sódio, sozinho ou combinado com nitrato de sódio, apresentou pouco ou nenhum efeito sobre o crescimento de *L. monocytogenes*. Os autores justificaram este comportamento devido ao pH alcalino do substrato (carne suína usada na elaboração de lingüiça).

Com relação à concentração de NaCl, foi constatada a sobrevivência da *L. monocytogenes* em 10,5% e 13% quando incubada a 37°C por 15 e dez dias, respectivamente. Em concentrações de 20-30% de NaCl, o tempo de sobrevivência foi reduzido para cinco dias. Mas, quando a temperatura foi reduzida para 4°C, a bactéria pode sobreviver por mais de 100 dias em concentrações entre 10,5 e 30,5% de NaCl (FRANCO; LANDGRAF, op. cit; LOGUERCIO et al., 2001).

Na pesquisa realizada por Stekelenburg (2003), salsichas tipo Frankfurter foram preparadas com lactato de potássio, diacetato de sódio e com diferentes concentrações de mistura destes dois aditivos. Após inoculação das amostras com *Lactobacillus sake* e com *L. monocytogenes*, foi observado que a mistura contendo 56% de lactato de potássio e 4% de diacetato de sódio inibiram o desenvolvimento dos dois tipos bacterianos durante armazenamento a 4°C. Salsichas contendo 0,1% de diacetato de sódio apresentaram um desenvolvimento retardado de *L. monocytogenes*, porém não houve inibição do crescimento de *Lactobacillus sake*.

Na indústria de carne, a *L. monocytogenes* pode ser um problema, uma vez que sobrevive aos níveis recomendados de nitrato de sódio e de cloreto de sódio (GERMANO; GERMANO, 2001).

De acordo com Kamat e Nair (1996), concentrações de nitrato de sódio a 200 µg/mL (permitido em carnes curadas) não foi inibitória para as espécies *L. monocytogenes* e *L. innocua*, quando em pH 7,0. Entretanto, em baixo pH (4,0), o nitrato de sódio foi inibitório a 100 µm/mL. Além disso, a dose inibitória diminuiu para 50 µm/mL quando adicionou-se 10g de NaCl/L.

Segundo o trabalho realizado por Yin e Cheng (2003), a presença de dialil sulfito e dialil dissulfito em carne moída em concentrações entre 10 e 20 µm reduz significativamente as bactérias aeróbicas totais e inibe o crescimento de patógenos incluindo *L. monocytogenes*. Estes autores sugerem que a aplicação destes compostos organosulfurosos derivados de alho e cebola na carne, pode melhorar a cor e a segurança microbiológica deste alimento.

Entretanto, outros pesquisadores observaram que o sulfito e seus derivados em diferentes concentrações não inibiam consideravelmente o crescimento de *Listeria monocytogenes* (KIM et al, 2004; KUNG; FLEMING, 1997; RYSER; MARTH, 1989).

Kamat e Nair (1996) descreveram que o ácido láctico a 5g/L era bactericida para as espécies *L. monocytogenes* e *L. innocua* sendo 10^6 células eliminadas com três horas de atuação, enquanto 1,25g/L de ácido láctico era bacteriostático, visto que os microrganismos são capazes de crescer após 3 horas.

Barker e Park (2001) revelaram em sua pesquisa que a combinação de ácidos orgânicos, baixo pH, e etanol provou ser particularmente efetivo como bactericida para *L. monocytogenes*, sendo a combinação mais potente: pH 3,0; 50

mM de formato e 5% (vol/vol) de etanol, a qual resultou na eliminação de 5 log unidades em apenas quatro minutos.

Embora a *Listeria* spp. possa tolerar altas concentrações de sal (70 g de NaCl/L), o acondicionamento de carnes com baixo pH através da combinação apropriada de ácido láctico, NaCl (10g/L) e nitrato de sódio (50 µm/mL) pode ser útil no controle da contaminação por *Listeria* spp. (KAMAT; NAIR, op. cit.).

4.1.5 Comportamento frente às bactérias lácticas

Nos resultados obtidos por Stekelenburg (2003), onde amostras de salsichas foram inoculadas com *L. monocytogenes* e *Lactobacillus sakei*, o crescimento da primeira diminuiu quando o número de *L. sakei* chegou a 10⁸ UFC/g, provavelmente devido ao ácido láctico e/ou bacteriocinas produzidos pela última.

Na pesquisa desenvolvida por Vignolo et al. (1996), foi estudado o efeito da lactocina 705, uma bacteriocina produzida pelo *Lactobacillus casei* CRL 705, no crescimento de *L. monocytogenes* em extrato de carne a 20°C. Foi demonstrado que a eficiência da bacteriocina depende da concentração e da população bacteriana inoculada na amostra. O melhor efeito da bacteriocina foi obtido quando foram utilizados uma menor quantidade de inóculo (*L. monocytogenes*) e uma maior concentração de Lactocina 705 (16800 UFC/mL), onde a redução das células bacterianas foi de até 93,45%. Foi constatada uma efetividade da lactocina 705 no controle de *L. monocytogenes* em alimentos com alto teor protéico como o extrato de carne.

De acordo com o estudo realizado por Martinez e Martinis (2005), *L. monocytogenes* 1/2a foi isolada na presença de uma bacteriocina produzida pelo *Lactobacillus sakei* incubado sob temperatura de 1 a 8°C, porém não a 15°C. Além disso, foi constatado que a atuação da listerilisina O, produzida pela *L. monocytogenes* 1/2 a, não foi alterada pela exposição ao *L. sakei* 1, sugerindo que não houve uma modificação na virulência deste patógeno quando exposto à bacteriocina citada.

No trabalho desenvolvido por Martinis et al. (2001), a atividade antimicrobiana de bactérias ácido lácticas isoladas de amostras de carne foram testadas contra 11 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de carne de frango. De acordo com os

resultados, quatro espécies de bactérias ácido lácticas foram capazes de inibir todas as cepas de *L. monocytogenes* estudadas.

4.1.6 Resistência aos antimicrobianos

A utilização de antimicrobianos gerou grande otimismo em relação à prevenção e ao tratamento dos processos infecciosos. Entretanto, o uso exagerado e nem sempre criterioso ou racional dos antimicrobianos e quimioterápicos trouxe dificuldades, sendo a maior delas representada pela progressiva resistência bacteriana aos fármacos (MONTELLI ; SADATSUNE, 2001).

As bactérias podem ser classificadas em sensíveis e resistentes aos antimicrobianos. Em geral, classificam-se como resistentes, as bactérias que crescem “in vitro”, nas concentrações médias que os antimicrobianos atingem no sangue, quando administrados por via oral. São sensíveis as que não crescem nestas concentrações (TRABULSI; TOLEDO, 1989).

De acordo com Trabulsi e Toledo (1989), a resistência bacteriana pode ser natural ou adquirida. A natural corresponde a uma característica da espécie bacteriana, e a adquirida, à característica de uma ou mais amostras da espécie. A aquisição de resistência por uma célula bacteriana sensível é sempre decorrente de uma alteração genética.

O gênero *Listeria* apresenta uma susceptibilidade uniforme aos antimicrobianos contra bactérias Gram positivas (CASTRO, 1989). Os antimicrobianos mais indicados no tratamento da listeriose são : ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol e eritromicina (CASTRO, op. cit). Marth (1988) relata que a maioria das cepas é sensível à tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina e cefalotina.

Os fármacos mais efetivos para o tratamento da listeriose são a coumercina, rifampicina e ampicilina, sendo esta última adicionada de um antibiótico aminoglicosídeo. Mesmo com o uso destes fármacos, a terapia com antimicrobianos para listeriose não é inteiramente satisfatória, uma vez que pacientes doentes e hospedeiros comprometidos são mais difíceis de tratar do que hospedeiros sadios (JAY, 2005).

As espécies de *Listeria* isoladas por Yucel et al (2005) oriundas de amostras de carne bovina e produtos cárneos, foram resistentes a cefalotina, ampicilina e

ácido nalidíxico, porém, exibiram um grande grau de susceptibilidade a canamicina, cloranfenicol e tetraciclina.

Ampicilina, rifampicina, ou penicilina associada com gentamicina são os antimicrobianos de escolha para o tratamento de listeriose (WHITE et al, 2002). A associação de trimetoprim com uma sulfonamida como a sulfametoxazole no cotrimoxazole, é considerada como uma segunda opção para o tratamento. (CHARPENTIER; COURVALIN, 1999). Para o tratamento da bacteremia e da mulher grávida com listeriose, utiliza-se a vancomicina e a eritromicina, respectivamente (WHITE et. al., op. cit.)

Na pesquisa realizada por Gonçalves (1998), foram isoladas cepas de *Listeria* spp., provenientes de amostras de frango congeladas, resistentes a tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina e ampicilina. Além disso, todas as 246 cepas foram resistentes aos antimicrobianos cefoxitina, cefalexina, ceftadizima e cefolaxima.

De acordo com o resultado obtido por Araújo (1998), todas as 52 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de amostras de “blanquet” de presunto de peru fatiados também foram resistentes aos antimicrobianos ceftadizina, cefalexina e cefoxitina. Algumas cepas foram resistentes a cefalotina, clindamicina, amicacina, ceftriaxona e cefotaxima.

Aureli et al. (2003), observaram durante o experimento, que todas as cepas de *L. monocytogenes* isoladas a partir de diversos alimentos foram sensíveis aos antimicrobianos testados, com exceção para fosfomicina, lincomicina e flumequine para os quais as cepas demonstraram resistência. As estirpes apresentaram sensibilidade moderada para somente quatro antimicrobianos: espiramicina (salmão, leite, carne de ave), cloranfenicol (carne de ave e bovina), tetraciclina (carne bovina) e sensibilidade marginal a estreptomicina (carne de ave).

Hansen et al. (2005), examinaram a susceptibilidade aos antimicrobianos de cepas de *L. monocytogenes* isoladas de pacientes em Denmark. As cepas foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados incluindo penicilina, ampicilina e sulfametoxazole, com exceção a ciprofloxacina cujas cepas apresentaram sensibilidade moderada.

Na pesquisa desenvolvida por Prazak et al. (2002), 21 isolados de *L. monocytogenes* oriundos de amostras de repolho, do meio ambiente e de água foram testados com relação à resistência antimicrobiana, e 95% dos isolados testados foram resistentes a dois ou mais antimicrobianos; 85% das cepas multiresistentes

foram resistentes a penicilina. A cepa multiresistente que apresentou sensibilidade intermediária à penicilina foi resistente a gentamicina.

Antunes et al. (2002) observaram altas percentagens de *Listeria* spp. (84%) e *L. monocytogenes* (74%) isoladas de carcaças de frango resistentes a um ou mais agentes antimicrobianos. Ainda neste trabalho, a resistência da *L. monocytogenes* a enrofloxacinina e a clindamicina foi notada.

4.1.7 Meios de isolamento de *Listeria* spp.

As dificuldades em isolar *L. monocytogenes* surgem quando um pequeno número de listeria está presente no alimento, meio e amostras clínicas contendo grande número de microrganismos indígenos. Assim, o número de *Listeria* spp. deve ser aumentado, em relação à microbiota natural, antes desta bactéria ser detectada (RYSER; MARTH, 1991).

Embora um grande número de caldos de enriquecimento e procedimentos estejam sendo pesquisados, é notável que o uso do enriquecimento somente não recupere todas as cepas de *L. monocytogenes* sob todas as circunstâncias (VARNAM ; EVANS, 1996).

O método de enriquecimento a frio proposto em 1948 por Gray, onde as amostras eram homogeneizadas em Caldo Triptose, incubadas a 4°C e plaqueadas em ágar Triptose por três meses, foi adotado como método padrão para detectar *L. monocytogenes*. Embora o crescimento de *L. monocytogenes* seja favorecido nesta temperatura, outros microrganismos também podem se multiplicar em meio não seletivo sob temperatura de refrigeração. Para prevenir o crescimento destes microrganismos, pesquisadores começaram a adicionar agentes inibitórios em vários Caldos de Enriquecimento a frio não seletivos. A recuperação de *L. monocytogenes* também é beneficiada quando o enriquecimento a frio é usado como um enriquecimento primário seletivo (RYSER; MARTH, op. cit.).

A decisão imediata consiste em escolher o procedimento de enriquecimento : utilizando-se baixas temperaturas e meios não seletivos ou meios seletivos incubados a altas temperaturas. O enriquecimento seletivo é mais utilizado atualmente do que o enriquecimento em baixas temperaturas. Uma grande variedade de agentes seletivos são utilizados em várias combinações como por

exemplo: Meio “University of Vermont Broth” (UVM) adicionado com os agentes seletivos: acriflavina e ácido nalidíxico. (VARNAM; EVANS, op. cit.).

Muitos agentes inibitórios adicionais, incluindo acriflavina, cycloheximide, própolis, ceftazidine, rivanol e moxalactam, aumentam a possibilidade de recuperação de *L. monocytogenes* de amostras contendo microbiota diversificada (RYSER; MARTH, op. cit.).

O princípio do enriquecimento morno é baseado na inibição seletiva da microbiota indígena através da adição de agentes inibitórios, enquanto que ao mesmo tempo favorece o crescimento de *Listeria* spp. Devido aos vários meses de incubação requeridos pelo processo de enriquecimento a frio, a comunidade científica reconheceu a necessidade de diminuir o tempo de análise. (ibid)

Na pesquisa desenvolvida por Silva et al. (1998), o isolamento de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em diferentes tipos de queijo foi maior com a utilização do enriquecimento primário e secundário (19,4%, 10,8% respectivamente) do que com semeadura direta usando água peptonada tamponada homogeneizada com a amostra (1,94%, 1,94% respectivamente).

A situação dos meios de plaqueamento seletivo é similar a do caldo de enriquecimento, onde uma grande variedade de meios contendo diferentes combinações de antimicrobianos são utilizados (VARNAM; EVANS, op. cit.).

O meio “Modified McBride Agar” (MMA) é moderadamente seletivo e suporta o crescimento de um número de bactérias Gram-positivas. O maior problema deste meio de cultura é quando o mesmo é utilizado para alimentos com população significativa de *Bacillus*. A diferenciação das colônias de *Listeria* spp. para as demais é realizada através da observação em microscópio binocular com iluminação indireta. Porém, esta técnica despende muito tempo, principalmente quando grande número de amostras está envolvido (ibid.).

O ágar “Lithium Chloride Phenylethanol Moxalactam” (LPM), uma modificação do “McBride *Listeria* Agar”, foi desenvolvido por Lee e McClain (1986) para recuperar números baixos de *L. monocytogenes* a partir de amostras com uma microflora altamente diversificada. Seu uso é recomendado para diagnosticar *Listeria* spp. em amostras de alimentos e amostras clínicas.

O meio conhecido como ágar LPM é recomendado pelo “United States Department of Agriculture” (USDA) para o isolamento de *L. monocytogenes* a partir de amostras de carne bovina e de frango cruas e também foi incorporado pelo

procedimento do “Food and Drug Administration” (“FDA”) 1989 como um segundo meio de plaqueamento seletivo (RYSER; MARTH, op. cit.).

Existem novos meios adicionados com esculina e citrato de ferro amoniacal para a detecção das espécies de *Listeria* através da hidrólise da esculina, como por exemplo o meio Oxford. As colônias de *Listeria* spp. em ágar Oxford são reconhecidas através de uma coloração preta ou marrom escura devido á hidrólise da esculina, não sendo necessária a utilização de iluminação especial. Todas as espécies de *Listeria* são isoladas no meio ágar Oxford incluindo *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. welshimerii*. Algumas cepas de *L. seeligeri* podem, entretanto, ser inibidas. Este meio é mais seletivo do que o MMA e outras bactérias como *B. cereus* são incapazes de crescer (ibid).

A metodologia original do “USDA” desenvolvida por Lee e MacClain em 1986 difere dos métodos do “Food and Drug Administration” (FDA) devido à inclusão de dois enriquecimentos: primário e secundário para detectar *Listeria* spp.. Usando o método original do “USDA”, colônias presuntivas de *Listeria* podem ser detectadas com três dias de incubação, enquanto no método do “FDA” revisado, somente com nove a onze dias (RYSER; MARTH, 1991).

De acordo com Ryser e Marth (1991), o método original do “USDA” foi revisado em maio de 1989 devido ao crescente interesse na detecção de *L. monocytogenes* em alimentos. Este método difere do protocolo original devido aos seguintes fatores: o Caldo de enriquecimento secundário para *Listeria* (“*Listeria* Enrichment Broth” - “LEB II”) foi substituído pelo Caldo Fraser (“LEB I” com cloreto de lítio e citrato ferro amoniacal) como meio de enriquecimento secundário; o ágar LPM foi substituído pelo “Modified Oxford Agar” (“Oxford Agar” com acriflavina, cycloheximide, ceftetan, fosfomicina e moxalactam) como o único meio de plaqueamento; o tamanho da amostra aumentou para 25 g.

No método original do “USDA” a habilidade de vários técnicos de laboratório para identificar a colônia presuntiva de *Listeria* spp. no meio ágar LPM usando a iluminação oblíqua era questionada. O Caldo Fraser e o ágar MOX tornam-se escurecidos durante incubação devido à habilidade da *Listeria* spp. e de outros contaminantes (por exemplo diphtheroides, *Bacillus* aeróbios formadores de esporos) de hidrolizar a esculina, no caso do ágar, as colônias exibem halos pretos no MOX após 24-48 h de incubação. Além disso, alguns autores afirmam que o meio ágar MOX é mais seletivo do que o ágar LPM ou do que a formulação original do

ágar Oxford, pois os *Staphylococcus* e *Streptococcus* geralmente são incapazes de crescer no ágar MOX (RYSER; MARTH, op. cit.).

Cassiday et al. (1989) compararam a eficiência dos meios ágar LPM e MMA na enumeração de *L. monocytogenes* em queijo brie e em repolho cru. O ágar LPM mostrou-se mais eficiente para a análise destes alimentos. Além disso, eles observaram que o meio MMA requeria um período de incubação de 72 h antes das colônias poderem ser contadas e as colônias eram muito pequenas neste meio de cultura, dificultando a contagem.

No trabalho realizado por Wederquist et al. (1995), cinco diferentes meios de plaqueamento foram avaliados quanto à eficiência na enumeração de *L. monocytogenes* em pedaços de carne de peru embalados a vácuo durante armazenamento a 4°C. No 14º dia, um maior número de *L. monocytogenes* foi observado no Ágar Trypticase de soja (ATS) quando comparado com o ágar LPM. Porém, no dia 28º de estocagem, a contagem foi estatisticamente similar nos meios ATS, MOX e LPM. Em relação aos meios de cultura testados, o ATS e MOX foram os mais eficientes no isolamento do patógeno.

No trabalho realizado por Loessner et al. (1988), a eficiência de sete meios de plaqueamento, incluindo a formulação original do “McBride *Listeria* Agar” (com glicina); “Modified McBride Agar” contendo glicina anidra (MMA) e o ágar “Lithium Chloride Phenylethanol Moxalactam” (LPM); para a enumeração de *Listeria* spp. foi avaliada. Um total de 66 organismos foram utilizados incluindo 11 *L. monocytogenes* e cinco outras *Listeria* spp. Para as cepas de *L. monocytogenes* todos os meios de plaqueamento demonstraram performance similar. Somente o ágar LPM inibiu os 50 microrganismos não *Listeria*, incluindo cinco fungos, obtendo a melhor performance na inibição de outros microrganismos que não *Listeria*. De acordo com os resultados obtidos, o ágar LPM foi, em geral, o melhor dos sete meios testados para enumeração de *Listeria* spp. em culturas puras e mistas, embora este meio tenha inibido a *L. grayi* e *L. murrayi*. Além disso, cepas de *S. aureus* foram controladas pelo ágar LPM enquanto que todas as três cepas de *S. aureus* testadas cresceram nos ágares MMA e MA. O “McBride *Listeria* Agar” contendo glicina anidra (MMA) foi menos seletivo do que a formulação original.

Silva et al. (1998), compararam a eficiência de dois meios de plaqueamento: ágar MOX e ágar PALCAM e, de acordo com seus resultados, o primeiro foi mais sensível e mais seletivo somente para as amostras de queijo que apresentavam

elevado nível de contaminação bacteriana. Para os outros queijos (maturados – menos contaminados), os dois meios apresentaram igual eficiência.

No trabalho desenvolvido por Pinto et al. (2001), onde comparou-se a eficácia dos meios “*L. monocytogenes* Blood Agar” (LMBA), “Oxford” e “PALCAM” na detecção de *L. monocytogenes* em alimentos naturalmente contaminados, foi observada uma baixa sensibilidade dos meios “Oxford” e “PALCAM”. Isto ocorreu, possivelmente, devido à maior concentração de cloreto de lítio nestes dois ágaros quando comparados ao LMBA, ou devido à presença de acriflavina e outros agentes seletivos nestes dois ágaros, mas não no LMBA.

Lund et al. (1991) compararam a eficiência de quatro meios seletivos de plaqueamento: MMA, LPM, Oxford e PALCAM. Nos ágaros “Oxford” e “PALCAM” foram obtidos um maior número de amostras positivas para *Listeria*, enquanto o ágar MMA apresentou menor eficiência no isolamento de *Listeria* spp. em amostras de leite cru.

Heisick et al. (1989), através da metodologia do “FDA”, isolaram *Listeria* spp. a partir de diversos tipos de vegetais. No ágar LPM obtiveram maior percentual de isolamento (11,4%) deste gênero bacteriano quando comparado com o meio MMA (8,6%).

