



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**LÍVIA PÍCCOLO RAMOS**

***Listeria monocytogenes* EM LINGUIÇAS DO TIPO FRESCAL  
VENDIDAS A VAREJO NO MUNICÍPIO DE SALVADOR-BA E  
EFICÁCIA DO BACTERIÓFAGO P100 NO CONTROLE DA  
CONTAMINAÇÃO PELO PATÓGENO**

Salvador  
2009

**LÍVIA PÍCCOLO RAMOS**

***Listeria monocytogenes* EM LINGUIÇAS DO TIPO FRESCAL  
VENDIDAS A VAREJO NO MUNICÍPIO DE SALVADOR-BA E  
EFICÁCIA DO BACTERIÓFAGO P100 NO CONTROLE DA  
CONTAMINAÇÃO PELO PATÓGENO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em  
Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da  
Universidade Federal da Bahia, como requisito final para  
obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Rogeria Comastri de Castro Almeida

Salvador  
2009

**Sistema de Bibliotecas - UFBA**

R175 Ramos, Livia Piccolo.

*Listeria monocytogenes* em linguiças do tipo frescal vendidos a varejo no município de Salvador-BA e eficácia do bacteriófago P100 no controle da contaminação pelo patógeno / Livia Piccolo Ramos. - 2009.

105 f. : il.

Inclui anexos.

Orientadora : Profª Drª Rogeria Comastri de Castro Almeida.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2009.

1. *Listeria monocytogenes*. 2. Salsichas - Contaminação. 3. Listeriose - Microbiologia. 4. Segurança alimentar. 5. Embutidos (Alimentos). 6. Bacteriófagos. I. Almeida, Rogeria Comastri de Castro. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. III.

Título.

CDU - 614.97

CDD - 615.952937



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

## TERMO DE APROVAÇÃO

LÍVIA PÍCCOLO RAMOS

*Listeria monocytogenes* EM LINGUIÇAS DO TIPO FRESCAL VENDIDAS A VAREJO  
NO MUNICÍPIO DE SALVADOR-BA E EFICÁCIA DO BACTERIÓFAGO P100 NO  
CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO PELO PATÓGENO.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos  
(nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da  
Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em ciência de  
alimentos.

Aprovada em 30 de março de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Rogéria Comastri de Castro Almeida  
Universidade Federal da Bahia  
Orientadora

Emiko Shinozaki Mendes  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Aláise Gil Guimarães  
Universidade Federal da Bahia

A Deus, pelo dom da vida e presença constante.

Ao meu esposo, Ettore Rossi Neto, pela compreensão e incentivo durante esta importante etapa de minha vida.

Aos meus pais, Márcio Mota Ramos e Maria da Penha Pícolo Ramos, pelo exemplo de profissionalismo, amor incondicional e por constituírem peças fundamentais na minha vida.

Ao meu irmão, Leonardo Pícolo Ramos, por ser parte da minha vida, pela amizade e cumplicidade.

## AGRADECIMENTOS

À Professora Rogeria C. C. Almeida, pela oportunidade, confiança, paciência, dedicação e, principalmente, pela sua orientação imprescindível na realização desta pesquisa.

Ao Professor Paulo F. Almeida, pelo período em que realizei minhas atividades no Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos – ICS/UFBA e também pelas contribuições.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo apoio financeiro.

Às professoras Alaíse Gil Guimarães e Ryzia de Cássia Vieira Cardoso, pelas críticas, sugestões e pela contribuição na minha qualificação.

A todos os professores, funcionários e colegas do Mestrado, por todo apoio e dedicação.

Às amigas Layse dos Santos Lopes e Ana Cláudia Leite, pela grande ajuda durante a realização do experimento.

Ao Dr. Ernesto Hofer e a todos os colaboradores do Laboratório de Zoonoses - Departamento de Bacteriologia da FIOCRUZ, pela realização da caracterização antigênica das cepas de *Listeria* spp. isoladas.

Ao Dr. Steven Hagens da Universidade de Wageningen, Holanda, pela doação do bacteriófago LISTEXTM P100.

A Fernando França da Cunha, pela imensa contribuição como estatístico desta pesquisa.

Aos funcionários Ana Cristina e Luís, pela amizade e ajuda nas atividades laboratoriais.

À minha tia, Angeolina Rossi, por não medir esforços para me ajudar no que for necessário, sempre.

A todos os meus amigos e familiares, pelo grande incentivo e pela confiança.

Enfim, à valiosa participação de todos que, direta ou indiretamente foram de fundamental importância para a realização de mais um sonho.

# LISTA DE FIGURAS

## CAPÍTULO 1

Figura 1 - *Listeria monocytogenes* – microscopia óptica/coloração de Gram.....

Figura 2 - Aspecto morfológico de *Listeria monocytogenes* – microscopia eletrônica.....

Figura 3 - Prova de motilidade a 25°C.....

Figura 4 - Visão esquemática dos passos que levam à liberação de uma progênie fágica de uma célula infectada. Adaptado de Hagens; Offerhaus (2008) .....

## CAPÍTULO 3

Figura 1 - Efeito do fago P100 no controle da contaminação por *L. monocytogenes* 1/2a em linguiça suína tipo frescal, nos tempos zero e 10 .....

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1 - Amostras de linguiças investigadas para a presença de *Listeria* spp.....
- Tabela 2 - Características fenotípicas e bioquímicas dos isolados .....
- Tabela 3 - Presença de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* nas amostras de linguiça.....
- Tabela 4 - Sorotipos de *Listeria* spp. isolados das amostras de linguiças .....

### CAPÍTULO 3

- Tabela 1 - População de *L. monocytogenes* 1/2a (UFC/mL) obtida no preparo da suspensão bacteriana e título (UFP/mL) do fago P100.....
- Tabela 2 - Título do fago P100 obtido após a inoculação das amostras de linguiça para os tempos zero e 10 .....
- Tabela 3 - População de *L. monocytogenes* 1/2a após a inoculação das amostras de linguiça, nos tempos zero e 10 .....
- Tabela 4 - Valores médios das contagens de *L. monocytogenes* 1/2a (log de UFC/g) nas amostras de linguiça em função da adição ou não do bacteriófago P100, nos tempos zero e 10 .....
- Tabela 5 - Valores médios das contagens de *L. monocytogenes* 1/2a (log de UFC/g) nas amostras de linguiça tratadas com o bacteriófago P100, nos tempos zero e 10 .....

