



15° Congresso de Iniciação Científica

OCORRÊNCIA DE LISTERIA MONOCYTOGENES EM QUEIJOS FRESCOS OBTIDOS NO VAREJO

Autor(es)

NICOLLE FERRAZ DE ARRUDA

Orientador(es)

Valmir Eduardo Alcarde

Apoio Financeiro

FAPIC

1. Introdução

Listeria monocytogenes é um microrganismo amplamente distribuído no ambiente e que tem seu habitat natural o solo e vegetais, incluindo os cultivados. Os animais podem ser portadores da bactéria e suas fezes transformarem-se em fonte de contaminação. Os sintomas demoram cerca de 9 a 32 horas para se manifestar, sendo que inicialmente podem ser confundidos com os de uma gripe comum, evoluindo para um quadro de diarreias e vômitos, que precedem sintomas mais graves da doença: dores de cabeça, confusão mental, perda de equilíbrio e convulsões. A Listeria também é uma das principais causas de meningite aguda infecciosa. (Peresi et al., 2001) Os alimentos envolvidos nos surtos relatados, em geral passaram por processo de industrialização. Embora a ocorrência da listeriose seja relativamente baixa, há relatos da presença de L. monocytogenes, em frequências variáveis, em todos os tipos de alimentos, incluindo queijos. Sendo um microrganismo psicrotrófico e anaeróbio facultativo, muitos processos de conservação não são eficazes contra este patógeno. Sendo de origem ambiental, está adaptado ao alimento, compete bem com a microbiota naturalmente presente e resiste às mudanças de pH, temperatura, escassez de nutrientes e outros fatores. Adapta-se com facilidade ao ambiente artificial, como o de uma indústria processadora de alimentos. Dentre os produtos derivados do leite, queijo é considerado um veículo freqüente de patógenos de origem alimentar e, em especial os queijos frescos, o qual de acordo com a legislação vigente, trata-se de produto obtido de leite pasteurizado integral ou parcialmente desnatado, através da coagulação enzimática com o coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementadas ou não com ação e bactérias lácticas. Inúmeras indústrias sob inspeção de órgãos competentes, produzem vários tipos de queijo, respeitando as boas práticas de fabricação, buscando obtenção de um produto compatível com o padrão de qualidade estabelecido. No entanto, devido a simplicidade de sua produção, o queijo Minas frescal, vendido em feiras livres e outros estabelecimentos comerciais, podem ser de fabricação caseira. (Peresi et al., 2001)

A contaminação microbiana desses produtos assume destacada importância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos. Vários estudos realizados em diferentes países sobre a qualidade microbiológica em queijos, relataram a ocorrência de patógenos, em números que excedem os limites estabelecidos pela legislação, e dentre estas bactérias detectadas, destaca-se a *L. monocytogenes*. (Mac Gowan et al., 1994; Fenlon et al., 1996). Apesar da importância da ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos lácteos, existem poucos estudos sobre sua incidência em queijos produzidos no Brasil. A grande frequência de casos de listeriose, veiculadas por queijos evidencia a importância desse alimento na cadeia epidemiológica de transmissão de *Listeria* spp.

2. Objetivos

Estudar a ocorrência natural de *L. monocytogenes* em queijos frescos obtidos no varejo, na cidade de Santa Bárbara d'Oeste e Piracicaba-SP.

3. Desenvolvimento

3.1. Amostras: foram analisadas 19 amostras de queijo fresco, 11 obtidas em varejos da cidade de Santa Bárbara D'Oeste – SP no período de Agosto a Dezembro de 2006 e, as outras 8 em Piracicaba – SP no período entre Março a Maio de 2007. As amostras foram transportadas para o laboratório de Engenharia de Alimentos da Unimep para as análises microbiológicas. 3.1.1. Preparo das amostras do queijo para as análises: com uma faca previamente esterilizada foram cortadas porções, de diferentes partes do queijo, perfazendo 10g da amostra, tendo assim uma maior representatividade da amostra. 3.2. Ocorrência de *L. monocytogenes* em queijo fresco: as análises foram efetuadas pela metodologia recomendada pela Food and Drug Administration (Donnelly et al., 1992), como segue: 3.2.1. Enriquecimento a 35°C: partindo-se de 10 g das amostras foram realizados o enriquecimento em dois meios diferentes: *Listeria* Enrichment Broth (LEB) e Tryptic Soy Broth (TSB) adicionado de 0,6% de extrato de levedura (EL). As amostras de 10 g foram adicionadas em 100 ml de cada caldo e incubadas a 35°C/48h em estufa BOD. Após a incubação, o isolamento foi realizado por estrias em superfície em placas com meio seletivo: ágar *Listeria* Selective base (Oxford formulation), adicionados dos respectivos suplementos e incubados a 30°C/24h-48h. 3.3. Identificação de *L. monocytogenes*: após a incubação foi feita a leitura da placa de ágar Oxford. Todas as colônias que se aproximaram das características típicas de *L. monocytogenes* nestes meios: colônias pequenas, uniformes, com aspecto perolado e enegrecimento do meio ao seu redor foram selecionadas para posterior identificação. As provas de identificação recomendadas seguem o sugerido em Donnelly et al. (1992).