Lee e McClain (1986) compararam o crescimento de diferentes bactérias no meio LPM e MMA. O ágar LPM inibiu o desenvolvimento da maioria das cepas bacterianas que não eram *L. monocytogenes*. Além disso, o ágar LPM foi avaliado em relação à capacidade de recuperação de *L. monocytogenes* inoculadas a 20 até 40 UFC/25g de carne. *L. monocytogenes* foi recuperada a partir do ágar LPM, mas não do ágar MMA. O meio LPM controlou o crescimento de diversas bactérias e preservou a formação de colônias de *L. monocytogenes*.

Rodrigues et al. (2003) compararam a eficiência de três ágaros para o isolamento de *L. monocytogenes*: LPM, PALCAM e ágar hemolítico ceftazidima cloreto de lítio (AHCL) a partir de diferentes amostras colhidas em uma linha de processamento de “nuggets” congelados de frango. O meio AHCL foi mais eficaz que os outros dois, sendo que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos nos meios LPM e PALCAM.

Swaminathan et al. (1988), compararam quatro meios de plaqueamento seletivos incluindo os ágaros LPM e MMA quanto à eficiência no isolamento de *L. monocytogenes* em amostras de queijo brie. Três cepas de *L. monocytogenes*

pertencentes ao sorotipo 1/2 a foram parcialmente ou completamente inibidas no ágar LPM. Uma cepa do sorotipo 1/2 a formou microcolônias no MMA depois de 48 h de incubação.

4.2 LISTERIOSE

4.2.1 Epidemiologia

O meio científico foi despertado para o perigo da listeriose durante a década de 80, quando uma série de surtos ocorreram na América do Norte e Europa; e a *Listeria monocytogenes* foi responsável por várias formas de listeriose humana. A partir de 1988, principalmente nos países da Europa Central, pesquisadores passaram a investigar a listeriose como doença de origem alimentar (FABER; PETERKIN, 1991; OLIVEIRA, 1993).

A listeriose humana é uma doença esporádica observada durante todo o ano, com pico de incidência nos meses mais quentes. Epidemias focais têm sido associadas ao consumo de leite, queijo, carne inadequadamente cozida, vegetais crus não lavados e repolho contaminados (MURRAY, op. cit.).

A morbidade é variável com a espécie, podendo apresentar-se como doença individual esporádica ou como surto epidêmico, com casos endêmicos. A letalidade também é variável, ficando geralmente entre 20-50% (CORRÊA; CORRÊA, 1992). A incidência da doença é baixa, porém, é uma enfermidade importante por sua alta letalidade (ACHA; SZYERES, 2001).

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 consequência da colonização do trato intestinal (FRANCO e LANDGRAF, 1996; OLIVEIRA, op. cit.).

Os bovinos, ovinos e muitas outras espécies de animais eliminam o agente etiológico com as fezes. Além disso, têm-se isolado *L. monocytogenes* de fezes de homem doentes e seus contaminantes, assim como de uma pequena população humana em geral (ACHA; SZYERES, op. cit.).

O estado portador assintomático, bem como a doença, é bem documentada em humanos e outros mamíferos. Embora se desconheça a ocorrência do estado portador, estima-se que o estado de portador fecal seja de 1 a 5% nos indivíduos saudáveis (MURRAY, op. cit). Segundo Jay (2005), embora estes microrganismos sejam bastante comuns em amostras ambientais também existem em humanos saudáveis em uma taxa de 1 a 15%.

A *L. monocytogenes* está distribuída em populações animais saudáveis e a enfermidade pode desenvolver-se devido a fatores de estresse, com diminuição da resistência do hospedeiro (ACHA; SZYERES, op. cit.).

A listeriose possui uma ampla variedade de hospedeiros animais tanto domésticos como silvestres. A infecção foi comprovada em grande número de mamíferos domésticos e silvestres, em aves, e inclusive em animais poiquilotermos. As espécies domésticas mais susceptíveis em ordem decrescente de importância são: ovina, caprina e bovina (ibid).

Com exceção da listeriose neonatal, que é transmitida da mãe para o feto, as outras formas de listeriose são provavelmente adquiridas pelo contato direto com animais doentes ou seus excrementos, possivelmente pela inalação de poeira ou ingestão de alimentos contaminados (CASTRO, 1989).

A transmissão da *Listeria* spp. pode ocorrer tanto por contato direto quanto indireto com fontes contaminadas; por via oral, ocular, cutânea, respiratória e urogenital. O organismo pode estar presente em secreções oculares, nasal e purulenta da epiderme e na urina, placenta de bovino infectado; outros tecidos contaminados, fezes e sangue. Porém, a transmissão por alimentos parece ser a forma mais importante (MARTH, 1988; SILVA, 1996).

O encontro do agente causal no sêmen de um homem cuja esposa possuía os órgãos genitais infectados, indicaria que, em alguns casos, a infecção pode produzir-se por via genital (ACHA; SZYERES, op. cit.).

É provável que muitos casos de origem alimentar não sejam diagnosticados devido ao prolongado período de incubação da doença, razão pela qual os enfermos não associam um alimento com sua infecção (GELIN; BROOME¹, 1989 apud ACHA; SZYERES, op. cit.)

¹ GELLIN, B. G.; BROOME, C. V. Listeriosis. *JAMA*. v. 261, p. 1313-1320, 1989.

4.2.2 Características da doença

4.2.2.1 Nos homens

O primeiro surto epizootico em 1924 aconteceu em coelhos de um laboratório na Inglaterra que sofriam da enfermidade caracterizada por mononucleose, de onde deriva o nome específico do agente (*L. monocytogenes*). A mononucleose ocorre raramente em humanos e em outros animais, exceto coelhos e roedores (ACHA; SZYERES, op. cit.).

A listeriose no organismo humano e no animal tem um quadro diferente da maioria das outras doenças enquadradas como enfermidades cujos agentes etiológicos são transmitidos por alimentos. Isto se deve à natureza intracelular facultativa do seu agente causal que rompendo as células produz septicemia, o que propicia a infecção de tecidos normalmente não afetados, como o sistema nervoso central, a placenta e o útero gravídico (CASTRO, op. cit.; FABER; PETERKIN, op. cit.; FRANCO; LANDGRAF, op. cit.; LOVETT; TWEDT, 1988; MARTH, op. cit.).

A infecção ocorre em qualquer faixa etária, sendo sua ocorrência maior em recém nascido, crianças, pessoas idosas e pacientes com problemas imunológicos. Nestes a mortalidade é bastante alta, em média 70% (CASTRO, op. cit.).

A listeriose invasiva é uma infecção de origem alimentar com alta morbidade e mortalidade em adultos que adquirem meningoencefalite e, em recém nascidos que desenvolvem uma síndrome de septicemia severa (SCHLECH, 1996).

Em mulheres grávidas produz geralmente sintomas de gripe, mas pode haver invasão do feto e, dependendo do estágio em que a gravidez se encontra, pode ocorrer aborto, parto prematuro, nascimento de natimorto, septicemia neonatal ou meningite no recém nascido (FRANCO; LANDGRAF, op. cit; SILVA, 1996).

O aborto listérico na mulher ocorre geralmente na segunda metade da gravidez, com mais frequência no terceiro trimestre. Os sintomas que precedem em alguns dias ou semanas ao aborto ou ao parto podem consistir em calafrios, aumento da temperatura corporal, ligeira irritação e às vezes sintomas gastrointestinais (ACHA; SZYERES, op. cit.).

Foram descritas duas formas de doença neonatal: a doença de início precoce, adquirida por via transplacentária no útero, e a doença de início tardio, adquirida por ocasião do nascimento ou logo depois. A doença de início precoce, também

denominada de granulomatose infanti-séptica, é uma doença devastadora associada a uma elevada taxa de mortalidade, a não ser que seja imediatamente tratada. A doença caracteriza-se pela formação de abscessos disseminados e granulomas em múltiplos órgãos. A doença de início tardio ocorre dentro de duas a três semanas após o nascimento na forma de meningite ou meningoencefalite com septicemia (MURRAY, 2000). A hidrocefalia é uma seqüela comum da meningite neonatal (ACHA; SZYERES, op. cit.).

A listeriose perinatal de início precoce é uma infecção transplacentária, onde o recém nascido desenvolve uma severa septicemia caracteriza por formação de granulomas nas vísceras. É geralmente desenvolvida por uma septicemia na mãe, sendo caracterizada por uma doença parecida com gripe, com resolução espontânea logo após o parto, não requerendo o uso de terapia. Febre, calafrios e mialgia são os sintomas mais comuns descritos na mãe. Na listeriose perinatal de início tardio, a doença apresenta-se como uma síndrome neonatal na forma de meningite. Neste caso, a mãe apresenta-se infectada, geralmente bem antes do parto, e o recém nascido é colonizado pela *Listeria monocytogenes* durante o parto (SCHLECH, op. cit.).

Segundo Acha; Szyeres (2001), a taxa de letalidade do recém nascido com septicemia listérica é alta, sendo a principal lesão uma necrose hepática focal, em forma de pequenos nódulos branco-acinzentados.

Nos casos de comprometimento do sistema nervoso central, 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, op. cit)

A meningite constitui a forma mais comum de infecção por *Listeria* spp. em adultos. Embora os sinais e sintomas clínicos da meningite causada por este microrganismo não sejam específicos, deve-se suspeitar sempre da presença de *Listeria* spp. em pacientes submetidos a transplantes de órgãos, pacientes com câncer ou mulheres grávidas com desenvolvimento de meningite (MURRAY, 2000). O tempo de incubação usual em adultos varia de uma a várias semanas (JAY, 2005).

A listeriose quase sempre ocorre devido a uma predisposição imunológica do paciente. Os adultos com meningoencefalite desenvolvem dor de estômago, febre e ficam com confusão mental (SCHLECH, op. cit.).

A ingestão de alimentos contaminados com *Listeria* spp. é particularmente perigosa para gestantes, recém nascidos, indivíduos com síndrome de imunodeficiência adquirida, portadores de carcinomas ou de outras doenças imunocomprometedoras ou usuários de medicamentos que provoquem comprometimento do sistema imunológico. (FRANCO; LANDGRAF, op. cit.; HOBBS e ROBERTS, 1992)

Quando há modificação da flora intestinal pelos mais diversos motivos, há maior colonização de *Listeria* spp. nos intestinos; há penetração da bactéria através do epitélio intestinal, multiplicação dos mesmos na submucosa e penetração nos vasos sanguíneos, se generalizando para todo o organismo (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

Os sintomas nos adultos variam consideravelmente nos estágios finais da doença. Os sintomas iniciais são geralmente similares aos da influenza, seguido por dor severa de estômago, dores nos membros, frio, altas temperaturas, pescoço duro, náusea, vômito e fotofobia. O paciente fica sonolento e isto é intermitente, porém crescem freqüentemente casos de coma e delírio antes da morte. (VARNAM; EVANS, 1996)

Em humanos, a listeriose não se caracteriza por um único grupo de sintomas visto que o curso da enfermidade depende do estado de higidez orgânica do hospedeiro. Indivíduos e mulheres saudáveis que não estão grávidas são muito resistentes à infecção por *L. monocytogenes*, existindo poucas evidências de que estas pessoas tenham contraído a listeriose clínica. No entanto, as condições que se seguem são conhecidas por predispor a listeriose adulta e por propiciar alta taxa de mortalidade: neoplasias, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), alcoolismo, diabetes (em particular a do tipo 1), enfermidades cardiovasculares, transplantes renais e terapia com corticóides. Quando adultos susceptíveis adquirem a listeriose, a meningite e a septicemia são os sintomas mais comumente relatados. O controle de *L. monocytogenes* no organismo é realizado pelos linfócitos T e macrófagos ativados. Sendo assim, qualquer situação adversa que afete essas células exacerbará o curso da listeriose. (JAY, 2005)

4.2.2.2 Nos bovinos

Em geral, e do mesmo modo que ocorre nas pessoas, os estudos realizados com cobaia confirmam que os animais com transtornos do sistema imune têm um grau de sensibilidade à *L. monocytogenes* maior do que os animais saudáveis. (JAY, 2005)

De acordo com Acha e Szyeres (2001), nos ruminantes a listeriose se manifesta clinicamente por encefalite, mortalidade neonatal e septicemia, sendo a primeira, a forma clínica mais comum nestes animais. A encefalite pode afetar animais de qualquer idade, porém é mais comum nos primeiros três anos de vida. Nos bovinos, a encefalite listérica apresenta um curso mais crônico e os animais sobrevivem de quatro a 14 dias. Em geral, não são afetados mais de 8 a 10% dos animais do rebanho.

De acordo com Corrêa e Corrêa (1992), a listeriose pode ocasionar aborto, principalmente em ruminantes, e doença septicêmica em neonatos, o que mostra sua transmissão placentária; e eventualmente há mastite listérica em ruminantes. Segundo Acha e Szyeres (2001), a septicemia é mais freqüente em animais jovens do que em adultos. O aborto se apresenta sobre toda, e nos últimos meses da gestação e como regra geral, é o único sintoma da infecção genital, sem que se notem sinais de enfermidade na mãe. Pode haver retenção de placenta e metrite; a *L. monocytogenes* também pode causar mastite em vacas.

A mastite por *Listeria* spp. varia em severidade, desde a forma subclínica até a aguda ou crônica. A eliminação do agente pelo leite é prolongada e pode ter repercussões em saúde pública, sobretudo porque a pasteurização não oferece garantia quando o número deste microrganismo no leite é alto antes do processo térmico (GITTER², 1980 apud ACHA; SZYERES, op. cit.).

Os sintomas clínicos normalmente aparecem depois de um período de incubação de um a três dias, podendo apresentar distúrbios neurológicos os quais resultam em movimentos circulares. A temperatura do corpo é geralmente elevada e alguns animais podem desenvolver conjuntivite variando de acordo com o tecido lesionado. No estágio avançado da doença, a visão e a locomoção são difíceis e o animal demonstra irritabilidade. Neste ponto, a doença pode ser confundida com a

² GITTER, M.; BRADLEY, R.; BLAMPIED, P. H. *Listeria monocytogenes* infection in bovine mastitis. *Vet. Rec.*, v.107, p. 390-393, 1980.

raiva. Por fim, o animal vem ao coma e geralmente ao óbito em um a dois dias. (RYSER; MARTH, 1991)

O ruminante com encefalite se isola do rebanho, apresenta sintomas depressivos, febre, incoordenação, torcicolos, contrações espasmódicas e paralisia dos músculos faciais e da garganta, salivação abundante, estrabismo e conjuntivite. O animal caminha em círculos e em fase final da doença fica em decúbito e quando consegue comer, faz movimentos de mastigação característicos (ACHA; SZYERES, 2001).

Clinicamente, em animais jovens (cabritos, borregos, bezerros e leitões), a forma mais comum é a septicêmica, febril, às vezes diarréica, às vezes pneumônica, com desenvolvimento fatal em três a cinco dias e letalidade muito alta, maior que 50%. Animais que apresentam sinais clínicos e não morrem em até dez a 15 dias sobrevivem e ficam imunes (CORRÊA; CORRÊA, op cit).

O neonato pode se contaminar por duas vias: transplacentária ou durante o nascimento, no conduto do parto. Os que contraem a infecção durante o parto têm com grande frequência listeriose nervosa; na infecção transplacentária, a listeriose é freqüentemente generalizada, e o animal apresentará focos granulomatosos em vários órgãos, inclusive no fígado, baço, pulmões e no sistema nervoso central (ibid).

A *L. ivanovii*, que se diferencia de *L. monocytogenes* por várias características fenotípicas, foi relacionada, em vários países, com abortos em ovinos e ocasionalmente com abortos em vacas (ALEXANDER³ et al., 1992 apud ACHA; SZYERES, 2001).

4.2.3 Medidas de controle da listeriose

De acordo com Acha e Szyfres (1986), para prevenir infecções de origem alimentar por *L. monocytogenes*, é necessário que haja um controle no local de processamento do alimento, pois além de ser amplamente encontrado na natureza, este microrganismo se desenvolve em uma ampla faixa de temperatura e pH, sendo uma das células vegetativas de maior resistência térmica. Entre as medidas de controle destacam-se: limpeza e sanificação dos equipamentos; impedimento da entrada de animais, poeira e insetos na indústria; evitar contaminação cruzada dos

³ ALEXANDER, A. V. et al. Bovine abortions attributable to *Listeria ivanovii*: four cases (1988-1990). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v. 200, p. 711-714, 1992.

produtos; implantação do sistema de Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle (APPCC), Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Procedimentos Padrões de Higiene Operacional (PPHO) para um eficiente controle de qualidade da indústria.

As mulheres que nos últimos meses de gestação manifestem sintomas parecidos com os da influenza, devem ser examinadas com cuidado e, se necessário, devem ser tratadas com antimicrobianos (ACHA; SZYERES, 2001).

É recomendado que as instalações dos animais, durante os surtos, sejam desinfetadas com creolina ou lysoform a 3%, aos quais a *Listeria* spp. é bastante sensível (CORRÊA; CORRÊA, op. cit.).

Como as listerias são ubíquas e a maioria das infecções é esporádica, a prevenção e o controle tornam-se difíceis. Todavia, as pessoas de alto risco (por exemplo mulheres grávidas, indivíduos imunocomprometidos, pessoas idosas) devem evitar a ingestão de alimentos crus de origem animal ou parcialmente cozidos, como também queijos moles e vegetais crus não- lavados. Não existe vacina, e a antimicrobianoterapia profilática para pacientes de alto risco ainda não foi avaliada (MURRAY, op. cit.).

Segundo Corrêa e Corrêa (1992), no campo não se deve manipular aborto que ocorra durante ou logo após o surto, não manusear metrites sem luvas, não tomar leite de ruminantes afetados durante um mês, porque a *Listeria* spp. pode ser excretada com o leite sem mastite aparente.

4.3 *Listeria* spp. EM ALIMENTOS

Vem ocorrendo o aumento de interesse na presença ou ausência de *Listeria monocytogenes* em alimentos, devido à ocorrência de muitos surtos de listeriose de origem alimentar na América do Norte e Europa, com casos fatais variando em torno de 30%. Contagens acima de 10^6 por grama têm sido encontradas em queijos moles e patês de carne. Em uma grande proporção de alimentos são comumente encontrados pequenos números de *L. monocytogenes*, porém a maioria das legislações estipulam como tolerância microbiológica a ausência de *L. monocytogenes* em 25 g de alimento (HARRIGAN, 1998).

O primeiro caso de listeriose humana foi denunciado em 1929, e desde então se tem comprovado que esta enfermidade se apresenta esporadicamente em todo o

mundo. *L. monocytogenes* é o agente etiológico de aproximadamente 98% dos casos que ocorrem em pessoas e 85% dos casos que ocorrem nos animais. Pelo menos três casos de enfermidade em pessoas foram causados por *L. ivanovii* e somente um por *L. seeligeri* (JAY, 2005).

A ampla distribuição de *Listeria* spp. na natureza e nas fezes dos animais explica que sua presença em carnes cruas é quase inevitável. A presença em carnes cruas pode variar de zero a 68%. A carne suína é a mais contaminada, porém, também é freqüente a contaminação de carne crua de aves. Existe pouca informação sobre a virulência das cepas de *L. monocytogenes* isoladas de carnes (JOHNSON et al.⁴, 1992 apud ACHA; SZYERES, 2001)

No estudo realizado por Yucel et al. (2005), 146 amostras de carnes (bovina inteira e moída e de frango) cruas e cozidas, foram analisadas em relação à presença de *Listeria* spp. Destas, 79 amostras (54,10%) apresentaram-se contaminadas por *Listeria* spp., sendo que a maior ocorrência de isolamento (86,4%) ocorreu na carne bovina moída crua. *L. monocytogenes* foi isolada em nove das 79 amostras (6,16%), sendo *L. innocua* isolada em maior número de amostras, 68 amostras (46,57%).

De um total de 400 amostras de carne moída bovina (211) e suína (189), Fantelli e Stephan (2001) isolaram 43 cepas de *L. monocytogenes* (10,75%). Destas, 19 cepas pertenciam ao sorotipo 1/2a, duas ao sorotipo 1/2b, 12 ao sorotipo 1/2c e dez ao sorotipo 4b.

Silva et al. (2004), isolou *Listeria* spp. em 100% das 41 amostras de lingüiças mistas do tipo frescal examinadas. Dentre as diferentes espécies, *L. innocua* foi isolada com maior freqüência (97,6% das amostras) seguida por *L. monocytogenes* (29,3%) e *L. welshimeri* (24,4%).

De 63 amostras de carcaças de frango analisadas em Portugal, todas apresentavam-se contaminadas com *Listeria* spp., sendo que 26 amostras (41%) foram positivas para *L. monocytogenes* (ANTUNES et al., 2002).

De acordo com os resultados obtidos por Bersot et al. (2001), das 30 amostras de mortadela analisadas, 11 (36,7%) foram positivas para *Listeria* spp., sendo oito (26,7%) para *L. monocytogenes*.

⁴ JOHNSON, J. L. DOYLE, M. P.; CASSENS, R. G. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products. A review. *J. Food Protect.* v. 53, p. 81-91, 1990.

Na pesquisa realizada por Gonçalves (1998), das 40 amostras de carne de frango congeladas, foram isoladas 246 cepas de *Listeria* spp., sendo 52 cepas de *L. monocytogenes*, três de *L. ivanovii*, 24 de *L. seeligeri*, 35 de *L. innocua* e 132 de *L. welshimeri*. Das cepas de *L. monocytogenes*, 51,9% pertenciam ao sorotipo ½ b, 30,8% ao 4 b e 17,3% ao ½ c.

Araújo (1998), encontrou em 80 % das amostras de “blanquet” de peru fatiado e em 90 % das amostras de presunto de peru fatiado contaminação por *Listeria* spp. Destas, 52 cepas eram *L. monocytogenes*, sendo 51,9%, 34,6%, 7,7%, 5,8%, pertencentes as sorotipos 4b, 1/2c, 1/2b e 1/2a, respectivamente.