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>OBJETIVOS</b> .....	18
GERAL .....	18
ESPECÍFICOS .....	18
<b>CAPÍTULO 1</b>	
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA - <i>Listeria monocytogenes</i> : DETECÇÃO E CONTROLE .....	
1 HISTÓRICO E CARACTERIZAÇÃO.....	5
2 MECANISMOS DE PATOGENICIDADE.....	12
3 LISTERIOSE .....	14
4 PRINCIPAIS SURTOS.....	18
5 OCORRÊNCIA DE <i>L. monocytogenes</i> EM ALIMENTOS.....	22
5.1 Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> em embutidos cárneos .....	26
6 LEGISLAÇÃO E <i>Listeria monocytogenes</i> .....	27
7 MÉTODOS DE DETECÇÃO DO MICRORGANISMO EM ALIMENTOS .....	28
8 BACTERIÓFAGOS PARA CONTROLE DE BACTÉRIAS PATOGENICAS EM ALIMENTOS .....	31
8.1 Considerações em uma estratégia de biocontrole com fago .....	33
8.2 Fatores que afetam o sucesso dos fagos como agentes de biocontrole.....	37
8.3 Sobrevivência do fago em alimentos e nas instalações do processamento.....	38
8.4 Uso do bacteriófago P100 para controle de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	40
REFERÊNCIAS .....	44

## CAPÍTULO 2

INVESTIGAÇÃO DE <i>Listeria monocytogenes</i> EM LINGUIÇAS DO TIPO FRESCAL VENDIDAS A VAREJO NO MUNICÍPIO DE SALVADOR-BA.....	61
RESUMO.....	61
ABSTRACT .....	62
1 INTRODUÇÃO .....	62
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	66
2.1 Material .....	66
2.1.1 Microrganismo de referência.....	66
2.1.2 Alimentos .....	66
2.2 Metodologia.....	66
2.2.1 Desenho e local do estudo.....	66
2.2.2 Amostragem.....	66
2.2.3 Tratamento das amostras .....	67
2.2.4 Investigação da presença de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	67
2.2.5 Provas bioquímicas.....	69
2.2.6 Caracterização antigênica das cepas isoladas de <i>Listeria</i> .....	70
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	70
3.1 Caracterização fenotípica e bioquímica dos isolados para identificação de <i>L. monocytogenes</i> .....	70
3.2 Caracterização antigênica das cepas isoladas de <i>Listeria</i> .....	74
4 CONCLUSÃO .....	76
REFERÊNCIAS.....	77

## CAPÍTULO 3

EFICÁCIA DO BACTERÍOFAGO P100 NO CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO POR <i>Listeria monocytogenes</i> INOCULADA ARTIFICIALMENTE EM LINGUIÇA DO TIPO FRESCAL.....	82
RESUMO.....	82
ABSTRACT .....	83
1 INTRODUÇÃO.....	84
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	85
2.1 Material .....	85
2.1.1 Microrganismos de referência.....	85
2.1.2 Alimento .....	86
2.2 Metodologia .....	86
2.2.1 Desenho e local do estudo.....	86
2.2.2 Amostragem.....	86
2.2.3 Preparo da suspensão bacteriana de <i>L. monocytogenes</i> 1/2a .....	86
2.2.4 Obtenção do título do bacteriófago P100.....	87
2.2.5 Ensaio para verificar a eficácia do fago P100.....	88
2.2.5.1 Preparo das amostras de linguiça para os experimentos .....	88
2.2.5.2 Preparo das amostras controle para o fago P100.....	88
2.2.5.3 Preparo das amostras controle para <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a .....	89
2.2.5.4 Tratamento das amostras .....	90
2.2.6 Análise estatística .....	91
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	91
3.1 Obtenção do inóculo de <i>L. monocytogenes</i> 1/2a e determinação do título do bacteriófago P100 .....	91
3.2 Avaliação da eficácia do P100 sobre células de <i>L. monocytogenes</i> 1/2a inoculadas em amostras de linguiça suína do tipo frescal .....	92

3.2.1	Amostras de linguiça controle para o bacteriófago P100 .....	92
3.2.2	Amostras de linguiça controle para células de <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a.....	94
3.2.3	Tratamento das amostras de linguiça inoculadas artificialmente com <i>L. monocytogenes</i> 1/2a e submetidas ao fago P100 .....	95
3.3	Análise estatística .....	97
4	CONCLUSÃO .....	99
	REFERÊNCIAS.....	100
	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	103
	ANEXO.....	105

## RESUMO

Os surtos de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA) constituem alvo de preocupação para as indústrias alimentícias e para os órgãos de saúde pública. *Listeria monocytogenes* é conhecida como um importante patógeno causador de doenças veiculadas por alimentos, e sua importância vem aumentando desde a década de 1980. Apesar de o número de casos da doença por ano ser relativamente baixo, a infecção pode ser grave, com letalidade acima de 30%. Em pesquisas realizadas no Brasil foi identificada uma incidência de 32% em amostras de produtos cárneos com uma taxa de isolamento de 80% em linguças do tipo frescal elaboradas com carne suína. Apesar dos recentes avanços nas tecnologias de controle de patógenos em alimentos, os consumidores têm procurado alimentos “naturais”, isto é, submetidos a tratamentos menos agressivos e isentos de conservadores químicos. Em 2007, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) e a agência norte-americana Food and Drug Administration (FDA) aprovaram o uso do LISTEX™ P100, um bacteriófago específico para o controle de *Listeria monocytogenes*, para todos os tipos de alimentos. Bacteriófagos são vírus que infectam somente bactérias e não infectam células animais ou vegetais. Eles estão largamente distribuídos no ambiente, e o homem está exposto a eles em altas concentrações através da água e dos alimentos, sem qualquer efeito adverso à sua saúde. A importância que a carne representa na alimentação humana, associada à necessidade de se oferecer sempre um alimento inócuo e incapaz de veicular doenças ao homem, motivou o desenvolvimento desta pesquisa, que teve como objetivos verificar a ocorrência de *Listeria monocytogenes* em linguças do tipo frescal vendidas a varejo em estabelecimentos comerciais da cidade de Salvador-BA e avaliar a eficácia do agente antimicrobiano, bacteriófago P100 (LISTEX™ P100), sobre células de *Listeria monocytogenes* inoculadas artificialmente no alimento. Foram examinadas 40 amostras de linguças do tipo frescal de carne suína e 40 de frango, de diferentes marcas comerciais. Isolou-se *Listeria* spp. em 12 amostras (15%), das quais três (3,75%) foram positivas para *L. monocytogenes*. Entre as espécies, *L. innocua* foi isolada com maior frequência, em 11 amostras (13,75%); em duas amostras foram detectadas as duas espécies. As cepas de *L. monocytogenes* isoladas das amostras pertenciam ao sorotipo 1/2a. Na investigação da eficácia do uso do bacteriófago P100 no controle da contaminação do embutido pelo microrganismo, verificou-se uma redução de três ciclos logarítmicos na população inicial do microrganismo, diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Também foi encontrada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando se comparou o tratamento no tempo 0 (zero) e no tempo 10, com aumento da população do patógeno no alimento após 10 dias de armazenamento, o que remete a necessidade de se utilizar um fago com título mais elevado.

## ABSTRACT

The outbreaks of Food-borne Diseases are a reason of concern for the food industries and public health organs. *Listeria monocytogenes* is known as an important pathogen causing diseases transmitted by food and its importance has been growing since the 1980s. Although the number of disease cases per year is relatively low, the infection can be serious, with lethality rate at 30%. Research works conducted in Brazil reported an incidence of 32% in meat product samples with an isolation rate of 80% in Brazilian fresh sausage (“linguiça do tipo frescal”) made with pork meat. Despite the recent technological advancements in pathogen control in foods, consumers have sought natural foods, i.e., foods submitted to less aggressive treatments without chemical preservatives. In 2007, the Department of Agriculture of the United States (USDA) and the North America Agency Food and Drug Administration (FDA) approved the use of LISTEX™ P100, a bacteriophage specific for the control of *Listeria monocytogenes*, for all types of food. Bacteriophages are viruses that infect only bacteria and do not infect animal or plant cells. They are widely distributed in the environment and humans are exposed to them at high concentrations through water and foods, without any adverse effect to health. The role played by meat in human nutrition, associated to the need of offering an innocuous food, incapable of transmitting diseases to humans, has led to the development of this research, whose objectives were to verify the incidence of *Listeria monocytogenes* in Brazilian fresh sausages sold in commercial establishments in the city of Salvador-BA and to evaluate the efficacy of the antimicrobial agent bacteriophage P100 (LISTEX™ P100) in the cells of *Listeria monocytogenes* artificially inoculated in the food. Forty samples of type pork Brazilian fresh sausages and 40 samples of chicken, of different commercial brands were taken. *Listeria* spp was isolated in 12 samples (15%) of which three (3.75%) were positive for *L. monocytogenes*. Among the species, *L. innocua* was isolated with greater frequency in 11 samples (13.75%); the two species were detected in two samples. The strains of *L. monocytogenes* isolated from the samples belonged to the serotype 1/2a. When investigating the efficacy in the use of the bacteriophage P100 in controlling Brazilian fresh sausage contamination by the microorganism, the results showed a reduction of three logarithmic cycles in the initial population of the microorganism, a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ). A significant difference ( $p < 0.05$ ) was also found when 0 (zero) time treatment was compared with time 10 treatment, showing increase in the pathogen's population in the food after 10 days of storage and the need to use a phage with a higher titer.