3.3.1. Coloração de Gram: foi feita a coloração clássica, a partir de uma cultura de 24 h. As colônias suspeitas para *L. monocytogenes* são as que se apresentavam como bastonetes pequenos Gram-positivos.

3.3.2. Prova da catalase: usando uma alça de platina a amostra da cultura de 24 hs foi espalhada sobre uma lâmina de vidro e misturada com uma gota de H₂O₂ 20%. A prova positiva para *L. monocytogenes* é o aparecimento de desprendimento de gás.

3.3.3. Fermentação de açúcares: a prova foi realizada em caldo púrpura de bromocresol, adicionado dos açúcares: glicose, xilose, ramnose e sacarose incubados 35°C/24-48h em estufa BOD.

4. Resultados

Os resultados encontrados nos ensaios realizados são apresentados na Tabela 1. TABELA 1 De acordo com Donnelly et al.(1992) *L. monocytogenes* é caracterizado por apresentar células na forma de bastonetes pequenos, Gram positivo e não esporogênico; as suas colônias são pequenas, uniformes e com aspecto perolado e enegrecimento do meio de cultivo, quando se desenvolvem em Ágar Oxford; a prova de catalase para este microrganismo é positiva; e o mesmo fermenta os açúcares glicose e ramnose. A microbiota observada em quase todas as amostras de queijo fresco analisado e apresentada na Tabela 1 indica

características macro e micromorfológicas diferentes das esperadas para *L. monocytogenes*. Apenas as amostras 17 a 19 mostraram características macro e micromorfológicas (forma das células vegetativas, coloração de Gram, prova da catalase e características das colônias) suspeitas para *L. monocytogenes*. Assim colônias destas amostras foram submetidas à prova de fermentação de açúcares e os resultados desta análise são apresentados na Tabela 2. TABELA 2 De acordo com Donnelly et al (1992), *L. monocytogenes* apresenta fermentação positiva para os açúcares glicose e ramnose e fermentação negativa para os açúcares sacarose e xilose. Os resultados encontrados na prova de fermentação de açúcares para as colônias 17, 18 e 19 diferem daqueles citados por Donnelly et al (1992), indicando com isto que as colônias suspeitas não eram de *L. monocytogenes*. Este resultado também indica o emprego de matéria prima de qualidade para o processamento do queijo e/ou o emprego de boas práticas de manipulação, processamento e higiene industrial e/ou adequado manejo durante o armazenamento do produto, para se evitar contaminação com *L. monocytogenes*.

5. Considerações Finais

Os resultados obtidos nos ensaios realizados indicaram ausência de *L. monocytogenes* em todas as amostras de queijo fresco analisadas.

Referências Bibliográficas

DONNELLY, R. E. *et al.* *Listeria*. In: VANDERZANT, C. e SPLITSTOESSER, D. F.. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Cap. 38. Washington, D.C.: American PublisherAssociation, 1992, p.637-663.

FENLON, D. R. *et al.* **The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing**. Journal of Applied Bacteriology, v.81, n.6, 1996, p.641-650.

MacGOWAN, A. P. *et al.* **The occurrence and seasonal changes in the isolation of *listeria spp.* in shop bought food stuffs, human feces, sewage and soil from urban sources**. International Journal of Food Microbiology, v.21, n.4, 1994, p.325-334.

PERESI, J.T.M.; GRACIANO, R.A.S.; ALMEIDA, I.A.Z.C, LIMA, S.I.L., Queijo Minas tipo Frescal artesanal e industrial: qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes microbianos. **Revista Higiene Alimentar**, v.15, nº83, p 63-70, abril. 2001.

Anexos

Tabela 1: Testes para detecção de *A. hydrophila*

fresco

Amostra/Data de coleta/local	Morfologia Celular	Características da Colônia
Amostra 1 a 11 - Agosto a Dezembro de 2006 - Santa Bárbara D'Oeste - SP	Cocos	Pequena, opaca, e com bordas irregulares
Amostra 12, 13 e 15 - Março de 2007 - Piracicaba - SP	Cocos	Pequena, opaca, e com bordas irregulares
Amostra 14 e 16 - Março de 2007 - Piracicaba - SP	Bastonetes curtos	Pequena, opaca, e com bordas irregulares
Amostra 17 a 19 - Maio de 2007 - Piracicaba - SP	Bastonetes curtos	Pequena, uniforme, perolada, e enegrecida no centro

Tabela 2: Teste de Fermentação de Açúcares

Amostra	Glicose	Sacarose
17	(positivo)+	(positivo)+
18	(positivo)+	(positivo)+
19	(positivo)+	(negativo)-