No trabalho desenvolvido por Mena et al. (2004), vários tipos de produtos alimentícios foram analisados quanto a presença de *L. monocytogenes* em Portugal. Das 1035 amostras (leite, carne, peixes crus, e alimento termicamente processados e fermentados), 72 (7,0%) foram positivas para *L. monocytogenes*. Das 17 amostras de carne bovina crua, 3 (17,7%) foram positivas para *L. monocytogenes*. Na carne de frango crua eles obtiveram maior número de amostras positivas (60%) comparando-se com os alimentos analisados.

Kasnowski (2004) isolou um total de 173 cepas de *Listeria* spp. de amostras de carne bovina (alcatra). 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.

No trabalho realizado por Samadpour et al. (2006) de um total de 512 amostras de carne moída analisadas através da “Polymerase Chain Reaction” (PCR) seguido pela confirmação da cultura, 18 (3,5%) foram positivas para *L. monocytogenes*.

Vitas et al. (2004) investigaram a presença de *Listeria* spp. num total de 3685 amostras obtidas no Norte da Espanha. As amostras analisadas incluíam produtos crus (carne, leite e frango) e produtos processados (carne curada e cozida, vegetais congelados e salmão defumado). A maior ocorrência de *Listeria* spp. foi encontrada em amostras de carne de frango crua (76,3%) seguidas por amostras de carne moída vermelha bovina e suína (62,3%). Similarmente, a maior ocorrência de *L. monocytogenes* foi detectada nestes produtos (36,1% e 34,9% respectivamente). *L. innocua* (13,0%) e *L. monocytogenes* (8,3%) foram as espécies mais

extensivamente distribuídas nos produtos em geral. Das 295 amostras de carne bovina e suína crua, 103 (34,9%) apresentaram-se contaminadas com *L. monocytogenes*, 103 (34,9%) com *L. innocua*, 45 (15,1%) com *L. welshimeri* e quatro (1,6%) com *L. seeligeri*.

Listeria spp. vem sendo isolada de uma grande variedade de fontes, e em muitas situações *L. innocua* é mais comumente encontrada do que *L. monocytogenes*, conforme descrevem os pesquisadores: Lund et al. (1991); Petran; Swanson (1993); Sireli; Erol (1999) e Yucel et al. (2004).

Os autores Duffy et al. (2001), Kamat; Nair (1996) e Petran; Swanson (1993) realizaram experimentações “in vitro”, com o intuito de relacionar a presença de *L. innocua* com a de *L. monocytogenes* e tentar explicar o porque da maior frequência de isolamento de *L. innocua* nos alimentos.

Lund et al. (1991) analisaram amostras de leite cru quanto à presença de bactérias do gênero *Listeria*. A ocorrência de *Listeria* spp. foi 28%, sendo 3% *L. monocytogenes*, 26,7% *L. innocua* e 1,7% *L. welshimeri*.

Yucel et al. (2004) isolaram 8,25% de *L. monocytogenes* de três tipos de carne crua: carne moída, carne de frango e carne bovina. Das nove cepas de *L. monocytogenes*, duas foram obtidas a partir das amostras de carne moída, cinco da carne de frango e duas da carne bovina. Em relação às outras espécies isoladas, 90% eram *L. innocua* e 1,2% *L. welshimeri*. Das 98 cepas de *L. innocua*, 49, 26 e 23 foram isoladas das amostras de carne moída, carne de frango e carne bovina, respectivamente.

Sireli e Erol (1999), examinaram 100 amostras de carne moída em Ankara, Turquia quanto à presença e grau de contaminação com *Listeria* spp. O método utilizado para o isolamento e identificação deste gênero bacteriano foi o do “United States Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service” (“USDA-FSIS”). Diferentes espécies de *Listeria* foram isoladas em 97% das 100 amostras analisada. *L. innocua* foi a espécie prevalente (92%), seguida pela *L. monocytogenes* (28%), *L. murrayi* (10%), *L. grayi* (9%), *L. seeligeri* (3%) e *L. welshimeri* (2%). *L. ivanovii* não foi detectada nas amostras testadas. Estes resultados confirmam estudos prévios de que a carne moída é uma das maiores fontes de *Listeria* spp. e pode ser um perigo em potencial principalmente para os consumidores desta carne crua ou mal cozida.

4.3.1 Regulamentações sobre *L. monocytogenes* em alimentos

O governo dos EUA tem a legislação mais rígida, na qual *L. monocytogenes* tem sido considerada como um adulterante. Isso significa que qualquer alimento pronto para o consumo que contenha este microrganismo pode ser considerado adulterado e, desta forma, está sujeito a recolhimento ou substituição. O requerimento dos EUA é a ausência do microrganismo em amostras de 50 g (JAY, 2005).

A directiva da comunidade Européia sobre leite e derivados estabeleceu tolerância zero para *L. monocytogenes* em queijos moles e ausência do microrganismo em 1 g para os demais produtos. Em contrapartida, a visão na Alemanha é que a tolerância zero não é somente irreal, mas também desnecessária, sendo os alimentos classificados em quatro níveis de risco semelhantes às directivas estabelecidas pelo Canadá: produtos que contêm mais de 10^4 /g são sujeitos ao recolhimento automático (ibid).

No Brasil, não há um limite específico para *L. monocytogenes* estipulado para carne moída crua, entretanto, de acordo com a Resolução RDC n° 12 (BRASIL, 2001), são considerados produtos em condições sanitárias insatisfatórias aqueles cujos resultados analíticos estão acima dos limites estabelecidos para amostra indicativa ou amostra representativa, ou aqueles cujos resultados analíticos demonstram a presença ou a quantificação de outros microrganismos patogênicos ou toxinas que representem risco à saúde do consumidor.

Segundo Jay (2005), a Comissão Internacional em Especificações Microbiológicas para Alimentos ("International Commission on Microbiological Specifications for Foods" – "ICMSF") parece ter concluído que, se esse microrganismo não exceder 100 UFC/g de alimento, este pode ser considerado aceitável para indivíduos que não fazem parte do grupo de risco.

4.4 USO DE SULFITO DE SÓDIO EM CARNES FRESCAS

Existem oito compostos nos quais os sulfitos são encontrados como conservantes: dióxido sulfúrico (SO_2), sulfito sódico (Na_2SO_3), bissulfito sódico (NaHSO_3), bissulfito de potássio (KHSO_3), metabissulfito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$),

metabissulfito de potássio ($K_2S_2O_5$), bissulfito de cálcio e sulfito ácido de cálcio. Os sulfitos, bissulfitos e metabissulfitos são formas químicas secas do gás dióxido sulfúrico (TELLES FILHO, 2006).

4.4.1 Finalidade

De acordo com a Portaria nº540 (BRASIL, 1997), aditivo alimentar é todo e qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Ao agregar-se poderá resultar em que o próprio aditivo ou seus derivados se convertam em um componente do alimento. A definição não inclui os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais. De acordo com o Decreto-Lei 986 (BRASIL, 1969), aditivo incidental é toda substância residual ou migrada, presente no alimento em decorrência dos tratamentos prévios a que se tenham submetidos a matéria-prima alimentar e o alimento “in natura” e do contato do alimento com os artigos e utensílios empregados nas suas diferentes fases de produção, manipulação, embalagem, estocagem, transporte ou venda.

Aditivo incidental é uma terminologia em desuso sendo substituída pela definição de contaminantes que consta do item 1.4 da Portaria nº 540 (BRASIL, 1969) : Contaminante: é qualquer substância indesejável presente no alimento como resultado das operações efetuadas no cultivo de vegetais, na criação de animais, nos tratamentos zoo ou fitossanitários, ou como resultado de contaminação ambiental ou de equipamentos utilizados na elaboração e/ou conservação do alimento.

O dióxido de enxofre, sulfitos, bissulfitos, metassulfitos de sódio e potássio são empregados como agentes inibidores de fungos, leveduras e bactérias numa infinidade de produtos, tais como vinhos, frutos e vegetais desidratados. Chegou-se a conclusão de que o sulfito residual, presente em algumas caseínas comercialmente aproveitáveis, era responsável pela decomposição da timina (vitamina B1) durante o armazenamento sob temperatura ambiente. Além disso,

altos níveis de dióxido de enxofre nas dietas podem produzir efeitos inesperados em animais de laboratório. O uso de sulfitos em carnes e derivados, assim como em peixes, restaura sua cor original, dando a aparência de produtos frescos. Por esse motivo, foi proibido pela legislação (SIMÃO, 1986).

Além de sua ação contra os microrganismos, os sulfitos atuam como antioxidantes, inibindo especialmente as reações de escurecimento produzidas por certas enzimas em alimentos, principalmente nos vegetais e crustáceos. Para esta finalidade, seu uso é permitido em conserva vegetal, em azeitonas de mesa, em cefalópodes congelados e em crustáceos. Também pode ser utilizado para melhorar o aspecto da carne e dar impressão de maior frescor, mas esta última prática é considerada fraude ao enganar o consumidor a respeito da qualidade real do produto (BIOAPLICACIONES ALIMENTARIAS Y MEDIOAMBIENTALES, 2005).

Os sulfitos estão presentes naturalmente em vários alimentos e são utilizados há séculos como potentes agentes redutores para vários produtos nutritivos visando inibir o processo oxidativo associado com a deterioração dos alimentos (prevenir ou reduzir a perda da cor) em frutas e vegetais como maçã seca, batatas lavadas e desidratadas, para mantê-los com aparência de "frescos" por longos períodos; prevenir a melanose em camarões e lagostas; impedir o crescimento bacteriano em alimentos e bebidas fermentados e manter a estabilidade e potência de certos medicamentos (TELLES FILHO, op. cit.).

4.4.2 Toxicidade

Segundo Ring, et al. (2001), as reações alérgicas por alimentos representam um problema atual e crescente na Medicina Clínica. Os sintomas de alergias originárias do alimento incluem reações de pele (urticária, angioedema, eczema), respiratórias (broncoconstrição, rinites), gastrointestinais (diarréia) e sintomas cardiovasculares tendo como a manifestação mais relevante o choque anafilático. Um aumento do número de casos incluindo fatalidades, devido à inadvertência em relação aos alérgenos alimentares tem sido reportado. Pseudo-reações alérgicas com sintomatologia clínica similares compreendem o uso de substâncias químicas com baixo peso molecular (substâncias preservativas, flavorizantes, aromatizantes etc). Para algumas delas, como no caso dos sulfitos, a detecção é possível. Em

alguns pacientes a alergia clássica de contato (eczema) pode ser elucidada depois de ingestão oral de alergênicos como sulfato de níquel.

De acordo com Telles Filho (2006), as reações aos sulfitos são doses dependentes e ocorrem cerca de cinco minutos após a inalação ou uso parenteral, e 30 minutos após a sua ingestão.

No organismo humano, o sulfito ingerido com os alimentos é transformado em sulfato por uma enzima responsável pela eliminação do sulfito produzido no próprio organismo durante o metabolismo dos aminoácidos que contém enxofre. Uma pequena porcentagem dos asmáticos, entre 3 e 8 %, é sensível aos sulfitos. Nas pessoas em que esta sensibilidade é mais elevada, os níveis presentes em alguns destes alimentos, nos quais é utilizado como conservante, são suficientes para produzir reações prejudiciais. Observou-se em alguns casos, outros tipos de reações frente aos sulfitos usados como aditivos alimentares, como manifestações cutâneas ou diarreia (BIOAPLICACIONES ALIMENTARIAS Y MEDIOAMBIENTALES, op. cit).

A reação adversa mais comum ao dióxido sulfúrico (SO₂) e a outros sulfitos no homem, é a broncoconstrição e o broncoespasmo, particularmente em um subgrupo de asmáticos sensíveis aos sulfitos, geralmente com asma severa. Cerca de 30% das reações são observadas em não asmáticos. Geralmente os pacientes com sintomas respiratórios ao poluente aéreo dióxido de enxofre são potencialmente mais suscetíveis aos sulfitos. Outras manifestações relatadas incluem anafilaxia, urticária, angioedema, rubor, hipotensão, náuseas, diarreia e parestesias (NIH 1984⁵, apud TELLES FILHO, op. cit.).

O estudo realizado por Asero (2005) representa uma confirmação de que o nitrato de sódio pode induzir ao prurido crônico além de mostrar pela primeira vez que uma outra categoria de aditivos de alimento, os sulfitos, pode ser associada com esta desordem. O autor ainda afirma que a intolerância ao aditivo alimentar deve ser considerado no diagnóstico diferencial dos pacientes com prurido crônico de origem desconhecida.

Simon (1986) relatou que os agentes derivados do sulfito utilizados inicialmente para controlar o crescimento microbiano em bebidas fermentadas foram estabelecidos como a causa de algumas reações que variam de suave a severo e

⁵ NIH1984. Adverse reactions to food. American Academy of Allergy and Immunology, Committee on Adverse Reactions to Food, National Institute off Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health. NIH Publication Np. 84-2442. 220 pp. Available from: US Government Printing Office, Washington, DC, USA.

mesmo por reações fatais em pelo menos 5% da população asmática. Outras reações relatadas após a ingestão do sulfito incluem anafilaxia, queixas gastrointestinais e erupções dermatológicas.

A probabilidade de uma reação ao sulfito é dependente da natureza do alimento, do nível de sulfito residual, da sensibilidade do paciente, e talvez do mecanismo de reação induzida pelo sulfito (TAYLOR et al., 1988).

4.4.3 Legislação

De acordo com a portaria nº540 (BRASIL, 1997), O uso dos aditivos deve ser limitado a alimentos específicos, em condições específicas e ao menor nível para alcançar o efeito desejado. A necessidade tecnológica do uso de um aditivo deve ser justificada sempre que proporcionar vantagens de ordem tecnológica e não quando estas possam ser alcançadas por operações de fabricação mais adequadas ou por maiores precauções de ordem higiênica ou operacional.

De acordo com a Portaria nº 1004 (BRASIL, 1998), onde consta a Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 - Carne e Produtos Cárneos, não é permitido o uso de qualquer aditivo (incluindo sulfito de sódio) em carnes frescas.

Considerando a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, visando a proteção à saúde da população, tornou-se indispensável o estabelecimento de regulamentos técnicos sobre aditivos em alimentos com vistas a minimizar os riscos à saúde humana. Regulamentos foram estabelecidos inicialmente pelo "FDA" e pela Comunidade Européia Econômica (EEC); no Brasil pela atual Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e mais recentemente pelo Mercosul, foram estabelecidas certas normas sobre os sulfitos, que vigoram até hoje (1): Proibiu-se o uso de sulfitos para a manutenção da cor e consistência de frutas e vegetais crus, e em alimentos reconhecidos como fonte de vitamina B₁, pois os sulfitos inativam a tiamina; (2) Obrigaram-se os fabricantes de alimentos e bebidas a incluir nos rótulos de seus produtos a presença de sulfitos quando de concentrações iguais ou superior a 10 ppm (ppm de SO₂ = miligramas de sulfito por quilograma de alimento). Infelizmente concentrações menores que 10 ppm estão isentas desta obrigação, embora sejam

capazes de desencadear crises de asma; (3) Os preservativos que contêm sulfitos são proibidos também nas carnes, pois são capazes de restaurar e manter a cor vermelha, dando o falso aspecto de “carne fresca”. Sua utilização na carne vermelha é também contra-indicada por ser uma fonte de tiamina. No Reino Unido são permitidos em lingüiças e hambúrgueres, respeitando-se um limite de 450 ppm. No Canadá os sulfitos são permitidos em aves domésticas (TELLES FILHO, op. cit.).

4.5 IRRADIAÇÃO DE ALIMENTOS

A segurança microbiológica de produtos alimentícios é garantida com doses de até 10 kGy. Considerando estas doses como pasteurizantes, a exemplo de outras metodologias, sua eficácia está vinculada à combinação de outros processos, como o uso de baixas temperatura pós irradiação (FERREIRA, 1999).

Para caracterizar as bactérias por sua sensibilidade à radiação dentro do limite de 10 kGy, utiliza-se a dose média letal (“Mean Lethal Dose” – MLD), que corresponde à dose requerida para eliminar 63% de uma população, deixando 37% de sobreviventes (D_{37}). A medida de sensibilidade à radiação mais comumente utilizada é a dose D_{10} , que é a dose necessária para eliminar 90% de uma população bacteriana (DIEHL, 1990).

Consideram-se as partículas alfa, beta, nêutrons, raios gama e raios X como sendo os principais tipos de radiação. Fontes radioativas emissoras das partículas alfa e beta não são normalmente empregadas para irradiação de alimentos, devido à baixa capacidade de penetração na matéria. Neutrons não podem ser utilizados pois sua interação com a maior parte dos elementos transforma-o em elementos radioativos (FERREIRA, op. cit.).

Os Raios X e gama são radiações eletromagnéticas semelhantes às ondas de rádio, TV, microondas, radiação infravermelha e ultravioleta, sendo que a diferença entre as radiações é o comprimento de onda com que se propagam. Os raios X e gama são bastante penetrantes e, dependendo de sua energia, atravessam com facilidade paredes, corpos e chapas metálicas. Os equipamentos de raios X foram as primeiras fontes empregadas para irradiação de alimentos, sendo descartados, devido a pequena potência das máquinas existentes. Com o advento dos reatores nucleares, a radiação gama proveniente principalmente do Césio-137 e do Cobalto-

60 passou a ser utilizada como principal fonte de radiação para a conservação de alimentos (ibid)

Normalmente, quanto maior o número de microrganismos presentes no alimento, maior será a dose necessária à destruição; os microrganismos apresentam maior resistência quando irradiados em meios protéicos, em ausência de oxigênio ou ainda, em células desidratadas ou meios congelados (LANDGRAF, 1996)

Diferentes gêneros e inclusive diferentes cepas de uma mesma espécie, requerem diferentes doses para alcançar o mesmo grau de inativação. O comportamento de uma célula bacteriana, frente à irradiação, também depende do número e natureza dos radicais livres produzidos durante o processamento e da capacidade de tolerância e reparo dos danos sofridos durante a irradiação, da mesma forma que ocorre com outros métodos de conservação de alimentos (FERREIRA, op. cit.).

Durante a fase de latência, os microrganismos tendem a ser mais resistentes à irradiação e gradativamente vão se tornando mais sensíveis à medida que progridem na fase logarítmica, voltando a ser evidenciada resistência na fase estacionária, ao contrário do que se verifica numa curva normal de crescimento. (DIEHL, op. cit.; LANDGRAF, op. cit.).

Entre as bactérias mais radorresistentes encontram-se as *Pseudomonas* spp. e *Enterobacteriaceae*. Com doses na faixa entre 1 a 5 kGy houve sobrevivência de bactérias Gram-positivas, induzindo a deterioração dos alimentos irradiados após prolongado período de estoque refrigerado (OSLON, 1998).

De acordo com alguns estudos a alta resistência ao calor não necessariamente implica em mais alta resistência à radiação, a exemplo da *Moraxella-Acinetobacter*, bactéria não esporulada altamente resistente à radiação, porém facilmente inativada pelo calor, em contraste com o *Bacillus stearothermophilus* que é bastante resistente ao calor e menos radorresistente (DIEHL, op. cit.).

Tem sido sugerido que para os microrganismos mais resistentes, a irradiação poderia resultar em produção de mutantes aumentando concomitantemente a virulência destes. Porém, existe consenso entre os especialistas neste campo, que embora seja verdade que o uso da irradiação tenha levado à descoberta de organismos radorresistentes, não existem registros da formação de uma espécie superior nem por seleção nem por mutação (FERREIRA, op. cit.).

Diehl (1990) destaca que é bem conhecido que as radiações ionizantes podem aumentar a taxa de mutação de bactérias e outros microrganismos, porém, tem sido bastante documentado que a irradiação induz à perda de virulência e de infectibilidade de microrganismos mutantes e estes quando formados, passam a ter menor possibilidade de sobrevivência.

A eficiência da irradiação em produtos de origem animal (carne cozida, ovos fritos e presunto) para inativação de *L. ivanovii* e outros patógenos, foi observada por Jo et al. (2005). De acordo com os seus resultados, o valor de D_{10} para *L. ivanovii* foi de $0,24 \pm 0,02$. Na dose de 3 kGy não foram detectadas células viáveis.

No trabalho desenvolvido por Lee et al (2006), onde foram investigados os efeitos da irradiação em patógenos presente em vegetais prontos pra comer, o número de *L. ivanovii* foi reduzido em torno de quatro casas decimais quando submetido a 2 kGy de irradiação, e quando esta dose aumentou para 3 kGy, o número deste microrganismo ficou abaixo do limite de detecção.

Na pesquisa desenvolvida por Kim et al. (2006), a irradiação a 1 kGy reduziu o número de *L. ivanovii* inoculada em alface congelado abaixo do limite de detecção.

De acordo com Roberts e Weese (1995) a irradiação de carnes frescas na dose de até 3 kGy em combinação com a manipulação, processamento, e armazenamento apropriados eliminam eficazmente mais de 99% de bactérias da espécie *L. monocytogenes*.

No estudo realizado por Samelis et al. (2005), foram irradiadas aparas de carnes congeladas contaminadas artificialmente com *L. monocytogenes* a 0 kGy, 2 e 4 kGy. Posteriormente, estas aparas serviriam como matéria-prima na produção de lingüiças fermentadas. A irradiação das aparas a 2 kGy reduziu 1,3 log UFC/g da contaminação inicial de *Listeria* da lingüiça, enquanto que a dose de 4 kGy reduziu 2,4 log UFC/g da contaminação por *Listeria* spp.. A população do inóculo de *Listeria* spp. em amostras de lingüiças não irradiadas foi em torno de 5,9 log UFC/g, enquanto a respectiva população em amostras irradiadas a 2 e 4 kGy foi menor: 1,3 e 2,4 log UFC/g, respectivamente. Embora a irradiação tenha reduzido significativamente a contaminação por *Listeria* spp. na lingüiça preparada com aparas tratadas, este tratamento foi insuficiente para eliminar completamente este microrganismo até mesmo com a maior dose testada (4 kGy).