## INTRODUÇÃO

Apesar da utilização de diferentes técnicas para garantir a qualidade e a inocuidade dos produtos alimentícios, as Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA) continuam sendo um problema de saúde pública.

Diversos microrganismos podem causar DVA, inclusive *L. monocytogenes*, que se encontra amplamente distribuída na natureza – fato que explica a facilidade com que é encontrada em alimentos, desde a produção até o consumo. O microrganismo destaca-se devido à sua capacidade de sobreviver e proliferar em alimentos mantidos sob temperaturas de refrigeração, podendo também se desenvolver em atmosferas modificadas, em razão de sua característica de microaerofilia. Possui elevada resistência fisiológica, sendo difícil controlar ou prevenir sua presença em alimentos, principalmente naqueles que sofrem tratamento térmico.

Entre os alimentos já envolvidos nos surtos de listeriose, têm-se o leite cru e pasteurizado, queijos, carne bovina, suína, de aves e derivados, frutos do mar, além de produtos de origem vegetal, crus ou processados, e refeições preparadas.

A carne e derivados incluem-se entre os alimentos que mais preocupam os serviços de saúde pública, em razão dos riscos que oferecem pela contaminação por uma grande variedade de bactérias patogênicas. As linguiças suínas e de frango apresentam-se como excelentes substratos para o desenvolvimento de microrganismos, devido a uma série de fatores favoráveis, como pH pouco ácido, elevada atividade de água, mistura de diferentes tipos de ingredientes, entre outros. Além disso, as linguiças produzidas artesanalmente são submetidas a intenso manuseio durante seu processamento, aumentando a probabilidade de contaminação por microrganismos indesejáveis.

A ingestão de alimentos contaminados por *Listeria monocytogenes* é particularmente perigosa para gestantes, indivíduos com síndrome de imunodeficiência adquirida, cirrose, carcinoma e outras doenças que provocam comprometimento do sistema imunológico; contudo, a doença pode ocasionalmente

ocorrer em indivíduos não predispostos. Idosos e recém-nascidos também são susceptíveis à listeriose e enquadrados como indivíduos de alto risco.

Apesar da aplicação de rigorosos procedimentos de limpeza e sanitização no ambiente de processamento da indústria, os alimentos processados têm sido contaminados por *L. monocytogenes*, mesmo quando a matéria-prima está livre do patógeno. *L. monocytogenes* pode aderir a vários tipos de superfícies, sendo encontrada em biofilmes nos ambientes de processamento de carnes e produtos de laticínios; é possível que algumas linhagens de *L. monocytogenes* possam ter adquirido resistência aos sanitizantes comumente usados pelas indústrias. Dessa forma, a resistência natural do microrganismo a muitos dos sistemas de preservação de alimentos, que são efetivos contra outros patógenos responsáveis por toxinfecções alimentares, tem despertado a atenção e incentivado as pesquisas para o desenvolvimento de sistemas mais efetivos de controle da bactéria.

Uma das formas de controlar a multiplicação de microrganismos indesejáveis nos alimentos é o uso de conservadores químicos. No entanto, a utilização desses agentes não é compatível com a imagem de produtos “naturais”, de grande apelo comercial atualmente. Além disso, alguns conservadores adicionados aos alimentos, visando o aumento da segurança e da vida útil, podem levar à formação de compostos com efeito carcinogênico ao organismo humano, como ocorre com o nitrato adicionado a produtos cárneos.

Os bacteriófagos podem ser considerados inimigos naturais das bactérias, sendo, portanto, candidatos lógicos à avaliação como agentes para o controle espécie-específico de bactérias patogênicas durante as fases de pré e pós-processamento e armazenamento de alimentos. São parasitos intracelulares obrigatórios, que utilizam as bactérias para sua multiplicação; logo, são componentes da microbiota natural da produção de alimentos, desde o campo até a comercialização do produto final. São estáveis nesses ambientes e prontamente recuperados de solo, efluentes, água, fezes e alimentos.

Vários fagos têm sido estudados com o objetivo de controlar a proliferação de microrganismos patogênicos. LISTEX™ P100, uma solução antimicrobiana composta de seis bacteriófagos específicos para o controle de *L. monocytogenes* em queijos, mostrou-se efetiva para 170 estirpes desse patógeno e permitiu que a resistência adquirida pelo microrganismo fosse minimizada.

O desenvolvimento deste estudo traz uma contribuição para o conhecimento da ocorrência de *Listeria monocytogenes* em embutidos cárneos crus, linguiça, vendidos a varejo na cidade de Salvador-BA, bem como sobre a eficácia do uso do bacteriófago P100 no controle da contaminação pelo patógeno nesse alimento.

## OBJETIVOS

### GERAL

Verificar a ocorrência de *Listeria monocytogenes* em embutidos cárneos crus – linguiças do tipo frescal – vendidos a varejo em estabelecimentos comerciais da cidade de Salvador-BA e avaliar a eficácia do bacteriófago P100 (LISTEX™) sobre cepas de *Listeria monocytogenes* inoculadas artificialmente no alimento cru.

### ESPECÍFICOS

- Investigar a ocorrência de espécies de *Listeria* em linguiças do tipo frescal preparadas com carne suína e também com carne de frango, de diferentes marcas e lotes;
- Identificar sorologicamente as espécies de *Listeria* spp. isoladas;
- Avaliar a eficácia do bacteriófago P100 sobre células de *Listeria monocytogenes* inoculadas artificialmente no embutido cárneo cru, determinando a influência do tempo de refrigeração nos tratamentos empregados.