Foley et al (2001) investigaram o efeito da irradiação em refeições preparadas contaminadas com *L. monocytogenes*. As doses utilizadas foram 0,8; 2,9 e 5,7 kGy,

sendo que o tratamento com 0,8 kGy não foi eficiente, pois somente reduziu 1 log da contagem bacteriana. A dose de 2,9 kGy reduziu 5 log do patógeno, e somente a dose de 5,7 kGy foi eficiente para eliminar a população de *L. monocytogenes* inoculada na concentração de 2×10^9 células/mL.

A irradiação é particularmente válida como um procedimento de descontaminação. O tratamento por radiação a doses entre 2 e 7 kGy (dependendo das condições de irradiação e do alimento) podem eficientemente eliminar bactérias potencialmente patogênicas, não formadoras de esporos incluindo *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* ou *Escherichia coli* O157:H7 de produtos alimentícios suspeitos sem alterar as características sensoriais, nutricionais e as qualidades técnicas dos mesmos (FARKAS, 1998).

Os pesquisadores Lebepe et al. (1990) e Fu et al. (1995), relataram que a *L. monocytogenes* resistiu a doses de 3 kGy e 2 kGy respectivamente, quando testada em amostras de carne suína.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATERIAL PERMANENTE

- Autoclave
- Destilador
- pHgâmetro
- Termômetro
- “Stomacher”
- Estufa a 30°C
- Geladeira
- Fogão
- Bico de Bunsen
- Contador de colônia
- Microscópio Óptico
- Microscópio Estereoscópico

5.2 MATERIAL DE CONSUMO

- “Eppendorf”
- Placa de Petri esterilizadas descartáveis

- Sacos de “stomacher”
- Algodão
- Indicador de pH
- Álcool a 70%
- Papel toalha
- Meios de cultura :

Caldo UVM

Solução Salina Peptonada

Caldo Frasier

ágar MOX

ágar LPM

ágar MMA

Caldo Trypticase de soja com 0,6% de extrato de levedura

ágar Trypticase de soja com 0,6% de extrato de levedura

Caldo Vermelho de fenol

Carboidratos: Glicose, Xilose, Manitol, Maltose, Ramnose

Caldo Nitrato

Caldo Uréia

ágar Motilidade

“Triple Sugar Agar” (TSI)

Sangue desfibrinado de coelho

- Reagentes:

Verde malaquita

Hidróxido de potássio

Alfa naftol

Ácido sulfanílico

Alfa naftilamina

Zinco em pó

Cristal violeta

Fucsina

Lugol

Sulfito de sódio

- Vidraria:
Becker, balão, erlenmeyer, funil, tubos, lamina, bastão de vidro
- Outros materiais:
Alça e agulha de platina, pipetador automático

A vidraria utilizada foi previamente esterilizada em estufa a 170°C por uma hora e as soluções e meios de cultura foram preparados e esterilizados em autoclave, conforme suas respectivas especificações.

5.3 AMOSTRAGEM

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).

Foram obtidas 30 amostras de carne bovina pré-moída em estabelecimentos comerciais incluindo supermercados e açougues em áreas de diferentes níveis sociais do município de Niterói, RJ. As análises bacteriológicas foram realizadas no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal, da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF), onde foram realizados o isolamento, a identificação das bactérias do gênero *Listeria*, e o teste de sensibilidade aos antimicrobianos. No Laboratório de Controle Físico-Químico de Produtos de Origem Animal, localizado na mesma faculdade, foi realizado o procedimento de detecção de sulfito de sódio nas amostras. O processo de irradiação foi realizado na Coordenação dos Programas de Pós-graduação de Engenharia (COPPE) na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e a identificação sorológica das cepas de *Listeria* spp. isoladas foi feita na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

5.4 METODOLOGIA

5.4.1 Isolamento e identificação de bactérias do gênero *Listeria*

A técnica utilizada foi baseada na metodologia revisada do “USDA-FSIS” (MC CLAIN; LEE, 1988) que inclui um enriquecimento primário, enriquecimento secundário e plaqueamento, com modificações pelo uso dos três meios de plaqueamento: “Lithium Chloride Phenylethanol Moxalactam Agar” (LPM), “Modified McBride Agar” (MMA) e “Modified Oxford Agar” (MOX), não utilizando somente o ágar MOX. Foram utilizados 25 g de cada amostra para realização da análise.

5.4.1.1 Enriquecimento primário e plaqueamento

No enriquecimento primário o meio de cultura utilizado foi o “UVM Modified *Listeria* Enrichment Broth” denominado caldo de enriquecimento primário (LEB 1) no volume de 225 mL, homogeneizado com 25 g da amostra no “stomacher” durante dois minutos. A incubação foi a 30 °C por 24 horas. A peptona, o extrato de carne e o extrato de levedura no caldo UVM modificado fornecem o nitrogênio, as vitaminas e os minerais. O cloreto de sódio mantém o balanço osmótico do meio. O fosfato age como agente tamponante. O ácido nalidíxico inibe o crescimento de organismos Gram-negativos e o hidróxido cloreto de acriflavine inibe muitas bactérias Gram-positivas. A esculina é hidrolizada por espécies de *Listeria*.

Após a incubação, uma alíquota de 1,0 mL do LEB 1 com o cultivo, foi transferida para o tubo contendo 4,5 mL de solução de hidróxido de potássio (KOH) a 0,25%. Este foi homogeneizado por um minuto e partindo desta suspensão foram inoculadas placas contendo ágar LPM, MMA e MOX, com auxílio de alça de platina. O ágar base LPM (DIFCO) foi adicionado com solução de moxalactam a 0,01% para fornecer o meio LPM, e foi, separadamente, suplementado com cicloheximida a 0,2% para originar o meio MMA. O ágar MOX foi adicionado com “*Listeria* Selective Supplement” – “Oxford Formulation” (SR 140E), que é composto por cicloheximida (200 mg), sulfato de colistina (10 mg), acriflavina (2,5 mg), cefotetan (1 mg) e fosfomicina (5 mg). Outras placas contendo estes meios de cultura foram semeadas

diretamente com o LEB 1 com o cultivo, com auxílio de alça de platina. Todas as placas foram incubadas a 30°C por 24 a 48 horas.

De acordo com Varnan e Evans (1996), as colônias de *Listeria* spp. em ágar LPM e MMA devem ser observadas com auxílio do microscópio estereoscópico, com iluminação indireta, e possuem a aparência cristalina com a coloração variando de azul-acinzentado a azul-esverdeado. Entretanto, as colônias em ágar MOX são reconhecidas através de uma coloração preta ou marrom escura devido à hidrólise da esculina, não sendo necessária a utilização de iluminação especial.

5.4.1.2 Enriquecimento secundário e plaqueamento

No enriquecimento seletivo foi utilizado o Caldo Fraser suplementado com “Fraser Selective Supplement” – (SR 156E), que contém ácido nalidíxico (10 mg), acriflavina (12,5 mg) e citrato férrico amoniacal (250 mg). A seletividade deste caldo é fornecida pela presença do cloreto de lítio, do ácido nalidíxico e da acriflavina na fórmula. A tolerância elevada ao sal pela *Listeria* spp. é usada como meio para inibir o crescimento de *Enterococcus* spp. A diferenciação entre as demais bactérias é auxiliada pela inclusão de citrato férrico amoniacal no meio final. Como todas as espécies de *Listeria* hidrolizam a esculina, a adição de íons férricos ao meio detecta a reação. O escurecimento do meio pelas culturas que contêm as bactérias que hidrolizam a esculina é o resultado da formação de 6,7-dihydroxycoumarin que reage com os íons férricos.

Após a incubação, uma alíquota de 0,1 mL do cultivo em LEB 1 foi transferida para o tubo contendo 10 mL de cultivo em Caldo Fraser, sendo incubado a 30°C por 24 horas. Após a incubação, uma alíquota de 1 mL de Caldo Fraser foi transferida para o tubo contendo 4,5 mL de solução de KOH a 0,25%, sendo homogeneizado por um minuto. Partindo desta solução, com auxílio de alça de platina, foram semeadas placas contendo ágar LPM, MMA e MOX. O plaqueamento direto também foi realizado a partir do cultivo em Caldo Fraser sem prévia passagem na solução de KOH a 0,25% e todas as placas foram incubadas a 30°C por 24 a 48 horas.

Nas 22 primeiras amostras analisadas foi comparada a eficiência dos três meios de plaqueamento: MOX, LPM e MMA. Porém, nas oito amostras restantes, somente comparou-se dois meios de plaqueamento: MOX e LPM, devido a

impossibilidade financeira na aquisição do agente seletivo cycloheximide utilizado no meio MMA.

As colônias típicas obtidas e isoladas dos meios sólidos oriundas tanto do enriquecimento primário como do secundário foram visualizadas e selecionadas com auxílio de microscópio estereoscópio (LOVETT, 1988) e transferidas para placas contendo ágar Trypticase de soja (MERCK 5458) com 0,6% de Extrato de Levedura (MERCK 3753). Estas placas foram incubadas a 30°C durante 24h e após este período de incubação as colônias crescidas foram observadas em microscópio estereoscópio para a certificação da pureza das colônias. Os subcultivos crescidos foram repicados para tubos contendo ágar Trypticase de Soja com 0,6% de Extrato de Levedura, incubados a 30°C por 24 horas e partindo dos subcultivos crescidos foram confeccionados esfregaços em lâmina, corados pelo método de Gram para a verificação das características morfotintoriais das bactérias (bastonetes pequenos e curtos, em cadeias curtas, paralelamente ou em forma de “V”, Gram positivos). Também foi realizada a prova da catalase nos tubos contendo os cultivos através da adição de 1mL de água oxigenada a 3%. O teste da catalase foi considerado positivo quando ocorreu efervescência sobre o crescimento bacteriano. Para concluir o diagnóstico presuntivo do gênero *Listeria*, foi realizada a prova da motilidade em tubos contendo ágar motilidade, sendo que, o crescimento em forma de “guarda-chuva” caracterizou a prova como positiva.

As cepas isoladas foram, então, transferidas para tubos contendo Caldo Trypticase de Soja com 0,6% de Extrato de Levedura para posterior realização das provas bioquímicas.

A metodologia de isolamento de *Listeria* spp. utilizada está esquematizada na FIGURA 1 nos anexos.

5.4.1.4 Provas bioquímicas

O comportamento bioquímico das bactérias do gênero *Listeria* pode ser visualizado no QUADRO 1 contido nos anexos.

As provas bioquímicas foram baseadas no esquema proposto por Mac Faddin (1985) e Mc Clain e Lee (1988) para a identificação da espécie como: prova da catalase, teste de motilidade, comportamento em ágar tríplice açúcar ferro, redução

do nitrato a nitrito, produção da urease, prova do vermelho de metila, Voges-Proskauer, fermentação de carboidratos, prova da hidrólise da esculina, teste de hemólise e “Camp-test”.

A partir dos subcultivos dos tubos de Caldo Trypticase de Soja com 0,6% de Extrato de Levedura foram realizadas as seguintes provas bioquímicas:

- Comportamento em ágar tríplice açúcar ferro

Repicou-se as cepas em profundidade e em estria na superfície do ágar tríplice açúcar ferro (Merck 3915). O período de incubação foi de 24 a 48 h a 30°C. Quando houve acidificação da base e da superfície do meio, sem produção de gás e H₂S, a prova foi considerada positiva para bactérias do gênero *Listeria*.

- Redução do nitrato a nitrito

Prepararam-se tubos contendo 5 mL de caldo nitrado (Merck 10204) que foram inoculados com a cepa em estudo e incubados por 24 h à temperatura de 30°C. Após este período, adicionou-se 0,1 mL das soluções A e B do reativo de Gries-Ilosvay (Merck 9023) em 0,1 mL do cultivo crescido. O teste é considerado positivo quando ocorre o aparecimento de coloração rosa ou avermelhada. Acrescentou-se zinco em pó após a interpretação para a confirmação do resultado.

- Produção de urease

A cepa em estudo foi inoculada em caldo uréia (Merck 8483) incubado a 30°C por 48 h. A bactéria produtora de urease, hidrolisa a uréia presente no meio de cultura originando radicais alcalinos e o meio adquire coloração avermelhada pela viragem do indicador vermelho de fenol. A prova é considerada negativa quando não houve viragem do indicador (microrganismo não produtor de uréase – *Listeria* spp.)

- Prova do vermelho de metila

O meio de cultura utilizado para esta prova foi o caldo MR-VP (Merck 5712) em tubos que foram semeados com a cepa em estudo e incubados a 30°C durante 96h. Após este período de incubação foram adicionadas três a cinco gotas da solução de Vermelho de Metila e o aparecimento de uma coloração vermelha caracteriza a prova como positiva.

- Prova de Voges-Proskauer

Do cultivo de 48 h do Caldo MR-VP retirou-se uma alíquota de 1,0 mL que foi transferida para tubo de ensaio esterilizado. Adicionou-se neste tubo 0,2 mL da solução de Hidróxido de Potássio a 40 % e 0,6 mL da solução de Alfa-naftol a 5%.

Aguardou-se durante 30 minutos, a produção de coloração vermelha caracteriza a prova como positiva, caso contrário esta é considerada negativa.

- Fermentação de carboidratos

Nesta prova foi utilizado como meio base o caldo púrpura de bromocresol (Merck 3032) adicionado dos seguintes carboidratos: glicose, manitol, maltose, xilose e rhamnose na concentração final de 1%. A esterilização do tubo contendo este caldo foi a 121°C durante 15 minutos, com exceção dos tubos contendo xilose e rhamnose que foram esterilizados a 121°C durante 10 minutos. As provas são consideradas positivas quando houver viragem do indicador púrpura de bromocresol e a coloração do meio, originalmente púrpura tornar-se amarela.

- Prova da hidrólise da esculina

O meio de cultura utilizado nesta prova foi o ágar esculina (DIFCO 0879-01-7). A cepa em estudo foi semeada com auxílio de alça de platina em placa contendo o ágar esculina. A incubação foi realizada a 30°C durante 24 a 48 horas. Ao crescer, a bactéria que hidrolisa a esculina confere às colônias uma coloração escura.

- Teste de hemólise

Para este teste foram preparadas placas contendo ágar tripticase de soja com 0,6% de extrato de levedura e 5% de sangue estéril disfibrinado de carneiro. As placas foram semeadas com as cepas em identificação e incubadas em estufa a 35-37°C durante 48 horas. Após incubação, verificou-se ao redor do crescimento a presença ou não de halo de hemólise. (FIGURA 9)

- “CAMP-test”

Uma cepa de *Staphylococcus aureus* beta hemolítico (ATCC 25923 – INCQS –RJ) e uma cepa de *Rhodococcus equi* (ATCC 6939) foram semeadas verticalmente em linhas paralelamente opostas com auxílio de alça de platina em ágar tripticase de soja com 0,6% de extrato de levedura e 5% de sangue estéril disfibrinado de carneiro. As cepas de *Listeria* spp. em estudo foram semeadas em linhas horizontais, perpendicularmente a uma distância de 1-2 mm dos cultivos de *S. aureus* e *R. equi*. As placas foram incubadas por 24 horas a 35°C e após este período observa-se a presença de zonas de hemólise. O teste é considerado positivo para *L. monocytogenes* quando o cultivo em estudo produzir zonas de hemólise em forma de seta próximas ao crescimento de *S. aureus*. Na FIGURA 5, 6 e QUADRO 2 contidos nos anexos constam o “CAMP-test” e o comportamento das espécies de *Listeria* no referido teste.

Os cultivos identificados como *Listeria* foram repicados em caldo triptose e caldo BHI com 10% de glicerol, incubados a 35°C por 24 horas, sendo o primeiro mantido em geladeira a 4°C e o caldo BHI com 10% de glicerol congelado, para posterior realização da sorologia na FIOCRUZ e antibiograma.

5.4.2 Identificação sorológica

O processo de caracterização antigênica das cepas isoladas de *L. monocytogenes* 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 do Donker-Voet (1959) e Seeliger e Höhne (1979).

5.4.3 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

A sensibilidade das cepas de *Listeria* isoladas nas análises bacteriológicas foi determinada, segundo a metodologia do “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS, 2003). Esse método é recomendado pelo “Center for Disease Control” dos Estados Unidos, por fornecer resultados correlacionáveis com as concentrações inibitórias mínimas sangüíneas e urinárias de humanos.

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado em todas as seis cepas de *L. monocytogenes* isoladas, em todas as quatro cepas de *L. innocua* não tipável isoladas, em todas as sete cepas de *L. innocua* 6b identificadas e em sete cepas de *L. innocua* 6a.

As cepas isoladas, biotipificadas e sorotipadas, em estoque, foram mantidas em meio ambiente durante 30 minutos, sendo, após este tempo semeadas em ágar tripticase de soja com 0,6% de extrato de levedura e incubadas a 30°C por 24 horas. Os subcultivos crescidos foram homogeneizados em água destilada esterilizada, padronizando-se a suspensão para uma turvação igual ao padrão número um da escala de Mc Farland: 1 mL de cloreto de bário (BaCl₂) a 1% + 99mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 1% (0,36N) que corresponde a 3,8x10⁸ microrganismos por mililitro. Placas contendo ágar Müeller Hinton, após serem retiradas da geladeira, foram incubadas a 37°C durante 1 hora antes da semeadura e mantidas em

temperatura ambiente por 3 a 5 horas, sendo repicadas utilizando-se um “swab” esterilizado embebido com o inóculo, para o espalhamento homogêneo na superfície do meio.

Após a absorção do inóculo por alguns minutos, foram colocados os polisensidiscos 15 (série Gram-positivo) da marca DME com auxílio de uma pinça previamente flambada e resfriada. Após a colocação dos discos, as placas foram incubadas a 30°C durante 24 horas.

O resultado foi determinado a partir da mensuração do tamanho da zona de inibição com um halômetro e na classificação das cepas em sensíveis, moderadamente sensíveis, intermediárias ou resistentes de acordo com o diâmetro da zona padrão estabelecida na tabela para cada antimicrobiano.

5.4.4 Determinação qualitativa de sulfito em amostra de carne fresca (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985)

Foram transferidas 3,5 g da amostra homogeneizada para um becker e adicionados 0,5 mL da solução de verde malaquita a 0,02%. Com auxílio de uma espátula, a amostra foi misturada à solução reagente, durante um a dois minutos. Na presença de sulfito de sódio na amostra de carne, este descora a solução de verde malaquita. Na ausência de sulfito, a amostra adquire uma coloração verde azulada.

5.4.5 Contagem de *L. monocytogenes* em carnes moídas irradiadas adicionadas com diferentes concentrações de sulfito de sódio

Uma amostra de 1Kg de carne pré-moída bovina foi obtida no comércio varejista nas condições oferecidas ao consumo. Posteriormente, no laboratório de Controle Microbiológico da UFF, foi dividida em 30 subamostras de 10 g cada, as quais foram acondicionadas em sacos esterilizados de “stomacher”. As subamostras foram submetidas a diferentes doses de irradiação por Cobalto 60, realizada na Coordenação dos Programas de Pós-graduação de Engenharia (COPPE) localizada na Universidade Federal do Rio de Janeiro. Dez subamostras (grupo 1) sofreram

irradiação a 4,0 kGy, outras dez (grupo 2) a 5,7 kGy e as 10 subamostras restantes (grupo 3) a 7,0 kGy, por tempo previamente determinado.

Após o tratamento, uma amostra representativa de cada grupo (1,2 e 3) foi examinada bacteriologicamente, com o intuito de verificar a eficácia do processamento na eliminação de bactérias do gênero *Listeria*. Para isto, utilizou-se 90 mL do caldo UVM (enriquecimento primário), incubado a 30°C por 24 h. Após este período, foram inoculadas placas contendo ágar MOX, e 1 mL do inóculo foi transferido para 10 mL do meio de enriquecimento secundário (Caldo Fraser) adicionado com o agente seletivo SR143. As placas e os tubos contendo o caldo Fraser foram incubadas a 30°C por 24 h. Posteriormente, a partir do Caldo de enriquecimento secundário, foram semeadas placas com ágar MOX e incubadas sob as mesmas condições citadas. As colônias características de *Listeria* spp. oriundas das placas dos grupos 1, 2 e 3, foram semeadas em ágar Trypticase de soja com 0,6% de extrato de levedura e incubadas a 30°C por 24 h para posterior realização do teste presuntivo: esfregaço em lâmina corado pelo método de Gram, prova da motilidade e prova da catalase. A preparação das amostras para o processo de irradiação e o teste para a verificação da eficiência deste processamento estão ilustrados na FIGURA 2 nos anexos.

A preparação do cultivo de *L. monocytogenes* 4 b isolada das amostras de carnes pré-moídas desta pesquisa, foi realizada de acordo com a solução padrão de Mc Farland 1. A cepa isolada e tipificada sorologicamente, foi semeada em ágar Trypticase de Soja com 0,6% de Extrato de Levedura e incubada a 30°C por 24 horas. O subcultivo crescido foi homogeneizado em água destilada esterilizada, padronizando-se a suspensão para uma turvação igual ao padrão número um da escala de Mc Farland 1, que corresponde a $3,8 \times 10^8$ microrganismos por mililitro.

As subamostras oriundas do grupo 2 foram utilizadas para observar a ação antilisterial do sulfito de sódio. A cada 10 g de amostra foram adicionados 90 mL de Solução Salina Peptonada a 0,1% (SSP) e homogeneizados em "stomacher". Posteriormente, inoculou-se, em cada sacola de "stomacher", 1 mL da cultura de *L. monocytogenes* 4 b (10^8 UFC/mL) previamente preparada. Diferentes concentrações de sulfito de sódio da marca Reagen foram adicionadas nas sacolas contendo as subamostras a saber: 0,01; 0,04; 0,08; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 g. Uma subamostra serviu como padrão (controle positivo), sendo somente inoculada com *L. monocytogenes* e não com o sulfito de sódio.

As misturas permaneceram 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período, foram realizadas diluições consecutivas com SSP a 0,1% de 10^{-1} a 10^{-3} . Logo após, 0,1 mL da mistura de cada subamostra e de cada diluição foram semeadas em placas esterilizadas descartáveis sendo, posteriormente, adicionado o meio ágar MOX através do método de profundidade em placas. Após a solidificação do meio, as placas inoculadas foram incubadas a 30°C durante 48 h. Esta metodologia (experimento 1) é ilustrada na FIGURA 3 nos anexos.

As subamostras do grupo 3 foram utilizadas para novo experimento, com maiores concentrações de sulfito de sódio e maior período de incubação da mistura. Além disso, a SSP a 0,1% foi substituída por água destilada esterilizada de acordo com o trabalho desenvolvido por Vignolo et al (1998). As concentrações de sulfito utilizadas foram: 0,5; 1; 2; 3; 5; 7; 10 e 15 g. A mistura foi incubada a 30°C por 24h. Somente após a incubação, procederam-se as diluições (10^{-1} até 10^{-10}) com água destilada esterilizada e semeadura nas placas. Este segundo experimento está ilustrado na FIGURA 4 contida nos anexos.

5.4.6 Análise estatística

Para análise estatística dos resultados utilizou-se a análise estatística descritiva simples que constou de percentuais, gerando tabelas e gráficos.

6 RESULTADOS

As tabelas e gráficos utilizados na demonstração dos resultados desta pesquisa encontram-se nos Apêndices, no item 10.

Das 30 amostras de carnes pré-moídas analisadas, 15 (50%) apresentaram contaminação por *Listeria* spp. Das amostras positivas para *Listeria* spp., duas (6,7%) foram positivas para *L. monocytogenes*. Na TABELA 1 encontra-se o número de amostras positivas de acordo com as espécies de bactérias do gênero *Listeria*.

Ao total, foram isoladas 83 cepas de *Listeria* spp. Destas, 6 (7,23%) eram *L. monocytogenes* e 77 (92,8%) *L. innocua*. Os sorotipos de *L. monocytogenes* isolados foram : 4b (50%), 1/2 (16,7%) e 1/2 c (33,3%); e os sorotipos de *L. innocua* encontrados nas carnes pré-moídas foram: 6a (85,7%), 6b (9,1%) e não tipável (5,2%). A relação do número de cepas dos diferentes sorotipos isolados está disposta na TABELA 2.

Do total de 83 cepas de *Listeria* spp. isoladas, apenas quatro cepas de *Listeria innocua* e nenhuma *L. monocytogenes* foram detectadas no enriquecimento primário da metodologia do USDA, enquanto que no enriquecimento secundário foram isoladas 73 e seis cepas de *Listeria innocua* e *L. monocytogenes*, respectivamente.

No enriquecimento primário com prévia passagem pela solução de KOH, nenhuma cepa foi detectada. Sem prévia passagem por esta solução, quatro cepas de *Listeria innocua* e nenhuma de *L. monocytogenes* foram isoladas. No enriquecimento secundário, 36 e duas cepas de *Listeria innocua* e *L. monocytogenes*, respectivamente foram detectadas com prévia passagem na solução de KOH, ao passo que 37 cepas de *Listeria innocua*, sendo quatro de *L.*

monocytogenes foram isoladas sem a passagem por esta solução. Ao total, 38 cepas de *Listeria* spp. foram isoladas a partir do plaqueamento com prévia passagem pelo KOH e 45 sem prévia passagem. Nas TABELAS 3, 4 e 5 e nos GRÁFICOS 1 e 2 estão representados estes resultados.

No enriquecimento primário, somente no meio de plaqueamento ágar MOX foram isoladas quatro cepas de *Listeria innocua* e nenhuma de *L. monocytogenes*. Entretanto, no enriquecimento secundário, a partir das 22 primeiras amostras, foram isoladas 37 (90,2%), 4 (9,7%) e nenhuma cepa de *Listeria innocua* no ágar MOX, MMA e LPM respectivamente. A *L. monocytogenes* foi observada em número de cinco (83,3%) no ágar MOX, um (16,7%) no ágar LPM, e nenhuma no ágar MMA. Nas TABELAS 6 e 7 consta o número de cepas isoladas nos respectivos meios de plaqueamento com e sem prévia passagem pela solução de KOH e os GRÁFICOS 3, 5 e 6 ilustram tais resultados.

Ainda no enriquecimento secundário, a partir das oito últimas amostras analisadas (amostras 23 a 30), isolaram-se 19 cepas (59,4%) de *Listeria innocua* no ágar LPM e 13 (40,6%) no ágar MOX. A *L. monocytogenes* não foi detectada nestas últimas amostras. Na TABELA 8 e GRÁFICO 7 constam estes resultados.

Em relação à presença de sulfito de sódio nas carnes bovinas pré-moídas, das 30 amostras analisadas, 17 (56,7%) foram positivas no teste qualitativo para sulfito. Este resultado é encontrado na TABELA 9 e a FIGURA 11 nos anexos ilustra o resultado do teste qualitativo para o sulfito. *Listeria* spp. foi isolada a partir de amostras com e sem sulfito de sódio em número de 54 e 23 cepas, respectivamente. Entretanto, *L. monocytogenes* somente foi detectada em amostras que não apresentavam sulfito, em número de seis cepas. Pode-se visualizar estes resultados na TABELA 10.

Na verificação da eficácia do processo de irradiação na eliminação de bactérias do gênero *Listeria*, dos três grupos de subamostras submetidos a diferentes doses de irradiação, a leitura após 48 h de incubação das placas de ágar MOX oriundas do enriquecimento primário e secundário foi negativa para os três representantes dos grupos. Entretanto, as mesmas permaneceram incubadas por mais de 48 h, quando, então, as placas oriundas somente do enriquecimento secundário apresentaram crescimento bacteriano.

Nas placas do grupo 1 (4kGy) houve crescimento de duas colônias características de *Listeria* spp., no ágar MOX (FIGURA 8, nos anexos). Entretanto,

as placas dos grupos 2 (5,7 kGy) e 3 (7 kGy) apresentaram formação de colônias brancas mucóides sem o halo de escurecimento ao redor. As três colônias oriundas dos três grupos cresceram no ágar Trypticase de soja com extrato de levedura com coloração característica (azuladas sob iluminação), apresentando motilidade positiva (formato de guarda-chuva), prova da catalase positiva e características morfotinturiais: cocobacilos Gram positivos, em paliçada e em formato de "V" (FIGURA 7, nos anexos). Estes resultados sugerem a resistência de *Listeria* spp. aos três níveis de irradiação utilizados no experimento.

No primeiro experimento com o sulfito de sódio realizado, onde utilizou-se concentrações de 0,01 a 2 g, e um período de incubação de 30 minutos em temperatura ambiente, houve um grande crescimento de *Listeria* spp. em todas as placas, sendo o resultado incontável, demonstrando que o sulfito administrado por 30 minutos não interferiu no crescimento de *L. monocytogenes* em carne moída bovina.

Os resultados obtidos no segundo experimento, onde se utilizou maiores doses de sulfito e maior período de incubação, encontram-se na TABELA 11 onde se pode observar que o sulfito de sódio não interferiu significativamente no crescimento de *L. monocytogenes*, visto que não houve uma redução constante no número de colônias crescidas à medida que a dose de sulfito aumentava.

O pH das amostras analisadas variou de 5,51 a 7,01. Na TABELA 12 pode-se observar os valores distribuídos em intervalos. Os valores máximo e mínimo de pH das amostras onde isolou-se *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* são visualizados na TABELA 13.

No teste de sensibilidade aos antimicrobianos, todas as cepas de *L. monocytogenes* isoladas foram resistentes aos seguintes antibióticos testados: gentamicina, cefoxitina, ampicilina, clindamicina, oxaciclina e sulfazotrim. Em 50% das cepas foram sensíveis a amicacina e a vancomicina; 33,3% foram sensíveis e 66,7% foram resistentes a tetraciclina, penicilina e cefalotina; 16,7% foram sensíveis e 83,3% resistentes a eritromicina. Em 50% das cepas testadas houve resistência ao cloranfenicol e a rifampicina; 33,3% das cepas foram sensíveis e 16,7% intermediárias. Em relação a ciprofloxacina, 66,6% das cepas isoladas foram resistentes, sendo 16,7% sensíveis e 16,7% com resistência intermediária. Estes resultados estão apresentados na TABELA 14 e GRÁFICO 4.

O comportamento das cepas de *L. innocua* 6 a, 6 b e não tipável frente aos antimicrobianos testados pode ser observado nas TABELAS 15, 16 e 17 respectivamente.

7 DISCUSSÃO

A carne pré-moída bovina é um alimento largamente consumido no País por ser rico em proteínas, de alto valor biológico, e ao mesmo tempo acessível financeiramente à população. Entretanto, como é um produto que foi submetido ao processo de moagem (possuindo uma maior área de superfície), manipulação, e mantido sob refrigeração até o momento de consumo, é um alimento que pode ocasionar enfermidades devido à alta possibilidade de veicular patógenos como a *L. monocytogenes*. Alguns Estados do Brasil, como o Espírito Santo, possuem culturas regionais onde é comum o consumo de kibe cru. Este alimento representa um perigo em potencial principalmente para os grupos de risco como mulheres grávidas, idosos, imunossuprimidos e crianças, visto que possibilita a sobrevivência de patógenos.

De acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa, 50% das amostras de carne moída bovina analisadas apresentaram-se contaminadas com *Listeria* spp. Este achado é compatível com o de Vitas et al. (2004) que encontraram 62,3% das amostras de carne moída bovina e suína no Norte da Espanha contaminadas com *Listeria* spp. Entretanto, no trabalho realizado por Sireli e Erol (1999), a ocorrência de *Listeria* spp. nas amostras de carne moída analisadas em Ankara foi de 97%. Yucel et al. (2005) também evidenciaram uma maior ocorrência de *Listeria* spp. em amostras de carne bovina moída crua (86,4%).

Nos achados deste experimento, um pequeno número de amostras, somente duas (6,7%) das 30 analisadas apresentaram-se contaminadas com *L. monocytogenes*. Yucel et al. (2005) também relataram uma baixa ocorrência desta espécie em carnes moídas e inteiras bovinas e carne de frango, onde somente

6,16% das amostras estavam contaminadas. Samadpour et al. (2006) observaram um número menor ainda de carnes moídas contaminadas com *L. monocytogenes* (3,5% das amostras analisadas). Entretanto, no trabalho desenvolvido por Mena et al. (2004), das 17 amostras de carne bovina crua, três (17,7%) foram positivas para *L. monocytogenes*, demonstrando uma maior ocorrência desta espécie bacteriana neste alimento. Os resultados de Vitas et al (2004) são similares aos de Mena et al (2004), visto que estes pesquisadores também encontraram *L. monocytogenes* em grande parte das amostras analisadas (34,9%).

Em relação ao número de cepas de *L. monocytogenes* isoladas, foram detectadas seis cepas (7,23%) nas amostras testadas. Resultados semelhantes foram encontrados por Fanteli e Stephan (2001) os quais encontraram somente 10,75% deste patógeno em carnes moídas bovinas e suínas e por Yucel et al. (2004) que isolaram 8,25% de *L. monocytogenes* a partir de três tipos de carne crua: carne moída e inteira bovina e carne de frango. No entanto, Sireli e Erol (1999) isolaram um maior número de *L. monocytogenes* de carnes moídas (28%). Kasnowski (2004) também encontrou um alto percentual (30,1%) de cepas de *L. monocytogenes* em carnes inteiras e moídas bovina.

A maior ocorrência de *L. innocua*, comparando-se com a *L. monocytogenes* em produtos alimentícios, vem sendo relatado por muitos pesquisadores. Neste procedimento analítico, somente duas espécies do gênero *Listeria* foram detectadas: *L. innocua* isolada em maior percentagem (92,8%) seguida por *L. monocytogenes* (7,23%). Yucel et al. (2004) obtiveram resultados similares, isolando 90% de *L. innocua* a partir de carnes bovinas moídas e inteiras e em carnes de frango. Sireli e Erol (1999) também encontraram elevada ocorrência de *L. innocua* (92%) analisando carne moída em Ankara, seguida pela *L. monocytogenes* 28% e 24% de outras espécies do gênero *Listeria*. Os resultados de Kasnowski (2004) corroboram com os citados, visto que isolou 70% de *L. innocua* a partir de carnes inteiras e moídas bovinas.

De acordo com Kamat e Nair (1996), *L. innocua* pode ser um organismo ideal e seguro como um marcador de *L. monocytogenes* em indústrias alimentícias visto que este microrganismo exibe a maioria das características da *L. monocytogenes* com exceção da não produção de hemolisina e da apatogenicidade. Estes pesquisadores demonstraram uma resposta comparativa entre as duas espécies de *Listeria* em caldo BHI ou em carne homogeneizada aos seguintes tratamentos: calor,

irradiação, ácido láctico e nitrato de sódio, o que possibilita o uso de *L. innocua* como um indicador biológico para verificar a eficiência destes tratamentos efetuados durante o processamento de produtos cárneos. Yucel et al (2005) também isolaram *L. innocua* em maior quantidade de amostras (46,57%) comparando-se com *L. monocytogenes*, a qual foi isolada em apenas 6,16% das amostras analisadas.

O crescimento de três cepas de *L. monocytogenes* inoculadas simultaneamente com *L. innocua* em meios de culturas e em amostras de queijo foi estudado por Petran, Swanson (1993). Os meios de cultura utilizados para a inoculação foram: Caldo Fraser, Caldo Trypticase de soja com 0,6% de Extrato de levedura (CTS) e Caldo UVM. O crescimento das duas espécies bacterianas foi similar no CTS ou nas amostras de queijo inoculadas. Porém, no Caldo Fraser e no Caldo UVM, a população de *L. innocua* foi significativamente maior do que a de *L. monocytogenes*. Isto ocorreu quando o meio foi inoculado individualmente ou simultaneamente com as duas espécies. Este fato explica, em parte, porque *L. innocua* é isolada mais freqüentemente de alimentos do que *L. monocytogenes*.

Por outro lado, Duffy et al (2001) não observaram diferenças significativas entre as duas espécies bacterianas quando inoculadas simultaneamente em dois tipos de caldos. Eles avaliaram se o tipo de meio de enriquecimento utilizado no isolamento de culturas mistas de *L. monocytogenes* com *Listeria* spp., em carne bovina (bife) poderia influenciar na freqüência de isolamento dos membros do gênero. Para isto, utilizaram-se os Caldos de enriquecimento UVM (seletivo) e Água Peptonada Tamponada (APT - não seletivo). Não houve diferença significativa do número de *L. monocytogenes* isoladas a partir do Caldo UVM ou a partir da APT, quando a mesma foi inoculada isolada ou juntamente com *L. innocua*.

Nesta dissertação, a tipificação sorológica das cepas de *L. monocytogenes* isoladas pertenciam aos sorogrupos: 4b (50%), seguida pelo sorotipo ½ c (33,3%) e ½ (16,7%). Kasnowski (2004) obteve resultados semelhantes, isolando 86,5% das cepas de *L. monocytogenes*, oriundas de carne bovina, pertencentes ao sorotipo 4b e 13,5% do sorotipo ½ b. De acordo com Jay (2005) o sorotipo 4b da *L. monocytogenes* é o mais envolvido com surtos de listeriose alimentar. Em contrapartida, Vitas et al. (2004) ao analisarem 103 amostras de carnes vermelhas positivas para *L. monocytogenes* em Navarra, observaram que 78,1% das cepas isoladas pertenciam ao sorogrupo 1, principalmente sorotipo ½ c, e 28,2% ao sorotipo 4, principalmente 4b, sendo que os casos clínicos observados em Navarra

no mesmo período do experimento eram ocasionados principalmente pelo sorotipo 4b. Fantelli e Stephan (2001) obtiveram resultados semelhantes aos de Vitas et al (2004), isolando maior quantidade do sorotipo 1 (76,7%) do que do sorotipo 4 b (23,25%).

No enriquecimento primário, nenhuma cepa de *L. monocytogenes* foi detectada neste trabalho. De acordo com McClain e Lee (1986), o caldo de enriquecimento primário - LEB I (12 mg acriflavina/L) suportou excelente crescimento de culturas puras de *L. monocytogenes*. Entretanto, quando eles enriqueceram amostras de carne com o mesmo meio, ocorreu a proliferação de organismos não-*Listeria*, os quais dificultaram a detecção de colônias de *L. monocytogenes* no ágar LPM. Todavia, com a adição de estágio de enriquecimento secundário (LEB II - 25 mg acriflavina/L) ocorreu a detecção de aproximadamente 42% mais amostras positivas do que o enriquecimento primário utilizado isoladamente.

No presente estudo, a *Listeria innocua* foi isolada em maior quantidade no enriquecimento secundário (73 cepas – 94,8%) do que no enriquecimento primário (4 cepas – 5,2%). Além disso, as cepas de *L. monocytogenes* somente foram isoladas a partir do enriquecimento secundário. Estes resultados corroboram com os encontrados por Gonçalves (1998) que obteve valores semelhantes ao comparar a eficiência do enriquecimento primário (Caldo UVM) com o enriquecimento secundário (Caldo Fraser) usando a metodologia do USDA no isolamento de *Listeria* spp., em amostras de frango congeladas. A pesquisadora supra-citada observou um maior isolamento de *Listeria* spp. a partir do enriquecimento secundário (135 cepas) quando comparado com o enriquecimento primário (75 cepas). *L. monocytogenes* também foi mais isolada no enriquecimento secundário do que no primário, 28 e 18 cepas respectivamente. Por outro lado, de acordo com Silva et al. (1998), o isolamento de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em diferentes tipos de queijo foi maior utilizando-se o enriquecimento primário (19,4%) do que no enriquecimento secundário (10,8%). Talvez o tipo de matriz (queijo) tenha influenciado nesta diferença de resultados obtidos com a carne bovina.

Com relação a passagem prévia pela solução de KOH, 45 (54,3%) cepas de *Listeria* spp. foram isoladas sem a prévia passagem por esta solução e 38 (45,8%) com prévia passagem. De acordo com os resultados obtidos por Gonçalves (1998) também não houve influência da passagem pela solução de KOH antes do

plaqueamento, visto que os resultados obtidos foram semelhantes nos dois métodos de isolamento (com e sem prévia passagem por esta solução).

Diversos meios de plaqueamento são utilizados no isolamento de *Listeria* spp. a partir de alimentos. No entanto, a eficiência do meio de plaqueamento depende não somente do tipo de amostra analisada como também da microbiota contaminante presente no alimento analisado. No presente trabalho, analisando-se amostras de carne moída bovina, isolou-se *Listeria* spp. no enriquecimento primário somente a partir do ágar MOX, em número de quatro cepas. Estes resultados obtidos estão de acordo com Gonçalves (1998) que após o enriquecimento primário (Caldo UVM) observou que no meio de plaqueamento ágar Oxford obteve um maior isolamento de cepas de *Listeria* spp. quando comparado ao ágar LPM e MMA, sendo 40, 26 e 9 cepas isoladas, respectivamente.

Comparando-se a eficiência de três meios de plaqueamento a partir das 22 primeiras amostras, após o enriquecimento secundário, observou-se, neste trabalho, que no ágar MOX obteve-se maior percentual de isolamento (90,2%) de *Listeria innocua* oriundas de amostras de carne moída bovina, seguido pelo ágar MMA com 9,7% e no ágar LPM não se obteve isolamento desta espécie bacteriana. Em relação ao isolamento de *L. monocytogenes* o ágar MOX também se destacou, onde cinco (83,3%) cepas foram isoladas, seguido, porém, pelo ágar LPM com apenas uma (16,7%) cepa, e nenhuma cepa foi isolada em ágar MMA.

Da mesma forma, Wederquiat et al. (1995) ao avaliarem cinco meios de plaqueamento incluindo os ágares MOX, Tripticase de Soja (ATS) e LPM, observaram que os meios ATS e MOX foram os mais eficientes no isolamento do patógeno a partir de pedaços de carne de peru embalados a vácuo. Os resultados de Lund et al. (1991) também confirmam a maior eficiência dos meios Oxford e PALCAM no isolamento deste gênero bacteriano em leite cru quando comparados com os ágares LPM e MMA, sendo este último o menos eficiente para este fim.

Porém, alguns pesquisadores notaram uma superioridade do ágar LPM em relação ao ágar MMA no isolamento de bactérias do gênero *Listeria*, como Cassidy et al. (1989) que comparando-se o meio LPM com o MMA no isolamento de *L. monocytogenes* em queijo brie e repolho cru, observou a superioridade do primeiro, assim como Loessner et al. (1988), quando comparou a eficácia destes dois meios de plaqueamento na recuperação de *Listeria* spp. a partir de culturas puras e mistas.

Heisick et al (1989) também observaram um maior percentual de isolamento de *Listeria* spp. (11,4%) pelo ágar LPM quando comparado com o ágar MMA (8,6%). Ao comparar o crescimento de diferentes bactérias no meio LPM e MMA, Lee e McClain (1986) concluíram que o ágar LPM inibiu o crescimento de bactérias que não listerias, possibilitando um maior isolamento deste gênero bacteriano quando comparado com o ágar MMA.