**CAPÍTULO 1**  
**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**  
***Listeria monocytogenes*: DETECÇÃO E CONTROLE**

## **1 HISTÓRICO E CARACTERIZAÇÃO**

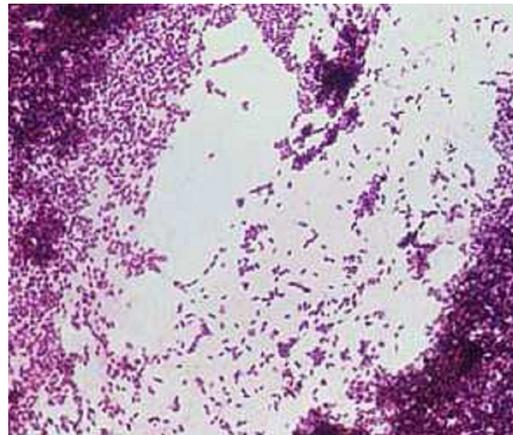
Em 1929, Murray et al., durante uma epizootia entre coelhos e cobaias de um biotério em Cambridge, Reino Unido, isolaram microrganismos que causavam intensa monocitose, nomeando o agente como *Bacterium monocytogenes*. Um ano mais tarde, na África do Sul, observou-se uma doença similar em roedor selvagem e, em honra ao cirurgião Lord Lister, denominou-se o agente como *Listerella hepatolytica*; contudo, 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* (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

Os primeiros isolamentos confirmados do microrganismo de indivíduos infectados ocorreram em 1929 por Gill em ovelhas e Nyfeldt em humanos. Mais tarde, casos esporádicos de listeriose foram reportados, os quais estavam associados a indivíduos que tiveram contato com animais doentes, caracterizando-a como uma doença ocupacional. Na década de 1980, como resultado do relato de diversos surtos decorrentes da ingestão de alimentos contaminados, o interesse pelo microrganismo cresceu rapidamente entre as indústrias, empresas reguladoras e pesquisadores (FARBER; PETERKIN, 1991).

As bactérias do gênero *Listeria* estão amplamente disseminadas na natureza (ubiquidade microbiológica). São anaeróbias facultativas e tem a tendência a se dispor em paliçada, fato evidenciado em esfregaços comuns observados em microscópio óptico (PICHI et al., 1999).

Atualmente, divide-se em seis espécies: *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*, *Listeria ivanovii* e *Listeria grayi*, como evidenciado pelos valores de homologia de DNA, sequência 16rRNA, propriedades quimiotaxonômicas e análise de enzima multilocus (McLAUHLIN, 1997a; ROCOURT, 1999; DONNELLY, 2001).

*Listeria monocytogenes* é um bacilo Gram-positivo (Figura 1), pequeno, curto, de 0,4-0,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 0,5-2,0  $\mu\text{m}$  de comprimento, com extremidades arredondadas, que pode apresentar forma cocoide ou filamentosa, em culturas com 2-3 dias (FARBER; PETERKIN, 1991; PHAN-THANH et al., 2000; LOVETT, 1989), podendo ser observado isolado ou em cadeias curtas (ROCOURT, 1999; RYSER; MARTH, 1991; DONNELLY, 2001). Assemelha-se a cocos em culturas velhas e perde a habilidade em reter corantes de Gram, o que leva frequentemente a erros de identificação (SEELIGER; JONES, 1986). Consequentemente, as espécies do gênero *Listeria* algumas vezes são erroneamente classificadas como *Corynebacterium* spp., *Haemophilus influenza*, *Erysipelothrix* spp., pneumococos, estreptococos ou estafilococos (RYSER; MARTH, 1991; DONNELLY, 2001).



**Fonte:** Kenneth Todar - University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology (2003).

Figura 1 – *Listeria monocytogenes* – microscopia óptica/coloração de Gram.

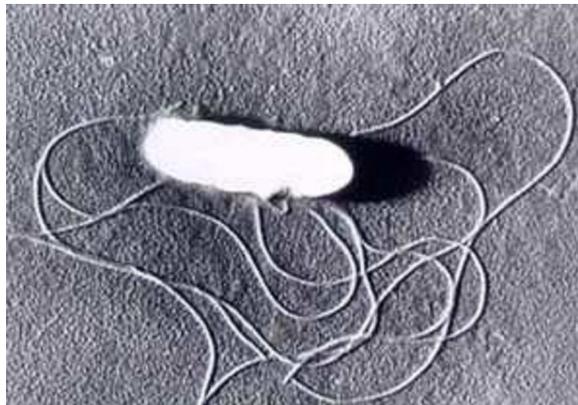
É um microrganismo desprovido de cápsula, não formador de esporos (LOGUERCIO et al., 2001) e multiplica-se tanto em aerobiose como anaerobiose, com preferência a ambientes microaerofílicos (ROCOURT, 1999). Possui rápida multiplicação na maioria dos meios bacteriológicos, crescendo bem em caldo infusão cérebro coração (BHI), caldo soja tripticase e caldo tripticase (JAY, 1996).

O microrganismo requer biotina, riboflavina, tiamina e aminoácidos como cisteína, glutamina, isoleucina e valina para o seu crescimento. Em ágar nutriente, as colônias típicas de *Listeria* são cinza-azuladas, apresentando de 0,2 a 0,8  $\mu\text{m}$  de

diâmetro após 24 horas de incubação (DONNELLY, 2001). As colônias, quando visualizadas à luz transmitida em direção oblíqua, apresentam brilho azul-esverdeado (JAY, 1996; ROCOURT, 1999).

Diversos fatores podem afetar o crescimento, a sobrevivência e a multiplicação de *Listeria* em alimentos, entre eles: temperatura, pH, atividade de água, cloreto de sódio, nitrito de sódio, conservantes e atmosfera (KASNOWSKI, 2004).

É um patógeno psicrotrófico que se multiplica geralmente em temperaturas que variam de -0,4 °C a 50 °C, com multiplicação ótima entre 30 e 37 °C (DONNELLY, 2001). Tem como características peculiares a relativa resistência térmica e capacidade de multiplicação em temperatura de refrigeração. Possui flagelos peritríquios (Figura 2), os quais dão motilidade ao microrganismo (PICHI et al., 1999). Esse comportamento ocorre somente em faixas restritas de temperatura (20 °C a 25 °C). Nessa temperatura, a colônia segue a linha de picada e, em seguida, distribui-se sobre o meio, lembrando o formato de um guarda-chuva (Figura 3) (FARBER; PETERKIN, 1991; HOLT et al., 1994; ROCOURT, 1999).



**Fonte:** University of Wisconsin-Madison Department Bacteriology. Kenneth Todar (2003).

Figura 2 – Aspecto morfológico de *Listeria monocytogenes* – microscopia eletrônica.



**Fonte:** Instituto Pasteur (2004).

Figura 3 – Prova de motilidade a 25 °C.

A bactéria pode tolerar concentrações de 10% a 30% de cloreto de sódio e crescer a uma atividade de água de 0,90, dependendo de fatores que influenciam a multiplicação, como pH e temperatura (LOVETT, 1989). Foi demonstrado que *Listeria monocytogenes* em ambientes com 25,5% de NaCl sobrevive por 132 dias a 4 °C, 32 dias a 22 °C e cinco dias a 37 °C (SEELIGER; JONES, 1986). Foi constatada a sobrevivência desse microrganismo em alimentos desidratados, indicando sua capacidade de tolerar atividade de água inferior a 0,93 (DOYLE et al., 1985).

Em relação ao pH, o patógeno se multiplica em valores de 4,4 a 9,6, com pH ótimo de crescimento de 7,0 (SCHUCHAT et al., 1991). Apresenta reação catalase positiva e oxidase negativa; expressa  $\alpha$ -hemolisina, produzindo uma zona de clareamento em ágar sangue, que não se estende muito para fora da região da colônia (FARBER; PETERKIN, 1991; HOLT et al., 1994); *L. ivanovii* forma halos grandes e bem definidos e *L. innocua* não apresenta hemólise. Produz ácido por fermentação da glicose, frutose, manose, galactose, celobiose, maltose, melezitose, trealose e ramnose, sem formação de gás; hidrolisa esculina, salicina, amigdalina e hipurato de sódio; apresenta teste vermelho de metil positivo; produz amônia a partir da arginina; reage negativamente para produção de sulfeto de hidrogênio, indol e nitrato redutase; liquefaz gelatina; hidrolisa amido e ureia; reduz telurito, e é parcialmente inibida por 0,02% de azida e cianida (JAY, 1996).