A partir das oito últimas amostras analisadas no presente estudo (amostras 23 até 30), após o enriquecimento secundário, comparando-se a eficiência de dois meios de plaqueamento: ágar MOX e LPM, isolou-se maior número de cepas de *Listeria innocua* a partir do ágar LPM (59,4%) seguido pelo ágar MOX (40,6%). Entretanto, *L. monocytogenes* não foi isolada nos meios testados. Resultados similares foram obtidos por Gonçalves (1998) que no plaqueamento posterior a fase de enriquecimento secundário, observou que com o ágar LPM obtinha um número de cepas isoladas superior ao ágar Oxford, sendo a diferença percentual de 38,5% e 33,3% respectivamente.

Muitos pesquisadores preocupam-se em encontrar a dose de irradiação necessária para a eliminação de bactérias patogênicas nos alimentos. Entretanto, os resultados obtidos por alguns autores são bastante controversos no que diz respeito a dose efetiva para a destruição de bactérias do gênero *Listeria*.

De acordo com os resultados obtidos neste experimento, pode-se observar que a irradiação das amostras com as doses de 4; 5,7 e 7 kGy, causou lesão subletal nas cepas de *Listeria* spp. presentes naturalmente na carne moída, pois não ocorreu desenvolvimento no enriquecimento primário seguido por plaqueamento no agar MOX, entretanto, após o enriquecimento secundário e plaqueamento, houve crescimento de colônias típicas e isoladas no agar MOX, sendo confirmadas por características morfológicas através de esfregaço em lâmina corado pelo método de Gram e verificação de cocobacilos Gram positivos em paliçada, em formato de V e em células isoladas. Logo, o processo de irradiação com aplicação de 4; 5,7 ou 7 kGy não foi suficiente para eliminar totalmente *Listeria* spp. em amostra de carne moída bovina contaminada naturalmente, mas diminuiu consideravelmente a população bacteriana presente.

Da mesma forma, Lebepe et al. (1990), observaram que *L. monocytogenes* presentes naturalmente em amostras de carne suína, resistiram a irradiação na dose de 3 kGy, sendo que este nível de irradiação somente diminuiu o número de *Listeria*

spp. presente no alimento. Samelis et al. (2005) também comprovou com seus resultados que a dose de até 4 kGy é insuficiente para eliminar completamente este microrganismo de aparas de carne congeladas. Fu et al. (1995) obtiveram resultados similares aos autores citados, ao inocular amostras de carne suína e de presunto curados com *L. monocytogenes* e submetê-las a baixas doses de irradiação (0,75 a 0,90 kGy) ou doses médias (1,8 a 2 kGy). A irradiação baixa foi efetiva na redução desta espécie bacteriana nos dois tipos de alimentos. A irradiação com doses médias reduziu em maior nível o número deste microrganismo, entretanto, não foi capaz de eliminar *L. monocytogenes*, visto que algumas células foram capazes de crescer quando a temperatura foi elevada para 25°C.

No entanto, Roberts e Weese (1995) afirmaram que a irradiação de carnes frescas na dose de até 3 kGy em combinação com a manipulação, processamento, e armazenamento apropriados eliminam eficazmente mais de 99% de bactérias da espécie *L. monocytogenes*. No estudo realizado por Foley et al. (2001), a dose de 5,7 kGy foi suficiente para eliminação da população de *L. monocytogenes* inoculadas em refeições preparadas, fato que não ocorreu no presente estudo. Farkas (1998) também descreve que doses entre 2 e 7 kGy podem ser eficientes na eliminação de bactérias patogênicas, incluindo *L. monocytogenes*, de produtos alimentícios suspeitos. Deve-se lembrar que o fator “matriz” deve ser considerado como um dos fatores interferente na eficiência da irradiação, o que corrobora para justificar as diferenças encontradas pelos diversos autores, em diferentes alimentos.

Das 30 amostras de carne pré-moída analisadas, 56,7% continham sulfito de sódio, sendo, portanto, impróprias para o consumo de acordo com a legislação. Este elevado índice de carnes fraudadas é preocupante, principalmente para pessoas sensíveis e alérgicas a este aditivo alimentar, visto que não se conhece a quantidade de sulfito administrada. Além disso, este alimento pode veicular grande quantidade de microrganismos patogênicos, principalmente os psicrotóxicos (*L. monocytogenes*), por possuírem a capacidade de se multiplicar em temperaturas baixas, onde as carnes pré-moídas estão armazenadas.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, o sulfito de sódio na concentração de até 15 g não inibiu consideravelmente o número de *L. monocytogenes* do sorotipo 4b inoculadas em amostras de carne moída irradiadas. Resultados semelhantes foram encontrados por Ryser e Marth (1989), os quais observaram que na concentração de 10 ppm de metil sulfito, dimetil sulfito ou metil

trissulfito falharam na inibição do crescimento de *L. monocytogenes*. Kyung e Fleming (1997) também concluíram que o dimetil sulfito na concentração de 500 ppm não foi inibitório para nenhuma das quinze espécies de bactérias testadas, incluindo *L. monocytogenes*. Nesta concentração, o dimetil sulfito retardou algumas, mas não preveniu o crescimento de nenhum dos microrganismos testados. O dimetil trissulfito, por sua vez, apresentou a concentração inibitória mínima (CIM) de 200 ppm para as bactérias.

Na pesquisa desenvolvida por Yin e Cheng (2003), a presença de dialil sulfito e dialil dissulfito em carne moída em concentrações entre 10 e 20 μM também foram eficientes na redução do patógeno. Entretanto, os resultados de Kim et al. (2004), demonstraram que os óleos essenciais presentes no alho e na cebola e seus constituintes derivados do sulfito (dialil trissulfito, dialil tetrassulfito e dimetil trissulfito) somente possuíam ótimos efeitos antibacterianos quando a CIM foi maior do que 300 ppm.

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um tema amplamente pesquisado por diversos autores, devido a grande importância desta condição para a saúde pública. À medida que os antimicrobianos vão sendo utilizados indiscriminadamente, aumenta-se o número de bactérias resistentes às drogas mais usadas na terapia humana. Todas as cepas de *L. monocytogenes* isoladas nesta pesquisa apresentaram-se resistentes aos antimicrobianos: clindamicina, oxaciclina, gentamicina, sulfazotrim, cefoxitina e inclusive a ampicilina, que é uma das drogas mais indicadas para o tratamento da listeriose segundo Jay (2005) e Castro (1989).

Gonçalves (1998) obteve resultados similares aos obtidos nesta dissertação, visto que cepas de *Listeria* spp. resistentes a tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, ampicilina e cefoxitina foram isoladas a partir de cortes de frango congelados.

Araújo (1998) também descreveu cepas de *L. monocytogenes* resistentes aos antimicrobianos cefoxitina, cefalotina, clindamicina e amicacina. Yucel et al. (2005) isolaram espécies de *Listeria*, oriundas de carne bovina e produtos cárneos, resistentes a ampicilina e cefalotina. Da mesma forma, Kasnowski (2004) relatou que todas as cepas de *L. monocytogenes* isoladas a partir de amostras de carne bovina apresentaram resistência à penicilina, à oxaciclina, à eritromicina, à ampicilina e à cefoxitina.

Também encontrou-se no presente trabalho cepas desta mesma espécie resistentes à outros antibióticos indicados no tratamento da listeriose humana, como

por exemplo, tetraciclina, cloranfenicol e cefalotina, aos quais 66,7% das cepas demonstraram resistência, e 83,3% apresentaram-se resistentes à eritromicina. Estes resultados discordam dos citados por Marth (1988) o qual relata que a maioria das cepas de *L. monocytogenes* é sensível a estes antimicrobianos. Talvez as cepas já tenham adquirido resistência da década de 80 para a atual.

Jay (2005) ainda ressalta a rifampicina como fármaco de escolha para o tratamento, porém, no presente estudo, 83,3% das cepas isoladas foram resistentes a este antimicrobiano.

Em relação à penicilina, 66,7 % das cepas de *L. monocytogenes* foram resistentes a este antibiótico, entretanto, os resultados obtidos por Hansen et al. (2005) confrontam com os obtidos neste experimento, pois estes pesquisadores observaram que todas as cepas de *L. monocytogenes* isoladas a partir de pacientes, foram sensíveis à penicilina e a ampicilina. É de se esperar que diferentes cepas, ou mesmo cepas idênticas, isoladas de locais (países) diferentes, provavelmente tenham comportamento diferente frente aos antibióticos usados, o que explicaria a diversificação de resultados encontrados na literatura.

Todas as cepas (100% dos isolados testados) foram resistentes a dois ou mais antimicrobianos, sendo que 66,7% destas cepas multiresistentes apresentaram resistência a penicilina. Prazak et al. (2002) encontraram resultados muito parecidos, onde 95% das cepas de *L. monocytogenes* oriundas de amostras de repolho, do meio ambiente e de água foram resistentes a dois ou mais antimicrobianos, e 85% destas foram resistentes à penicilina. Antunes et al. (2002) também isolaram cepas de *L. monocytogenes*, a partir de carcaças de frango, com múltipla resistência antimicrobiana em 74% das amostras analisadas.

8 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que:

1. Metade das amostras de carne pré-moída bovina apresentaram-se contaminadas por bactérias do gênero *Listeria*. Em 6,7% das amostras analisadas observou-se a presença de *L. monocytogenes*, sendo, portanto, consideradas impróprias para o consumo segundo a legislação vigente, por veicularem um patógeno causador de enfermidades transmitidas por alimentos.
2. *L. innocua* foi a espécie mais isolada nas amostras testadas.
3. O sorotipo de *L. monocytogenes* mais isolado foi o 4b (50%), sendo o mais comumente associado a surtos de listeriose de origem alimentar, mas também houve isolamento dos sorotipos 1/2c e 1/2.
4. A utilização do enriquecimento secundário aumentou consideravelmente o número de isolamentos de *Listeria* spp. quando comparado com o enriquecimento primário utilizado isoladamente.
5. O uso da solução de KOH antes do plaqueamento seletivo, não influenciou no isolamento de listérias na metodologia do “USDA”, pois os resultados obtidos foram semelhantes nos dois métodos.
6. O meio de plaqueamento seletivo que demonstrou maior eficiência no isolamento de *Listeria innocua* a partir de amostras de carne moída bovina foi o ágar MOX,

seguido pelo ágar MMA e LPM. Entretanto, quando comparou-se somente o meio MOX e LPM, o último apresentou maior número de isolamentos.

7. Para *L. monocytogenes*, o ágar MOX também se destacou, seguido, porém, pelo ágar LPM, com nenhuma cepa isolada pelo ágar MMA, colocando em dúvida a utilização deste último meio de plaqueamento seletivo na pesquisa de *L. monocytogenes* em carne moída bovina.

8. As três doses de irradiação utilizadas nesta pesquisa, a saber, 4; 5,7 e 7 kGy não foram suficientes na eliminação de todas as *Listeria* spp. presentes naturalmente na carne moída bovina, mas reduziram consideravelmente o número de bactérias.

9. Em 56,7% das amostras analisadas encontrou-se o aditivo sulfito de sódio, demonstrando que os estabelecimentos comerciais estão desrespeitando a legislação e colocando em risco a saúde do consumidor, principalmente aqueles alérgicos ao sulfito.

10. O sulfito de sódio na concentração de até 15 g não interferiu significativamente no crescimento de *L. monocytogenes* 4b inoculadas em amostras de carne moída bovina irradiadas.

11. A existência de cepas de *L. monocytogenes* resistentes aos antimicrobianos utilizados rotineiramente no tratamento da listeriose humana representa um problema para a saúde coletiva, principalmente para os indivíduos que fazem parte do grupo de risco.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P. N.; SZYERES, B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 2 ed. Washington : OMS/OPS, 1986. 989 p.

ACHA, P. N.; SZYERES, B. Bacterioses y Micosis. In:_____ *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 3 ed, parte 1, v.1, Washington : OPS, 2001

ANTUNES, P.; REU, C.; SOUSA, J. C.; PESTANA, N.; PEIXE, L. Incidence and susceptibility to antimicrobial agents of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* isolated from poultry carcasses in Porto, Portugal. *Journal of Food Protection*. v. 65, n. 12, p. 1888-1893, 2002.

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. 90 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Fluminense, UFF. Niterói, RJ, 1998.

ASERO, R. Food additive-induced chronic pruritus: further evidence. *Clinical & Experimental Dermatology*. v. 30, n. 6, p. 719, 2005

AURELI, P. et al. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Italy to antibiotics. *International Journal of Food Microbiology*. v. 83, p. 325-330, 2003.

BACTERIO-WEB. Disponível em: < http://medecinepharmacie.univ-fcomte.fr/bacterio_web/>. Acesso em: 10 jun 2006

BARKER, C.; PARK, S. F. Sensitization of *Listeria monocytogenes* to low pH, organic acids, and osmotic stress by ethanol. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 67, n. 4, p. 1594-1600, 2001.

BERSOT, L. S.; LANDGRAF, M.; FRANCO, D. D. G.; DESTRO, M. T. Production of mortadella: behavior of *L. monocytogenes* during processing and storage conditions. *Meat Science*. v. 57, p.19-26, 2001

BILLE, J. et. al. *Listeria*, a new and promising pne-day syatem to identify *Listeria* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, n. 6, p. 1857-1860, 1992

BIOAPLICACIONES ALIMENTARIAS Y MEDIOAMBIENTALES. *Conservantes*. Disponível em <http://bioaplicaciones.galeon.com/Conservantes_1.html> Acesso em: 27 dez. 2005

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto-lei nº986 de 21 de outubro de 1969. *Institui normas básicas sobre alimentos*. Disponível em < <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=1471>> Acesso em: 19 jun. 2005

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. *Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos*. Disponível em <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144&word=>>>. Acesso em: 19 jun. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº540 de 27 de outubro de 1997. *Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos*

Alimentares. Disponível em < <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=88>> Acesso em 18 jun. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº1004 de 11 de dezembro de 1998. *Aprova o Regulamento Técnico: atribuição de função de aditivos, aditivos e seus limites máximo de uso para a categoria 8 – Carne e Produtos Cárneos, constante do anexo desta Portaria*. Disponível em <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=38&word=>>>. Acesso em: 19 jun. 2005.

CASSIDAY, P. K.; BRACKETT, R. E.; BEUCHAT, L. R. Evaluation of three newly developed direct plating media to enumerate *Listeria monocytogenes* in foods. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 55, n. 6, p. 1645-1648, 1989.

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

CHARPENTIER, E.; COURVALIN, P. Minireview. Antibiotic Resistance in *Listeria* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 43, n.9, p. 2103-2108, 1999.

CHOU, C. C.; CHENG, S. J.; WANG, Y. C.; CHUNG, K. T. Behavior of *Escherichia coli* O 157:H7 and *Listeria monocytogenes* in Tryptic Soy Broth subjected to various low temperature treatments. *Food Research International*. v. 32, p. 1-6, 1999.

COLOR ATLAS. Disponível em: <<http://cpl.yonsei.ac.kr/micro/atlashtml/lmo.html>>. Acesso em: 10 jun 2006

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. Listeriose. In: _____ *Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos*. 2 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p. , cap. 24, p. 367-373.

DI GIACOMO, R. R.; KOEPESELL, T. D. Sampling for detection of infection on disease in populations. *Journal American Veterinary Medical Association*, v. 189, p. 22-23, 1986.

DIEHL, J. F. *Safety of Irradiated Foods*. New York: Marcel Dekker, 1990, 345p.

DONKER-VOET, J. A serological study on some strains of *Listeria monocytogenes* isolated in Michigan. *American Journal of Veterinary Research*. v. 20, p. 176-179, 1959

DONNELLY, C. W. et. al. *Listeria* spp. In: VANDERZANT, C. SPLITTSTOESSER, D. F. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 3 ed. Washington: APHA, 1992. 1912 p., cap. 38, p. 637-664.

DUFFY, G. et al. Comparison of selective and non-selective enrichment media in the detection of *Listeria monocytogenes* from meat containing *Listeria innocua*. *Journal of Applied of Microbiology*. v. 90, n. 6, p. 994-999, 2001.

FANTELLI, K.; STEPHAN, R. Prevalence and characteristics of shigatoxin-producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland. *Int J Food Microbiol*. v. 70, n.1-2, p.63-9, 2001.

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

FARKAS, J. Irradiation as a method for decontaminating food. A review. *International Journal of Food Microbiology*. v. 44, p. 189–204, 1998.

FERREIRA, S. R. F. *Contribuição da Tecnologia de Irradiação de Alimentos no Fornecimento de segurança Alimentar e Nutricional*. Rio de Janeiro, 1999. Dissertação (mestrado em Nutrição Humana) Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1999.

FOLEY, D. M. et al. Elimination of *Listeria monocytogenes* and changes in physical and sensory qualites of a prepared meal follwing gamma irradiation. *Food Microbiology*. v. 18, p. 193-204, 2001.

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

FU, A.; SEBRAWEK, J. G.; MURANO, E. A. Survival of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurum* and quality attributes of cooked pork chops and cures ham after irradiation. *Journal do Food Science*. v. 60, n. 5, p. 1001-1005, 1995.

GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L. *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. São Paulo: Varela, 2001. 629 p. cap. 12, p. 222-227.

GONÇALVES, P. M. R. *Isolamento e identificação de Listeria spp. a partir de amostras de cortes de peito de frango congelados: avaliação de metodologias e fatores interferentes*. Niterói, RJ, 1998. 111 f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal). Universidade Federal Fluminense, UFF. Niterói, RJ, 1998.

GUIA SUS DO CIDADÃO. Secretaria de Estado da Saúde RJ. PRECAUÇÕES ESPECÍFICAS: leite e derivados, chocolate, água, bebidas, carne e derivados, pescado e derivados, congelados, produtos naturais e produtos clandestinos. Atenção a saúde. Disponível em <http://www.saude.rj.gov.br/guia_sus_cidadao/pg_61.shtml>. Acesso em 12 jun 2006.

HANSEN, J. M. et al. Antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* in Denmark 1958-2001. *APMIS*. v. 113, p. 31-36, 2005.

HARRIGAN, W. F. *Laboratory Methods in Food Microbiology*. 3 ed. California: Academic Press, 1998, 531 p.

HEFNAWY, Y. A.; MOUSTAFA, S. I.; MARTH, E. H. Behavior of *L. monocytogenes* in refrigerated and frozen ground beef and in sausage and broth with and without additives. *Lebensm. Wiss. Technol.* v. 26, n. 2, p. 167-170, 1993

HEISICK, J. E.; WAGNER, D. E.; NIERMAN, M. L.; PEELER, J. T. *Listeria* spp. found on fresh market produce. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 55, n. 8, p. 1925-1927, 1989.

HITCHINS, A. D. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. In: _____ *Bacteriological Analytical Manual Online*, cap. 10, ed. 8, r. A, 1998. Disponível em < <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>>. Acesso em : 10 julho 2006.

HOBBS, B. C.; ROBERTS, D. *Toxinfecções e Controle Higiênico-Sanitário de Alimentos*. São Paulo: Varela, 1992. cap. 3, pt. 1, p. 25-47, 1992.

IBGE, Diretoria de pesquisas, Coordenação da Agropecuária. Produção da Pecuária Municipal – 2004. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impresao.php?id_noticia=499 . Acesso em 29 julho 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos* 3 ed., São Paulo: O Instituto, 1985, v. 1, 533 p.

JAY, J. M. Listerioses de origem animal. In: *Microbiologia de alimentos*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p., cap. 25, p. 517-542

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. *Microbiologia médica*. 20.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, 524 p.

JO, C; et al. Radio-sensitivity of pathogens in inoculated prepared foods of animal origin. *Food Microbiology*. v. 22, p. 329–336, 2005.

KAMAT, A. S.; NAIR, P. M. Identification of *Listeria innocua* as a Biological indicator for inactivation of *L. monocytogenes* by some meat processing treatments. *Lebensm-Wissu-Technology*. v. 29, p. 714-720, 1996.

KASNOWSKI, M. C. *Listeria spp.*, *Escherichia coli*: Isolamento, identificação, estudo sorológico e antimicrobiano em corte de carne bovina (alcatra) inteira e moída. Niterói, RJ, 2004. 110 f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal). Universidade Federal Fluminense, UFF. Niterói, RJ, 2004.

KIM, J. W.; KIM, Y. S.; KYUNG, K. H. Inhibitory activity of essential oils of garlic and onion against bacteria and yeasts. *Journal of Food Protection*. v. 67, n. 3, p. 499-50, 2004.

KIM, J. H. et al. Effect of gamma irradiation on *Listeria ivanovii* inoculated to iceberg lettuce stored at cold temperature. *Food Control* . v.17 , p.397–401, 2006.

KYUNG, K. H; FLEMING, H. P. Antimicrobial activity of sulfur compounds derived from cabbage. *Journal of Food Protection*. v. 60, n. 1, p. 67-71, 1997

LANDGRAF, M. Controle do desenvolvimento Microbiano nos Alimentos. In: FRANCO, B.D.G.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, p. 109-148, 1996.

LEBEPE, S. et al. Changes in microflora and other characteristics of vacuum-packaged pork loins irradiated at 3,0 kGy. *Journal of Food Science*. v. 55, n. 4, p. 918-924, 1990.

LEE, W. H.; MCCLAIN, D. Improved *Listeria monocytogenes* selective agar. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 52, n. 5, p. 1215-1217, 1986.

LEE, N. Y.; JO, C.; SHIN, D. H; KIM, W. G.; BYUN, M. W. Effect of g-irradiation on pathogens inoculated into ready-to-use vegetables. *Food Microbiology*. v. 23, p.649–656, 2006.