Apesar de as espécies de *Listeria* spp. serem fenotipicamente similares, elas podem ser diferenciadas pela produção de hemolisina, incluindo teste de CAMP

(Christie, Atkins e Munch-Petersen) e análise da patogenicidade em ratos (HOLT et al., 1994; ROCOURT, 1999; SEELIGER; JONES, 1986; SCHUCHAT et al., 1991), e pela produção de ácido a partir de D-xilose, L-ramnose e manitol (Quadro 1). A atividade hemolítica é a característica mais importante e a mais difícil na identificação de *Listeria monocytogenes* (HOLT et al., 1994).

Quadro 1 – Principais características das espécies de *Listeria*.

Característica	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. welshmeri</i>
Motilidade tipo guarda-chuva	+	+	+	+	+	+
Motilidade rotacional	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-
Crescimento em TSI <sup>1</sup>	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
Crescimento em presença de bile e hidrólise da esculina	+	+	+	+	+	+
OF glicose <sup>2</sup>	OF	OF	OF	OF	OF	OF
Redução Nitrato	-	-	-	-	-	ND*
β-hemólise	+	+	+	-	-	-
CAMP – <i>S. aureus</i>	+	+	-	-	-	-
CAMP – <i>R. equii</i>	-	-	+	-	-	-
Ácido a partir de Manitol	-	-	-	-	+	-
Ácido a partir de D-xilose	-	+	+	-	-	+
Ácido a partir de L-ramnose	+	-	-	+/-	-	+/-
Ácido a partir de α-metil-D-manosídeo	+	-	-	+	ND*	+

\* ND = não-determinado. <sup>1</sup> A/A = rampa ácida/fundo ácido. <sup>2</sup> OF = oxidativo e fermentativo.

**Fonte:** Ryser e Donnelly (2001); Holt et al. (1994).

A multiplicação das espécies de *Listeria* é estimulada por Fe<sup>3+</sup> e fenilalanina, tendo como requerimentos primários para seu desenvolvimento a glicose (fonte de carbono) e a glutamina (fonte de nitrogênio). A utilização de glicose em condições

aeróbias resulta na produção de lactato, acetato e acetoína como produtos finais. Por serem microaeróbias ou anaeróbias facultativas, as bactérias do gênero *Listeria* também podem se desenvolver em atmosferas modificadas (ROCCOURT, 1999).

Vários marcadores quimiotaxonômicos têm sido utilizados na verificação da posição filogenética do gênero *Listeria*, que pertence ao grupo de bactérias Gram-positivas de baixo conteúdo de G/C no DNA (< 55%), reforçando a sua distinção do gênero *Corynebacterium* spp. e a sua relação com bactérias lácticas (ROCCOURT, 1999).

Além das formas clássicas de identificação, que são os estudos culturais e bioquímicos, a análise antigênica constitui-se o teste confirmatório de diagnóstico. A composição antigênica da grande maioria das cepas caracteriza-se pelos antígenos "O", que geralmente conduzem as espécies *Listeria innocua* e *Listeria welshimeri*. A sua análise apresenta limitações para a diferenciação de *L. monocytogenes* e *L. seeligeri*, já que estas espécies hemolíticas possuem o mesmo padrão antigênico. Já os antígenos "H" estão mais relacionados às espécies do gênero, oferecendo alto grau de especificidade, exceto para *L. grayi*. Nenhum deles tem demonstrado reações cruzadas com outros anticorpos bacterianos (SEELIGER; LANGER, 1989).

Segundo Jay (2005), *L. monocytogenes* está representada por 13 sorovares, alguns dos quais são compartilhados por *L. innocua* e por *L. seeligeri*. Embora *L. innocua* esteja representada somente por três sorovares, muitas vezes ela 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 se multiplicar. Em geral, linhagens 4b são mais frequentemente associadas com surtos, enquanto linhagens ½ são mais relacionadas a isolamentos em produtos alimentícios. *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 et al., 2000).

Anteriormente, a especificidade antigênica de *L. monocytogenes* correspondia a apenas dois tipos sorológicos (1 e 4), estando um deles associado a roedores e o outro a ruminantes, e ambos, ao homem (FREEMAN, 1983). Posteriormente, com base em análises antigênicas mais detalhadas, demonstrou-se a existência de

antígenos somáticos termoestáveis e flagelares termolábeis contendo carboidratos em sua composição, tendo-se assim quatro tipos sorológicos principais (1, 2, 3 e 4) e a subdivisão em subtipos, dos quais os sorovares 4a e 4b são os mais importantes (SEELIGER; LANGER, 1989). A caracterização antigênica que define os sorovares é um sistema de tipagem que não apresenta uma capacidade discriminatória mais ampla, tendo em vista a incidência e/ou prevalência de um número limitado de sorotipos nas diferentes fontes de infecção e vias de transmissão. Assim, em *L. monocytogenes* são registrados como sorovares predominantes e cosmopolitas: 1a, 1b e 4b e, em plano secundário, 1c (McLAUCHLIN, 1997b; ROCOURT, 1996; SCHUCHAT et al., 1991; WHO, 1988). Ainda, o que pode ser reconhecido nas pesquisas são as variações desses sorovares comuns, a exemplo do predomínio de 1a sobre 4b nos produtos lácteos, ou da maior incidência de 1b sobre 1a nos produtos cárneos processados ou não (HOFER, 1999). É interessante notar que em outras fontes de infecção, assim como no meio ambiente, os sorovares predominantes são os mesmos, não demonstrando sofrer as possíveis interferências da sazonalidade e da origem geográfica (HOFER, 1999).

De acordo com Hofer (2000), os sorovares predominantes de linhagens de *L. monocytogenes* isoladas de diferentes fontes no Brasil, entre 1971 e 1997, foram usualmente limitados ao 4b, ½a e ½b e, menos frequentemente, 4a, ½c e 4ab. Esse autor demonstrou que a caracterização antigênica representada por 13 sorotipos tem limitações para análise epidemiológica, devido à prevalência de um número discreto de sorovares na maioria das fontes de isolamento. Isso naturalmente não invalida o processo de investigação epidemiológica, uma vez que ele é fundamental para a determinação do perfil fenotípico. Da mesma forma, existem alguns obstáculos, como, por exemplo, a grande proporção de linhagens de *L. monocytogenes* não tipáveis do sorogrupo ½ (McLAUCHLIN, 1996; HOFER, 2000), independentemente da adição de novas preparações fágicas ao esquema, como contraposição ao sucesso relativo da fagotipagem para o sorovar 4b (ESTELA; SOFOS, 1993, citado por HOFER, 2000). Esses problemas foram observados em uma parte das amostras investigadas por Hofer (2000), oriundas mais frequentemente de fontes humanas. Epidemiologicamente, ainda segundo Hofer (2000), a distribuição dos sorovares de *L. monocytogenes* no Brasil demonstra a prevalência do sorotipo 4b de origem humana e de alimentos, diferentemente dos

dados relatados por Nicolas et al., (1989), Farber e Peterkin (1991) e McLauchlin (1997a), que a prevalência é do sorotipo 1/2a em países da Europa.

## 2 MECANISMOS DE PATOGENICIDADE

No gênero *Listeria*, apenas as espécies *L. ivanovii* e *L. monocytogenes* são consideradas virulentas. Embora haja relatos de infecções humanas por *L. ivanovii* e *L. seeligeri* (LOESSNER et al., 1997; POYART et al., 1996), somente determinadas linhagens de *L. monocytogenes* conseguem vencer os mecanismos de defesa do trato gastroentérico, sobreviver aos ataques do sistema imune, aderir às células epiteliais e multiplicar/difundir para enterócitos, hepatócitos, células endoteliais e dendríticas, alcançando a submucosa intestinal, fígado, baço, cérebro e placenta (BREHM et al., 1996).

Como parasita intracelular facultativa, a bactéria controla a expressão gênica conforme o ambiente circundante. O crescimento no ambiente reduz a produção dos fatores de virulência, pelo fato de estes não serem necessários à sobrevivência; todavia, se introduzidos na intimidade do hospedeiro suscetível, ocorre rápida expressão dos genes de virulência. O domínio sobre o mecanismo de ação desses fatores fornece subsídios úteis para as medidas preventivas e terapêuticas e, particularmente, para o desenvolvimento de métodos mais adequados de detecção (KUHN, GOEBEL, 1995).

Os fatores de virulência de *L. monocytogenes* constituídos de aderência, invasão, sobrevivência intracelular, multiplicação e disseminação celular estão bem caracterizados. Oito genes envolvidos no processo infeccioso, já identificados, associam-se à: (i) aderência e internalização dos microrganismos às células epiteliais e macrófagos: internalina A (inlA), proteína p60, proteínas relacionadas à internalina (Irp) e um antígeno V não identificado; (ii) sobrevivência intracelular: listeriolisina O (hly), hemolisina responsável pela lise do vacúolo fagocítico primário, uma proteína formadora de porina, conhecida como fosfatidil-inositol-fosfolipase C (plcA), envolvida na lise da membrana do vacúolo fago lisossomal; (iii) multiplicação intracelular e disseminação para outros macrófagos e órgãos tissulares: Act A, necessária para a polimerização da actina, e a lecitinase, uma fosfatidil colina

fosfolipase C (PC-PLC), produto do gen *plcB* (BHUNIA, 1997; GRENNINGLOH et al., 1997).

A expressão dos genes de virulência está sujeita a um controle complexo e é frequentemente coordenada por fatores ambientais, com destaque para a temperatura e determinados nutrientes, a fim de assegurar o seu desligamento transcricional durante a sobrevivência no meio ambiente; por outro lado, a mesma é acionada se a bactéria encontra um hospedeiro suscetível (LEIMEISTER-WACHTER et al., 1992). Foram elucidados os mecanismos da infecção por *L. monocytogenes*, baseados em modelos de infecção *in vivo* em camundongos e em cultura de tecidos, bem como em técnicas moleculares e genéticas modernas, desvendando um dos mais intrincados mecanismos moleculares de parasitismo intracelular (DANCZ et al., 2002). Esse conhecimento é fundamental no desenvolvimento de métodos mais precisos para detecção de linhagens patogênicas de *L. monocytogenes*, baseados nos fatores genéticos envolvidos na transcrição e expressão da virulência (ALMEIDA; ALMEIDA, 2003).

Pearson e Marth (1980) sugeriram que *L. monocytogenes* pode infectar o homem e outros animais pelas seguintes vias: oral, ocular, cutânea, respiratória ou urogenital. O trato intestinal é o local de entrada para *L. monocytogenes* no organismo através das células epiteliais no ápice das microvilosidades, aderindo e invadindo a mucosa. Então se difunde, não só pelo interior da célula, como também de uma célula para outra. Em seguida, a célula bacteriana é fagocitada por macrófagos e, após a lise da membrana fagocítica, liberada no citoplasma da célula do hospedeiro, onde se multiplica rapidamente (LOVETT; TWEDT, 1988; FRANCO; LANDGRAF, 1996; GERMANO; GERMANO, 2001). As células de *Listeria monocytogenes*, uma vez dentro dos macrófagos, encontram-se protegidas dos leucócitos polimorfos nucleares (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Kayal et al. (1999) descobriram que a listeriosina O secretada por *L. monocytogenes* é um potente estimulador inflamatório, induzindo as células endoteliais durante o processo infeccioso. A listeriosina O é considerada um dos fatores de virulência das espécies de *Listeria*, liberando a célula bacteriana do macrófago e desencadeando a lise da membrana fagocítica dessas células, ou seja, uma vez dentro da célula do hospedeiro, a bactéria pode ter acesso ao citoplasma, devido à ação do poro formado por esta citolisina, chamada de Listeriosina O (GREIFFENBERG et al., 1997; SAMPATHKUMAR et al., 1999).

Segundo Pandiripally et al. (1999), o aspecto-chave para patogenicidade de *L. monocytogenes* é sua habilidade de invadir e multiplicar-se em fagócitos e não-fagócitos. Presume-se que a adesão da bactéria seja mediada por moléculas na superfície da célula com receptores complementares presentes na célula eucariótica.

### 3 LISTERIOSE

*L. monocytogenes* é o agente da listeriose, uma infecção alimentar atípica, definida também como uma zoonose, podendo acarretar um quadro clínico severo, com alta taxa de letalidade, período de incubação longo e predileção por pacientes que tenham condições imunológicas deficitárias (ROCOURT; COSSART, 1997).

A doença passou a receber atenção significativa a partir dos episódios ocorridos nos EUA entre 1981 e 1985. Pode ser transmitida por três vias principais: contato com animais infectados, infecção cruzada (contaminação cruzada), preferencialmente entre recém-nascidos em hospitais e infecções transmitidas por meio da ingestão de alimentos contaminados (BELL; KYRIADES, 1998).

É uma doença esporádica observada durante todo o ano, com pico de ocorrência nos meses mais quentes. Epidemias focais têm sido associadas ao consumo de leite, queijo, carne inadequadamente cozida, vegetais crus não lavados e repolhos contaminados (MURRAY et al., 2000). 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 e 50% (CORRÊA; CORRÊA, 1992). A taxa da ocorrência da doença é baixa, porém é uma enfermidade importante devido à sua alta letalidade (ACHA; SZYERES, 2001).

De acordo com Jay (2005), das espécies de *Listeria*, a *L. monocytogenes* é o patógeno de importância para os humanos. É um microrganismo de distribuição ubiqüitária, encontrando-se vastamente disseminado na natureza e em diversos tipos de alimentos, quer seja "*in natura*" ou processados (PEREIRA; ROCOURT, 1993; LOGUERCIO et al., 2001). Segundo Todar (2003), a *L. ivanovii* também é considerada patogênica, porém causadora da doença apenas em animais, sobretudo em ovinos. *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. seeligeri* não são patogênicas, embora a última produza hemólise.

A infecção pelo microrganismo foi comprovada em grande número de mamíferos domésticos e silvestres, em aves e, inclusive, em animais poiquilotermos. As espécies domésticas mais suscetíveis, em ordem decrescente de importância, são: ovina, caprina e bovina (ACHA; SZYERES, 2001).

O microrganismo se caracteriza por ser patogênico para indivíduos com algum comprometimento do sistema imunológico, como idosos, neonatos, pacientes com HIV, que podem apresentar infecção do sistema nervoso central (SNC), bacteremia e endocardite. No caso de mulheres grávidas, pode também ocorrer aborto, parto pré-maturo e septicemia neonatal (MARCO et al., 2000; MARTÍN et al., 2004). Em geral, a listeriose causa sintomas típicos de gripe. Em recém-natos e idosos, pode desenvolver meningite e septicemia, levando a óbito (KLIMA; MONTVILLE, 1995).