LOESSNER, M. J.; BELL, R. H.; JAY, J. M.; SHELEF, L. A. Comparison of seven plating media for enumeration of *Listeria spp.* *Applied and Environmental Microbiology*. v. 54, n. 12, p. 3003-3007, 1988.

- LOUGUERCIO, A. P. et. al. *Listeria monocytogenes*: um importante patógeno de origem alimentar. *Higiene Alimentar*. v. 15, n. 80/81, p. 39-48, 2001.
- LOVETT, J.; TWEDT, R. M. Bacteria associated with foodborne diseases *Listeria*. *Food Technology*. v. 42, n. 2, p. 188-191, 1988.
- LUND, A. M.; ZOTTOLA, E. A.; PUSCH, D. J. Comparison of methods for isolation of *Listeria* from raw-milk. *Journal of Food Protection*. v. 54, n. 8, p. 602-606, 1991.
- MAC FADDIN, J. F. *Pruebas bioquímicas para la identificación de las bacterias de importancia clínica*. Buenos Aires: Panamericana, 1985. 301p.
- MARTH, E. H. Disease characteristic of *Listeria monocytogenes*. *Food Technology*, v. 42, n. 51, p. 165-168, 1988.
- MARTIN, S. W.; MEEK, A. H.; WILLEBERG, P. *Veterinary Epidemiology- Principles and Methods*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1987. 343 p.
- MARTINEZ, R. C. R.; MARTINIS, E. C. P. Evaluation of Bacteriocin – producing *Lactobacillus sakei* 1 against *Listeria monocytogenes* 1/2 A growth and haemolytic activity. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 36, p. 83-87, 2005
- MARTINIS, E. C. P.; PÚBLIO, M. R. P.; SANTAROSA, P. R.; FREITAS, F. Z. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology*. n. 32, p. 32-37, 2001
- MC CLAIN, D. LEE, W. H. *Development of USDA-FSIS method for isolation of Listeria monocytogenes from raw meat and poultry*. Journal of the Association of Official Analytical Manual. Food and Drug Administration. Virginia. U. S. 4. ed., p. 6-11, 1986.
- MENA, C. et al. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology*. v. 21, p.213-216, 2004

MERCK. Oxford Listeria Selective Agar Base. Disponível em <http://service.merck.de/microbiology/tedisdata/prods/4979-1_07004_0500.html>
Acesso em: 10 jun 2006

MONTELLI. A. C.; SADATSUNE, T. *Antibioticoterapia para o Clínico*. SMB: Sociedade Brasileira de Microbiologia. Rio de Janeiro. p. 7-53, 2001.

MOSSEL, D. A. A.; GARCIA, B. M. *Microbiologia de los alimentos: fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos*. Zaragoza: Acribia. 375 p., 1981.

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

MURRAY, P. R. et al. *Listeria, Erysipelothrix e outros bacilos Gram-positivos*. In: _____. *Microbiologia Médica*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 27, p. 181-184.

NCCLS. *Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Test*. v. 10, n. 7, abr 2003

NOVAK, J. S.; JUNEJA, V. K. Effects of refrigeration or freezing on survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in under-cooked ground beef. *Food Control*. n. 14, p. 25-30, 2003

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

OLSON, D.G. Irradiation of Food. *Food Technology*. v. 52, n. 1, p. 152-162, 1998.

PETTRAN, R. L.; SWANSON, K. M. J. Simultaneous Growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Journal of Food Protection*. v. 56, n. 7, p. 616-618, 1993.

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

PORTNOY, D. The Portnoy Lab. Disponível em:<[http://mcb.berkeley.edu/labs/portnoy/Listeria%20Cycle%20\(original\).gif](http://mcb.berkeley.edu/labs/portnoy/Listeria%20Cycle%20(original).gif)> . Acesso em: 10 jun 2006

PRAZAK, M. A.; MURANO, E. A.; MERCADO, I; ACUFF, G. R. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from various cabbage farms and packing sheds in Texas. *Journal of Food Protection*. v. 65, n. 11, p. 1796-1799, 2002

RING, J.; BROCKOW, K.; BEHRENDT, H. Review - Adverse reactions to foods. *Journal of Chromatography*. v. 756, p. 3–10, 2001.

ROBERTS, T.; WEESE, J. *Food Irradiation*. 1995. Disponível em <<http://www.aces.edu/pubs/docs/H/HE-0727/>>. Acesso em : 10 jun 2006

RODRIGUES, D. A.; FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. DESTRO, M. T. Avaliação da eficiência de três ágaros seletivos no isolamento de *Listeria monocytogenes*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. n. 23, p. 87-92, 2003.

RYSER, E. T.; MARTH, E. H. Listeriosis in animals. In:_____. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. New York: Copyright, 1991. 632 p. cap. 3, p.33-44.

RYSER, E. T.; MARTH, E. H.. Behavior of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of brick cheese. *Journal of Dairy Science*. v. 72 , n. 4, p. 838-853, 1989.

SAMADPOUR, M. et al. Incidence of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in retail fresh ground beef, sprouts, and mushrooms. *Journal of Food Protection*. v. 69, n. 2, p. 441-443, 2006.

SAMELIS, J. et al. Use of ionizing radiation doses of 2 and 4 kGy to control *Listeria* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 on frozen meat trimmings used for dry fermented sausage production. *Meat Science*. v. 70, p. 189-195, 2005.

SCHLECH, W. F. Overview of listeriosis. *Food Control*. v.7, n. 415, p. 183-186, 1996.

SEELIGER, H. P. H.; HÖHNE, K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. *Methods Microbiol*. 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 Systematic Bacteriology*. 9 ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1996, v. 2, p. 1235-1245.

SILVA, M. C. D.; VILARDI, T. C. C.; TIBANA, A. Avaliação de métodos para detecção de *Listeria* em queijos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 18, n. 2, 1998. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611998000200001&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 14 fev 2006.

SILVA, M. C. C. *Ocorrência de Listeria spp. em Embutidos Carneos Artesanais Comercializados no Mercado Varejista da Cidade de Contagem, MG*. Belo Horizonte, 1996. 76f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte. 1996.

SILVA, W. P.; LIMA, A. S.; GANDRA, E. A.; ARAÚJO, M. R.; MACEDO, R. P.; DUVALL, E. H. *Listeria* spp. no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Br. *Ciência Rural*. v.34, n. 3, 2004.

SIMÃO, A. M. *Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico*. 2 ed. 1 reimp. São Paulo: Nobel, 1986. 274 p.

SIMON, R. A. Adverse reactions to food additives. *N Engl Reg Allergy Proc*. v. 7, n. 6 p. 533-542, 1986.

SIRELI, U. T.; EROL, I. Detection of *Listeria* species in minced beef. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*. v. 23, p. 373-380, suppl. 2, 1999

SNEATH, P. H.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams e Wilkins, 1986. v. 2, 1599 p.

STEKELENBURG, F.K. Enhanced inhibition of *L. monocytogenes* in frankfurter sausage by the addition of potassium lactate and sodium diacetate mixtures. *Food Microbiology*. v. 20, p. 133-137, 2003

SWAMINATHAN, B.; HAYS, P. S.; PRZYBYSZEWSKI, V. A.; PLIKAYTIS, B. D. Evaluation of enrichment and plating media for isolating *Listeria monocytogenes*. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*. v. 71, n. 3, p. 664-668, 1988.

TAYLOR, S. L. et al. Sensitivity to sulfited foods among sulfite-sensitive subjects with asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. v. 81, n. 6, p. 1159-1167, 1988.

TELLES FILHO, P. A. *Asma Brônquica / Asma por Sulfitos*. Disponível em <http://www.asmabronquica.com.br/medical/tipos_de_asma_asma_sulfitos.html>. Acesso em: 24 junho 2006.

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

VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. *Listeria monocytogenes*. In: _____ *Foodborne Pathogens*. London: Manson Publishing, 1996. 557 p. cap.16, p. 327-353.

VIGNOLO, G.; FADDA, S.; KAIRUZ, M. N.; HOLGADO, A. A. P. R.; OLIVER, G. Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by "Lactocin 705", a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *International Journal of Food Microbiology*. n. 29, p. 397-402, 1996.

VIGNOLO, G.; KAIRUZ, M. N.; HOLGADO, A. P. R.; OLIVER, G. Effects of curing additives on the control of *Listeria monocytogenes* by lactocin 705 in meat slurry. *Food Microbiology*. v. 15, p. 259-264, 1998.

VITAS, A.I.; AGUADO, V.; GARCIA-JALON, I. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *International Journal of Food Microbiology*. v. 90, p. 349– 356, 2004.

YIN, M.; CHENG, W. Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic-derived organosulfur compounds in ground beef. *Meat Science*. v. 63, p. 23-28, 2003.

YUCEL, N.; CITAK, S.; GUNDOGAN, N. The incidence of *Listeria monocytogenes* in raw meat. *Indian Veterinary Journal*. v. 81, n. 11, p. 1192-1194, 2004.

YUCEL, N.; CITAK, S.; ONDER, M.. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. *Food Microbiology*. v. 22, p. 2-3, 2005.

WEDERQUIST, H. J.; SOFOS, J. N.; SCHMIDT, G. R. Culture Media Comparison for the Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Refrigerated Vacuum Packaged Turkey Bologna Made with Chemical Additives. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*. v. 28, p. 455-461, 1995.

WHITE, O. G. et al. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. *Microbes and Infection*. v. 4, p. 405-412, 2002.

10 APÊNDICES

TABELA 1 – Número de amostras de carnes bovinas pré-moídas positivas para as diferentes espécies do gênero *Listeria*.

<i>Espécie</i>	<i>Amostras positivas/amostras analisadas</i>
<i>L. monocytogenes</i>	2/30
<i>L. innocua</i>	14/30

TABELA 2 - Sorotipos de *Listeria* spp. isolados das amostras de carne moída

<i>Espécies</i>	<i>Sorotipos</i>	<i>N° de cepas</i>	<i>%</i>	<i>Total</i>
<i>L. innocua</i>	6a	66	85,7	77
	6b	7	9,1	
	Não tipável	4	5,2	
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	3	50	6
	½ c	2	33,3	
	1/2	1	16,7	
Total		83		83

TABELA 3 – Número de cepas de *L. innocua* e *L. monocytogenes* isoladas de amostras de carne bovina pré-moída a partir do plaqueamento com enriquecimento primário, segundo metodologia do USDA

<i>Plaqueamento</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Total</i>
Com KOH	0	0	0
Sem KOH	4	0	4
Total	4	0	4

TABELA 4 – Número de cepas de *L. innocua* e *L. monocytogenes* isoladas de amostras de carne bovina pré-moída a partir do plaqueamento com enriquecimento secundário, segundo metodologia do USDA

<i>Plaqueamento</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Total</i>
Com KOH	36	2	38
Sem KOH	37	4	41
Total	73	6	79

TABELA 5 - Número de cepas de *Listeria* spp. isoladas de amostras de carne bovina pré-moída a partir do plaqueamento com e sem prévia passagem pela solução de KOH.

<i>Plaqueamento</i>	<i>Listeria spp.</i>
Com KOH	38
Sem KOH	45
Total	83

TABELA 6 - Número de cepas isoladas de amostras de carne bovina pré-moída a partir dos diferentes meios de plaqueamento com ou sem prévia passagem pelo KOH no enriquecimento primário.

<i>Meio de Plaqueamento</i>	L. innocua	L. monocytogenes
MOX	4	0
Total	4	0

TABELA 7 - Número de cepas isoladas de amostras de carne bovina pré-moída a partir de três meios de plaqueamento com ou sem prévia passagem pelo KOH no enriquecimento secundário (amostras número 1 até 22).

<i>Meio de Plaqueamento</i>	L. innocua	L. monocytogenes	<i>Total</i>
LPM	0	0	0
LPM + KOH	0	1	1
MOX	14	4	18
MOX + KOH	23	1	24
MMA	2	0	2
MMA + KOH	2	0	2
Total	41	6	47

TABELA 8 – Número de cepas isoladas de amostras de carne bovina pré-moída a partir de dois meios de plaqueamento com ou sem prévia passagem pelo KOH no enriquecimento secundário (amostras número 23 até 30).

<i>Meio de Plaqueamento</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Total</i>
LPM	14	0	14
LPM + KOH	5	0	5
MOX	7	0	7
MOX + KOH	6	0	6
Total	32	0	32

TABELA 9 - Resultado do teste qualitativo para o sulfito de sódio nas 30 amostras de carne bovina pré-moída.

<i>Sulfito</i>	<i>Com Listeria spp.</i>	<i>Sem Listeria spp.</i>	<i>Total</i>
Amostras positivas	9	8	17
Amostras negativas	6	7	13
Total	15	15	30

TABELA 10 - Número de cepas isoladas de amostras de carne bovina pré-moída a partir de amostras de carne pré-moída com e sem sulfito.

<i>Sulfito</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Total</i>
Amostras positivas	54	0	54
Amostras negativas	23	6	29
Total	77	6	83

TABELA 11 – Resultado da contagem de *L. monocytogenes* 4b, isoladas de amostras de carne bovina pré-moída, em ágar MOX a partir das culturas adicionadas com diferentes concentrações de sulfito de sódio.

<i>Subamostras</i>	<i>Quantidade de sulfito (g)</i>	<i>Contagem de L. monocytogenes</i>
Padrão	0	$1,0 \times 10^{12}$
1	0,5	$3,0 \times 10^{10}$
2	1,0	$1,24 \times 10^{12}$
3	2,0	$1,6 \times 10^{12}$
4	3,0	$7,0 \times 10^{11}$
5	5,0	$5,0 \times 10^8$
6	8,0	$5,1 \times 10^{11}$
7	10,0	$3,6 \times 10^{11}$
8	15,0	$2,0 \times 10^8$

TABELA 12 – Distribuição dos valores de pH das amostras de carne bovina pré-moída.

<i>Valores de pH</i>	<i>Amostras (%)</i>
5,51-5,98	72%
6,0-7,01	28%

TABELA 13 – Valores máximo e mínimo de pH das amostras de carne bovina pré-moída onde isolou-se *Listeria* spp.

<i>Espécies</i>	<i>pH máximo</i>	<i>pH mínimo</i>
<i>Listeria</i> spp.	6,76	5,51
<i>L. monocytogenes</i>	6,23	5,81

TABELA 14 - Comportamento das seis cepas de *L. monocytogenes* isoladas de amostras de carne bovina pré-moída frente aos antimicrobianos testados

Número de cepas sensíveis (percentual%)		Número de cepas intermediárias (%)	Todas as cepas resistentes
Amicacina	3 (50%)	Ciprofloxacina 1 (16,7%)	Gentamicina
Vancomicina	3 (50%)	Rifampicina 1 (16,7%)	Cefoxitina
Cloranfenicol	2	Cloranfenicol 1 (16,7%)	Ampicilina
(33,3%)			Clindamicina
Tetraciclina	2		Oxaciclina
(33,3%)			Sulfazotrim
Rifampicina	2		
(33,3%)			
Penicilina	2		
(33,3%)			
Cefalotina	2		
(33,3%)			
Ciprofloxacina	1		
(16,7%)			
Eritromicina	1		
(16,7%)			

TABELA 15 - Comportamento das sete cepas de *L. innocua* 6a isoladas de amostras de carne bovina pré-moída frente aos antimicrobianos testados

Número de cepas sensíveis (%)		Número de cepas intermediárias (%)	Todas as cepas resistentes
Ampicilina	4	Ciprofloxacina 1 (14,3%)	Vancomicina
(57,1%)		Sulfzotrim 1 (14,3%)	Oxaciclina
Penicilina	3	Tetraciclina 1 (14,3%)	
(42,9%)		Cefalotina 1 (14,3%)	
Cloranfenicol	3 (42,9%)	Gentamicina 1 (14,3%)	
Cefalotina	3	Eritromicina 1 (14,3%)	
(42,9%)			
Cefoxitina	2		
(28,6%)			
Gentamicina	2		
(28,6%)			
Eritromicina	2		
(28,6%)			
Amicacina	2		
(28,6%)			
Clindamicina	1		
(14,3%)			
Ciprofloxacina	1		

(14,3%) Rifampicina	1	
(14,3%) Rifampicina	1	

TABELA 16 - Comportamento das sete cepas de *L. innocua* 6b isoladas de amostras de carne bovina pré-moída frente aos antimicrobianos testados

Número de cepas sensíveis (%)	Número de cepas intermediárias (%)	Todas as cepas resistentes
Amicacina 7 (100%)	Ciprofloxacina 3 (42,9%)	Gentamicina
Penicilina 4 (57,1%)	Cloranfenicol 2 (28,6%)	Cefoxitina
Ampicilina 3 (42,9%)	Sulfazotrim 1 (14,3%)	Tetraciclina
Cefalotina 2 (28,6%)	Ampicilina 1 (14,3%)	
Eritromicina 2 (28,6%)	Clindamicina 1 (14,3%)	
Cloranfenicol 1 (42,9%)	Oxacilcina 1 (14,3%)	
Clindamicina 1 (14,3%)		
Ciprofloxacina 1 (14,3%)		
Rifampicina 1 (14,3%)		
Oxaciclina 1 (14,3%)		

TABELA 17 - Comportamento das quatro cepas de *L. innocua* não tipáveis isoladas de amostras de carne bovina pré-moída frente aos antimicrobianos testados

Número de cepas sensíveis (percentual%)		Número de cepas intermediárias (%)	Todas as cepas resistentes
Gentamicina (100%)	4	Ciprofloxacina 2 (50%)	Clindamicina
Eritromicina (100%)	4	Cefoxitina 1 (25%)	
Cefalotina	3 (75%)	Oxaciclina 1 (25%)	
Amicacina	2 (50%)		
Penicilina	2 (50%)		
Vancomicina	1 (25%)		
Cloranfenicol	1 (25%)		
Tetraciclina	1 (25%)		
Rifampicina	1 (25%)		
Ciprofloxacina	1 (25%)		
Sulfazotrim	1 (25%)		
Ampicilina	1 (25%)		
Oxaciclina	1 (25%)		

GRÁFICO 1 – Número de cepas de *Listeria* spp. isoladas de amostras de carne bovina pré-moída usando-se o enriquecimento primário e secundário da metodologia do USDA com e sem prévia passagem pela solução de KOH

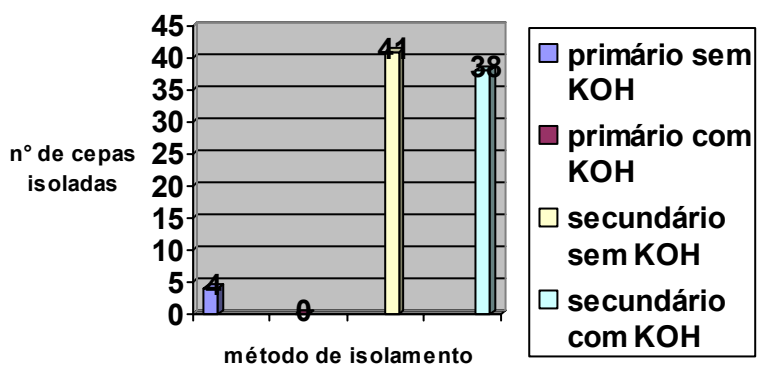


GRÁFICO 2 – Número de cepas de *L. monocytogenes* isoladas de amostras de carne bovina pré-moída usando-se o enriquecimento primário e secundário da metodologia do USDA com e sem prévia passagem pela solução de KOH

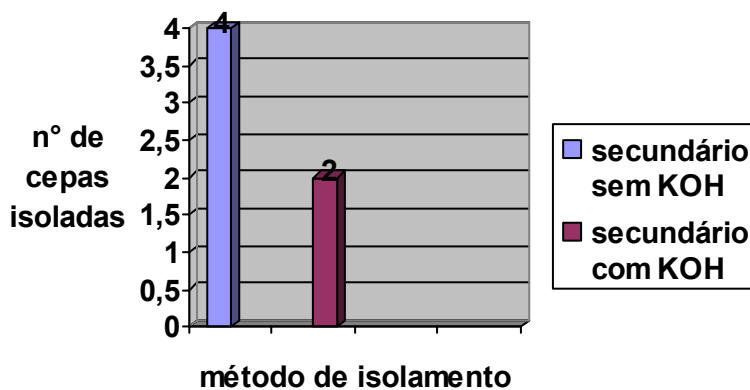


GRÁFICO 3 – Percentual de isolamentos de cepas de *L. innocua* de amostras de carne bovina pré-moída através dos meios de plaqueamento com e sem prévia passagem pela solução de KOH no enriquecimento primário.

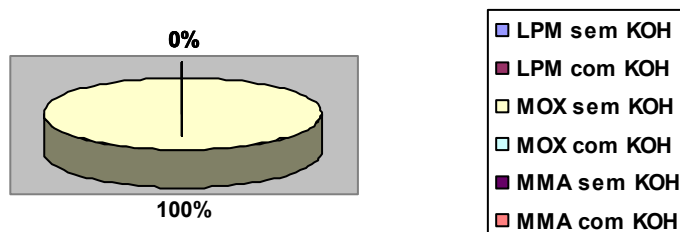


GRÁFICO 4 – Número de cepas de *L. monocytogenes* isoladas de amostras de carne bovina pré-moída sensíveis e resistentes aos antimicrobianos testados.

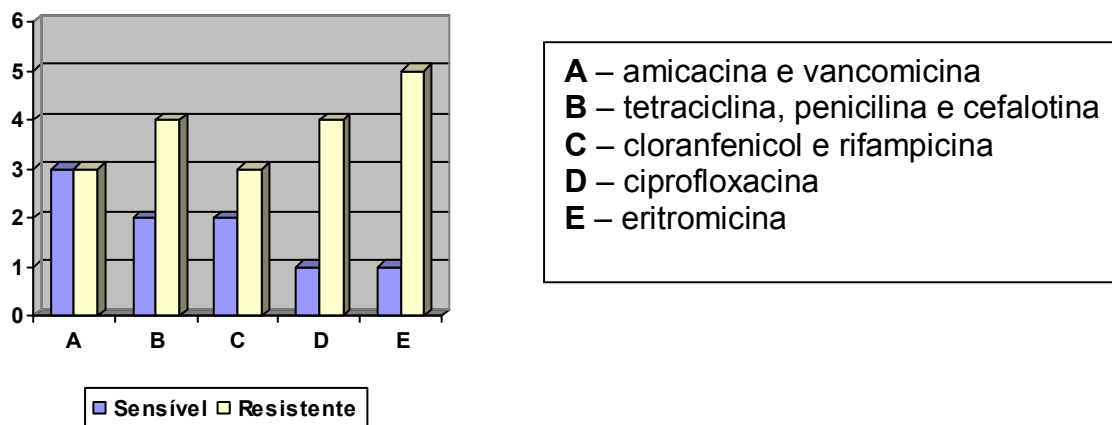


GRÁFICO 5 - Percentual de isolamentos de cepas de *Listeria* spp. de amostras de carne bovina pré-moída através dos meios de plaqueamento com e sem prévia passagem pela solução de KOH no enriquecimento secundário (amostras 1 até 22)

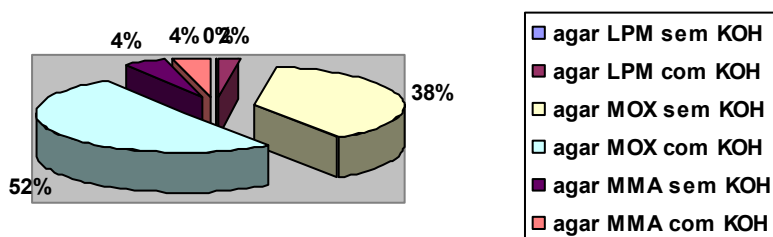


GRÁFICO 6 - Percentual de isolamentos de cepas de *L. monocytogenes* de amostras de carne bovina pré-moída através dos meios de plaqueamento com e sem prévia passagem pela solução de KOH no enriquecimento secundário (amostras 1 até 22)

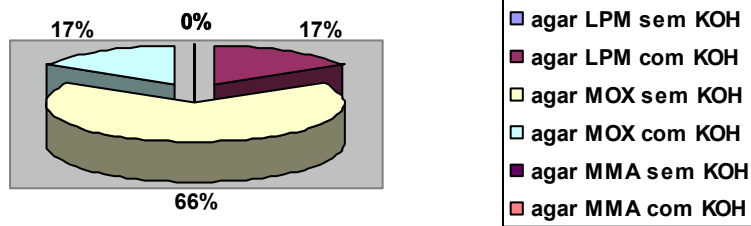
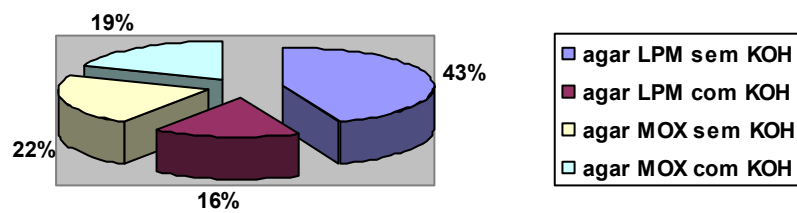


GRÁFICO 7 - Percentual de isolamentos de cepas de *Listeria* spp. de amostras de carne bovina pré-moída através dos meios de plaqueamento com e sem prévia passagem pela solução de KOH no enriquecimento secundário (amostras 23 até 30)



11 ANEXOS

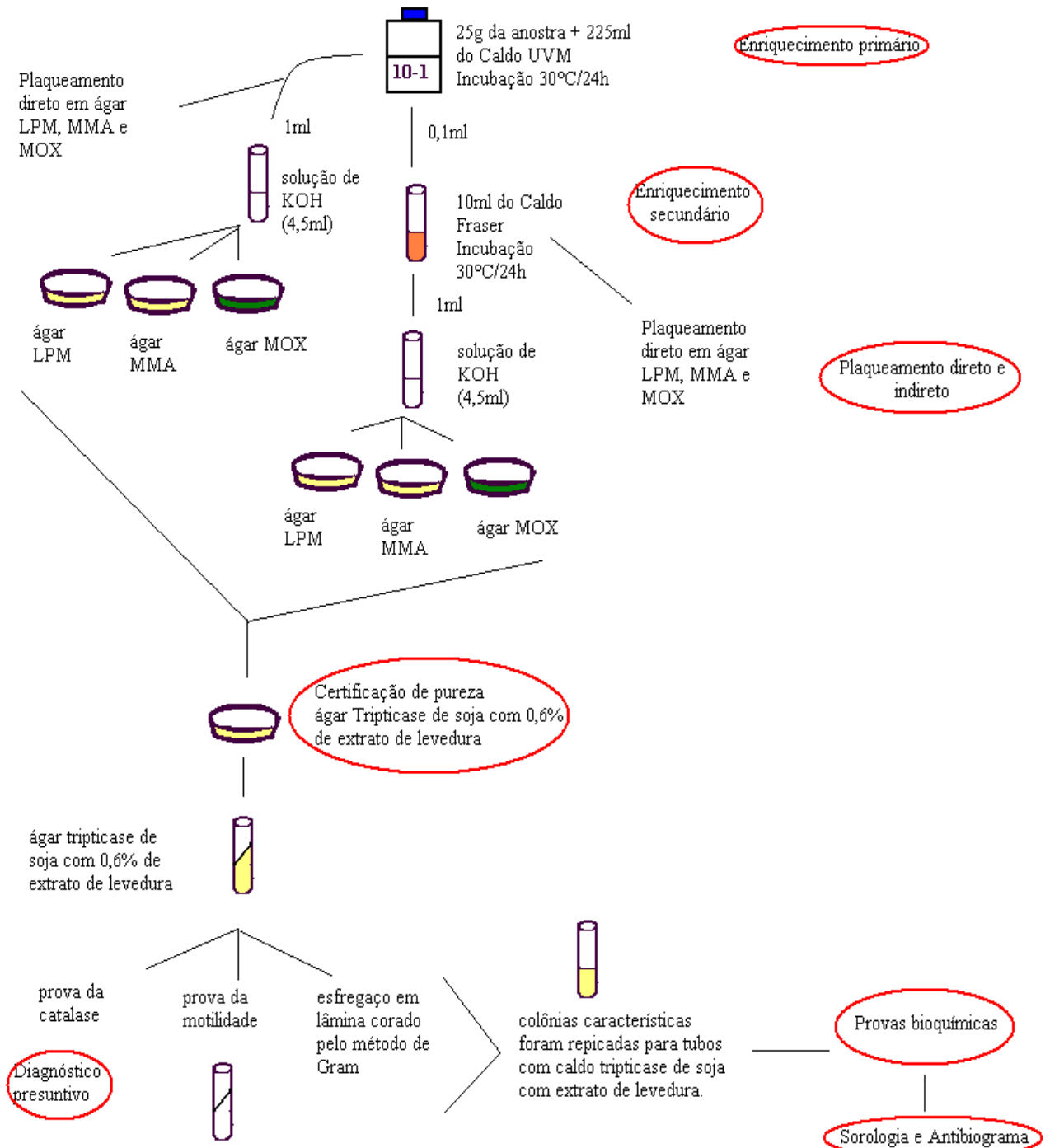
FIGURA 1 – Esquema da metodologia de isolamento de *Listeria* spp. do USDA

FIGURA 2 – Preparação das amostras para o processo de irradiação e teste de verificação da eficiência do processamento

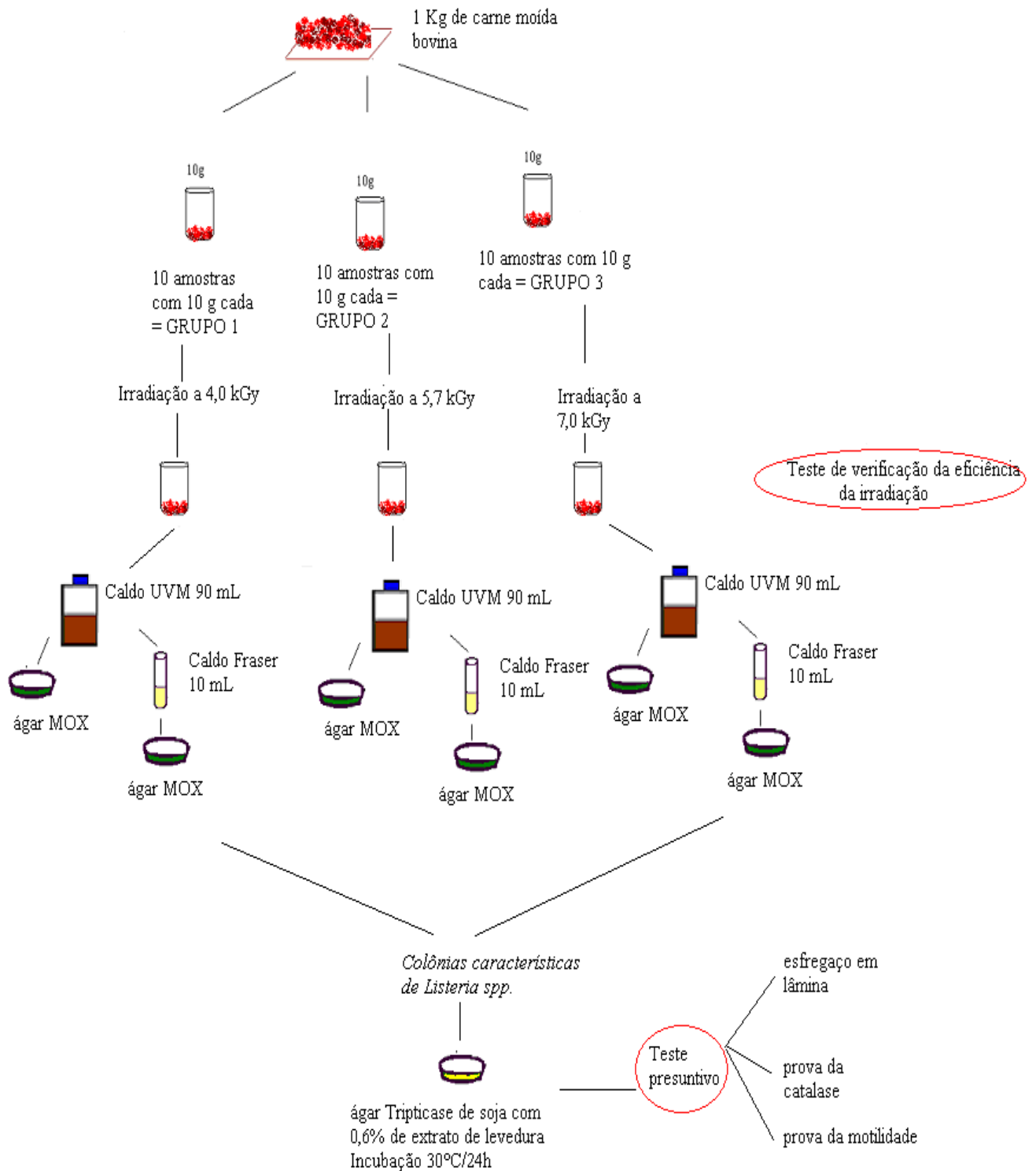


FIGURA 3 - Contagem de *L. monocytogenes* em carnes moídas irradiadas adicionadas com diferentes concentrações de sulfito de sódio (1º experimento)

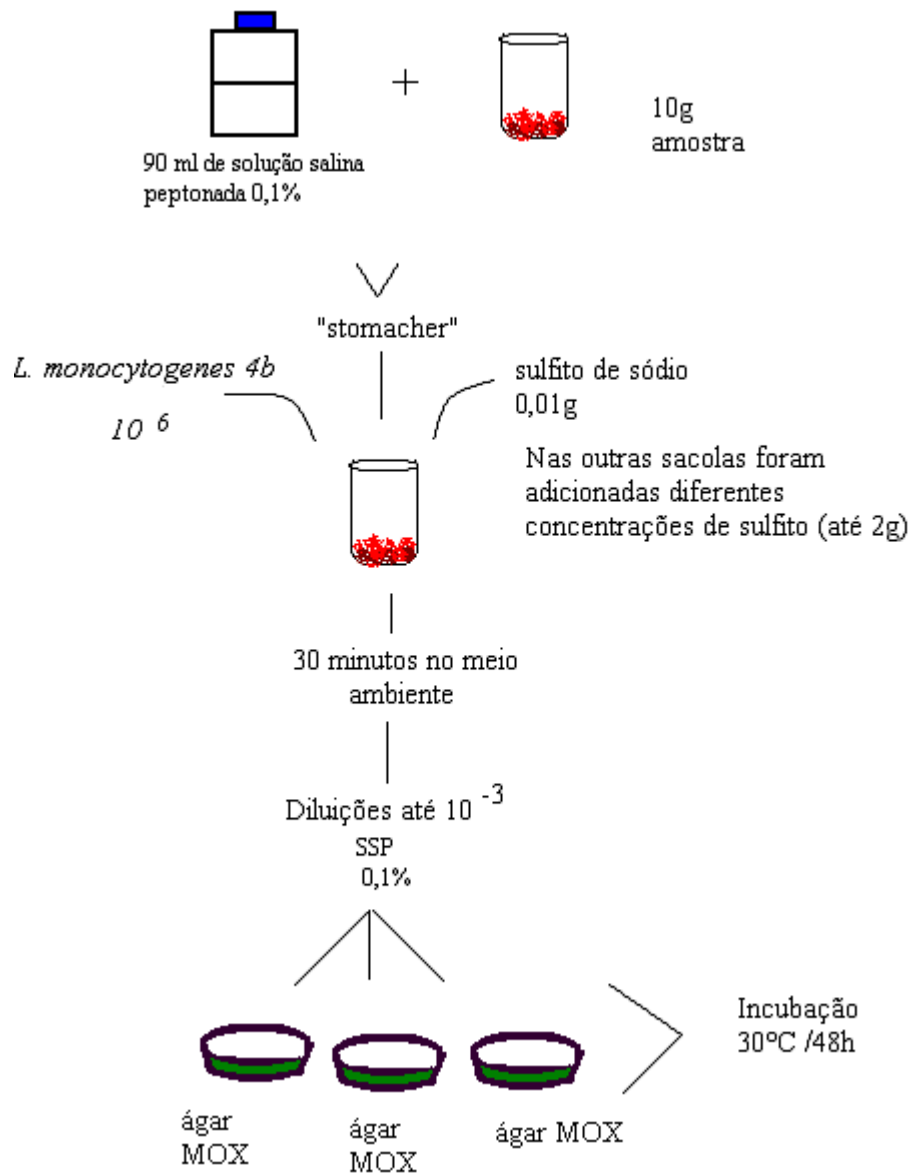
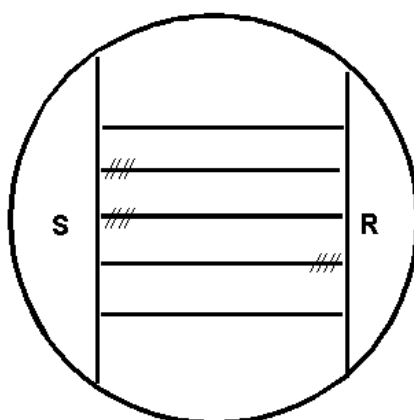


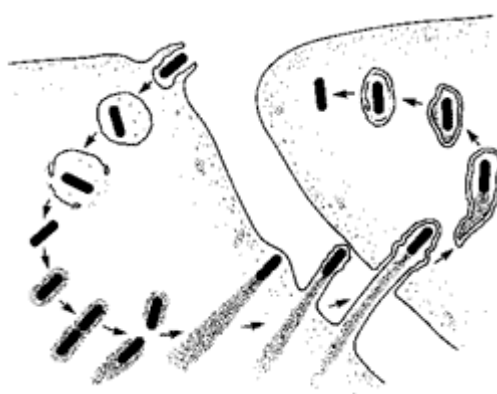
FIGURA 5 – “CAMP test” para *L. monocytogenes*: Teste padrão esquemático de inoculação em placa de ágar sangue de carneiro.



Fonte: HITCHINS (1998)

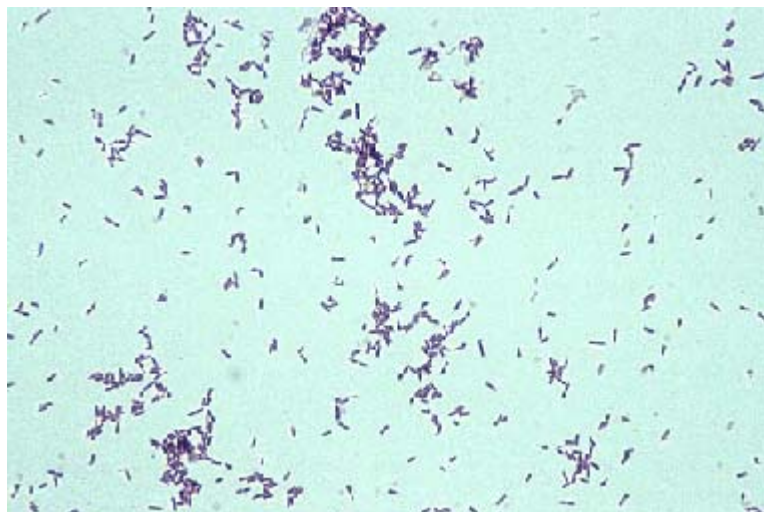
As linhas horizontais representam as inoculações de cinco cepas testadas. As linhas verticais representam, a inoculação do *Staphylococcus aureus* (S) e *Rhodococcus equi* (R). As linhas tachadas indicam (diagramaticalmente) as regiões com hemólises pronunciadas.

FIGURA 6 – Mecanismo de penetração de *L. monocytogenes* na célula do hospedeiro.



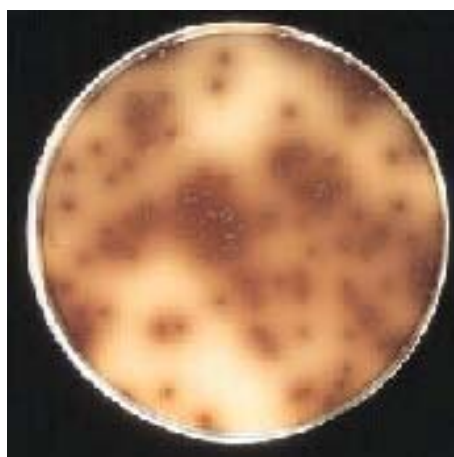
Fonte: PORTONY (2006)

FIGURA 7– Esfregaço em lâmina corado pelo método de Gram – *Listeria* spp.



Fonte: BACTERIO-WEB (2006)

FIGURA 8 – Crescimento de bactérias do gênero *Listeria* spp. no ágar MOX



Fonte: MERCK (2006)

FIGURA 9 – Crescimento de *Listeria monocytogenes* em ágar tripticase de soja com sangue de carneiro desfibrinado



Fonte: COLOR ATLAS (2006)

FIGURA 10 – “CAMP test”

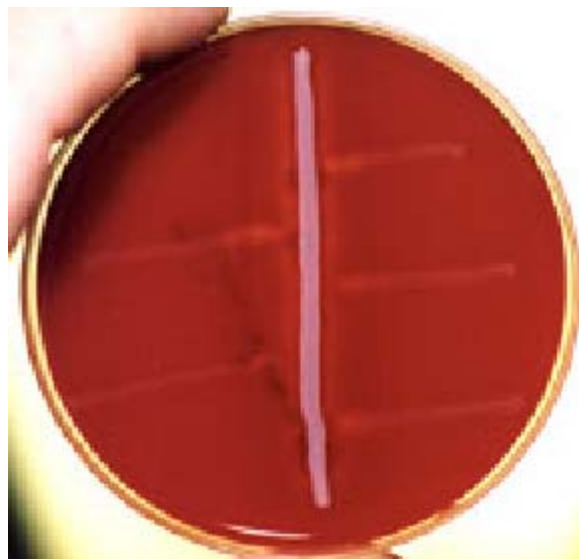


FIGURA 11- Carne pré-moída bovina sem sulfito e com sulfito da esquerda para a direita.



QUADRO 1 - Comportamento das espécies de *Listeria* no “CAMP test”

	Produz hemólise com	
	<i>Staphylococcus aureus</i> (S)	<i>Rhodococcus equi</i> (R)
<i>L. monocytogenes</i>	+	-*
<i>L. ivanovii</i>	-	+
<i>L. innocua</i>	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-
* Cepas raras são S+ and R+. A reação R+ é menos pronunciada do que a reação da <i>L. ivanovii</i> .		

Fonte: HITCHINS (1998)

QUADRO 2 - Diferenciação bioquímica entre cepas de *Listeria* spp.

Espécies	β Hemolyse ^a	Manitol	Rhamnose	Xylose	Virulência ^b
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	-	+
<i>L. ivanovii</i> ^c	+	-	-	+	+
<i>L. innocua</i>	-	-	V ^d	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	V ^d	+	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	+	-
<i>L. grayi</i> ^e	-	+	V ^d	-	-

^a Ágar sangue de carneiro.

^b Teste em ratos

^c Cepas que fermentam a ribose são classificadas como *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* e as que não fermentam *L. ivanovii* subsp. *londiniensis*.

^d V, biótipos variados

^e Incluem duas espécies - *L. grayi* subsp. *murrayi* reduz o nitrato; *L. grayi* subsp. *grayi* que não reduz o nitrato.

Fonte: HITCHINS (1998)