A listeriose humana é comumente caracterizada pela formação de granulomas miliares e necrose focal ou por supuração no tecido infectado (LOGUERCIO et al., 2001). Na ausência de tratamento médico a morte ocorre, sendo usualmente resultado, como mencionado anteriormente, de meningites (DEDIOL et al., 2002).

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). 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. Contudo, a transmissão por alimentos parece ser a forma mais importante (MARTH, 1988; SILVA, 1996).

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. Isso 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, 1989; FARBER; PETERKIN, 1991; FRANCO; LANDGRAF, 1996; LOVETT; TWEDT, 1988; MARTH, 1988).

Como já mencionado, a infecção ocorre em qualquer faixa etária; no caso de crianças e pessoas idosas, a mortalidade é bastante alta – em média, 70% (CASTRO, 1989). Schlech (1996) afirmou que 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.

O aborto por listeriose na mulher somente ocorre na segunda metade da gravidez, com maior frequência no terceiro trimestre. Os sintomas que precedem em alguns dias ou semanas o aborto ou o parto podem consistir de calafrios, aumento da temperatura corporal, ligeira irritação e, às vezes, sintomas gastrintestinais (ACHA; SZYERES, 2001).

Nos casos de comprometimento do sistema nervoso central, a manifestação se dá através do aparecimento de meningite, encefalite e abscessos. Entre outras formas localizadas de listeriose, podem ser citadas a endocardite e osteomielite, porém são mais raras (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

A importância desse patógeno está mais associada à mortalidade causada por sua infecção do que à morbidade. Slutsker e Schuchat (1999) comentaram que, diferentemente de outras doenças causadas por alimentos, como a salmonelose, que raramente é fatal, a taxa de letalidade da listeriose é alta: cerca de 20%. Altekruze et al. (1997) citaram que taxas de letalidade acima de 40% foram relatadas em casos de surtos de listeriose humana.

A dose mínima de infecção ainda não foi estabelecida, mas informações sobre a população de *L. monocytogenes* em alimentos contaminados envolvidos em surtos indicam que populações entre  $10^3$  e  $10^4$  Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/g de alimento foram responsáveis pelo desencadeamento da doença (DUFFY et al., 1999). Entretanto, estudo realizado na Finlândia indica que a exposição da população de risco a doses baixas [0,3 Número Mais Provável (NMP)/g] de *L. monocytogenes*, por períodos prolongados, pode também levar ao desenvolvimento da doença (MAIJALA et al., 2001).

Segundo a *Food and Agriculture Organization* - FAO, a partir da análise de alimentos envolvidos em surtos e casos esporádicos de listeriose, encontraram-se tanto contagens elevadas (acima de  $10^3$  UFC/g), quanto contagens baixas (inferiores a  $10^2$  UFC/g). Partindo desses achados, pode-se dizer que quantidades de bactérias iguais ou maiores que  $10^2$  UFC/g poderiam causar quadro de infecção alimentar

(FAO, 1999). A dose infectante dos patógenos de origem alimentar está relacionada, entre outros fatores, à suscetibilidade do hospedeiro, ao nível de contaminação do alimento pelo patógeno, à quantidade ingerida de alimento e à virulência das cepas (FAO, 1999).

Segundo Deseo (1999), a contaminação de alimentos com níveis acima de  $10^3$  UFC/g é considerada alta para *Listeria monocytogenes*. Experimentos feitos com animais saudáveis indicaram que a ingestão de quantidades de *L. monocytogenes* entre  $10^3$  e  $10^6$  UFC seria suficiente para causar danos à saúde (MADDEN, 1992).

A sobrevivência e multiplicação de *L. monocytogenes* em produtos *in natura* são afetadas por diferentes fatores, como idade e tipo de produto, nível de contaminação, temperaturas de armazenamento e atmosfera (BENNIK et al., 1996). O microrganismo apresenta alta capacidade de colonização de superfícies e de formação de biofilmes, podendo estabelecer-se dentro de plantas de processamento de alimentos, aumentando dessa forma a probabilidade de contaminações cruzadas e ambientais (SILVA et al., 2004).

Provavelmente, os hábitos alimentares contemporâneos contribuíram para aumentar a listeriose, já que a sua natureza psicrófila permite o crescimento durante o armazenamento e a distribuição sob refrigeração (DOYLE, 1988). Além disso, as condições sanitárias deficientes durante o abate dos animais, o cozimento inadequado, o armazenamento impróprio e a falta de higiene durante o preparo dos produtos cárneos são fatores que podem predispor os indivíduos a enfermidades transmitidas por alimentos ou a tornarem-se portadores assintomáticos (KASNOWSKI, 2004).

Em decorrência disso, a presença de listeriose em humanos e animais culmina em condições que contribuem para diminuição da produção e da oferta de bens e serviços de uma população e, muitas vezes, significa uma barreira para as exportações, influenciando significativamente na economia do país (KASNOWSKI, 2004).

Nesse contexto, essas enfermidades se constituem atualmente em uma grande preocupação para as indústrias alimentícias e órgãos oficiais de regulamentação em termos de segurança dos alimentos (KASNOWSKI, 2004).

#### 4 PRINCIPAIS SURTOS

O meio científico foi despertado para os perigos da listeriose nos anos 80, quando uma série de surtos ocorreu na América do Norte e Europa, em alguns dos quais mais de 100 pessoas foram afetadas. Esses surtos foram associados a alimentos e, desde então, estes têm sido considerados pelos pesquisadores como fonte primária da infecção por esse microrganismo (SILVA; TIBANA, 1995).

Em 1979 ocorreu o primeiro surto de listeriose humana veiculado por alimentos. Aconteceu em oito hospitais de Boston, EUA, onde 23 pacientes imunossuprimidos foram acometidos pela *Listeria*, tendo sido isolada, *L. monocytogenes* do sorotipo 4b em 87% dos casos. As investigações realizadas na ocasião sugeriram a possibilidade de que alguns pratos, como salada de frango, atum e queijo, servidos com vegetais crus (aipó e alface) tenham sido o veículo da transmissão (HO et al., 1986).

Entretanto, o primeiro surto que realmente despertou os microbiologistas de alimentos para o problema ocorreu em 1981, nas províncias marítimas do Canadá, onde foram constatados 41 casos de listeriose, sendo 34 perinatais e sete adultos. O provável veículo de transmissão foi a salada de repolho cru (“cole slaw”). A hortaliça foi cultivada em campos fertilizados com fezes de ovinos, que estavam contaminadas por *L. monocytogenes*, e posteriormente submetida à conservação sob refrigeração (UBOLDI EIROA, 1990; PEREIRA; ROCOURT, 1993; NASCIMENTO; CULLOR, 1994; FRANCO; LANDGRAF, 1996; LOGUERCIO et al., 2001).

No verão de 1983 ocorreu um novo surto de listeriose associado a *L. monocytogenes* sorotipo 4b, em Massachussets, EUA, acometendo 42 adultos e sete crianças, com uma taxa de letalidade de 29% (14 pessoas), tendo sido identificado o leite pasteurizado, submetido a tratamento térmico inadequado, como a fonte provável da infecção. Esse leite era proveniente de um grupo de fazendas, onde alguns bovinos apresentavam a doença (FLEMING et al., 1985).

Nos meses de janeiro a agosto de 1985, na Califórnia, EUA, um surto de listeriose aumentou a preocupação entre os fabricantes de alimentos (indústrias) e as agências reguladoras responsáveis. Foram notificados 305 casos, com 105 mortes e o veículo da infecção apontado foi o queijo macio tipo Mexicano, sendo o sorotipo relacionado o 4b. As investigações realizadas revelaram que a

contaminação ocorreu provavelmente pela utilização de 11% a mais de leite do que a capacidade do pasteurizador. A fábrica foi fechada e o queijo retirado do mercado (LINNAN et al., 1988). Nesse mesmo ano, em Los Angeles, EUA, 94 casos de listeriose foram confirmados, dos quais 37 eram neonatos e suas mães. A taxa de letalidade foi de 31% e os alimentos suspeitos foram o queijo tipo Mexicano, sorvete e iogurte (MASCOLA et al., 1989).

Na parte ocidental da Suíça também foram registrados surtos envolvendo o microrganismo, no período de 1983 a 1987. Esses surtos resultaram em 122 casos de listeriose, que levaram a 34 óbitos. Uma investigação minuciosa desse surto o associou ao consumo de queijo tipo "Vacheun Mont d'Or", considerando que o microrganismo foi isolado da superfície do referido queijo (BILLE, 1990).

A carne de frango, presente em salada refrigerada, foi implicada em um caso de listeriose em 1988, acometendo uma gestante que sofreu aborto de um feto de 23 semanas. Foi isolado o sorogrupo 4b da carne do frango, do sangue do feto e do sangue materno (KERR, 1988).

No período de 1987 a 1989, no Reino Unido, ocorreu elevado aumento na incidência de listeriose, subindo de aproximadamente 100 casos por ano para um pico próximo a 300 casos em 1989 (McLAUCHLIN, 1991). Nesse período, foi descrita uma contaminação relacionada à ingestão de um patê preparado a partir de emulsão de carnes, óleo, algumas especiarias e outros ingredientes, sendo *L. monocytogenes* sorotipo 4b isolada das amostras do produto (McLAUCHLIN, 1993).

Na França, nos meses de março e dezembro de 1992, ocorreu um surto envolvendo língua de suíno cozida em molho, a qual deu origem também a uma contaminação cruzada em produtos de "delicatessen". Foram relatados 279 casos, com 63 mortes e 22 abortos (GOULET et al., 1995). Nesse mesmo ano foi relatado outro surto, tendo como veículo mexilhões comercializados na cidade de Nova Zelândia. Os sorotipos isolados foram 1/2a e 4b (BACKER et al., 1993).

Já em 1995, nos EUA, um caso de listeriose foi relacionado ao consumo de leite achocolatado, acometendo 45 pessoas com sintomas de gastroenterites; a maioria apresentou diarreia (79%) e febre (72%) aproximadamente 20 horas após a ingestão do produto. Esse surto resultou na hospitalização de quatro pessoas (DALTON et al., 1997).

Além dos surtos epidêmicos em que houve a comprovação do agente etiológico no alimento, ou em que a sua associação foi apenas epidemiologicamente estabelecida, diversos casos esporádicos de listeriose de origem alimentar são relatados na literatura (NUNES, 1994).

Em 1988, ocorreu em Londres, Inglaterra, um caso esporádico, em que uma mulher de 40 anos, não gestante, ingeriu queijo tipo frescal da marca "Anary" contaminado, produzido a partir de leite de cabras (AZADIAN et al., 1989). Alguns outros casos esporádicos foram associados a "nuggets" de frango, em que mãe e filho, após consumirem o alimento, apresentaram a doença de forma moderada e breve, sendo isolado em ambos o sorotipo 1/2a (KACZMARSKI; JONES, 1989).

Outros alimentos também têm sido incriminados em casos esporádicos, como salsichas de peru aquecidas em forno micro-ondas por 45 segundos em temperatura elevada e frango cozido insuficientemente (SCHWARTZ et al., 1989).

Svabic-Vlahovic et al. (1988) descreveram um caso em que o veículo identificado foi o leite materno dado a três filhotes de cães da raça Doberman, que desenvolveram a doença, sendo acometidos de vômitos e diarreia sanguinolenta.

No período de junho de 1998 a abril de 1999, foi relatado um surto implicando *L. monocytogenes* sorotipo 3a em manteigas comercializadas na Finlândia. A maioria dos casos estava relacionada a indivíduos imunossuprimidos, hospitalizados na "Helsinki University Central Hospital" (HUCH). A manteiga contaminada também foi vendida para dez outros hospitais centrais e para o comércio varejista da região (MAIJALA et al., 2001).

No ano de 2000, foi relatado um novo surto causado pelo microrganismo implicando língua de porco defumada, processada em uma indústria em Paris, França, ocasionando sete mortes. De acordo com as investigações, outros alimentos, como o presunto, também estavam contaminados com *L. monocytogenes*, em razão provavelmente de a faca usada para fatiá-lo ter entrado em contato com a língua de porco defumada (DOROZYNSKI, 2000).

Já em 2001, na Carolina do Norte, EUA, ocorreu um surto de listeriose associado ao consumo de queijo macio tipo Mexicano. Vários órgãos oficiais do Estado, com a colaboração da "Food and Drug Administration" (FDA) e do "Center for Disease Control" (CDC), investigaram esse surto. Essa investigação levou à conclusão de que o queijo havia sido produzido em casa com leite cru contaminado, oriundo de uma fazenda local. Os casos foram definidos pelo isolamento de *L.*

*monocytogenes* (isolada de um local normalmente estéril) na mãe de uma criança prematura (menos de 37 semanas de gestação) e na mãe com uma doença febril. Todos os 12 pacientes eram hispânicos, 11 mulheres tinham idade de 21 anos (média 18-28 anos) e havia um homem imunossuprimido de 70 anos. Dez mulheres estavam grávidas e a infecção resultou em cinco abortos, três nascimentos prematuros e dois recém-nascidos infectados (BOGGS et al., 2001).

Mead et al. (2006) relataram a ocorrência de um surto envolvendo *L. monocytogenes* em produtos cárneos processados, que atingiu 108 pessoas nos EUA, resultando em 14 mortes.

A maioria dos casos diagnosticados concentra-se na Europa e nos Estados Unidos. Recentemente, o número de casos informados vem aumentando, provavelmente devido a um melhor diagnóstico laboratorial, juntamente com um aumento da população suscetível, alta prevalência da bactéria no ambiente e hábitos de manuseio, preparo e armazenamento inadequados dos alimentos (CRESPO et al., 2003 citados por KASNOWSKI, 2004).

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

Considerando a sua ampla distribuição no ambiente e a sua presença no trato intestinal de vários animais, esse patógeno pode contaminar o leite e derivados, carnes, aves e vegetais (GILBERT, 1994). Essa constatação fez com que as indústrias alimentícias, as autoridades de saúde pública e pesquisadores em vários países redobrassem a atenção quanto à presença de *Listeria monocytogenes* (LOGUERCIO et al., 2001).

## **5 OCORRÊNCIA DE *L. monocytogenes* EM ALIMENTOS**

O risco de listeriose aumenta na proporção direta da produção crescente de alimentos frescos e processados, prontos para consumo, e que são usualmente conservados à temperatura de refrigeração (ALMEIDA et al., 1999).

A ingestão de alimentos contaminados com *Listeria* spp. é particularmente perigosa para gestantes, recém-nascidos, indivíduos com síndrome de imunodeficiência adquirida, carcinomas e outras doenças e medicamentos que

provoquem comprometimento do sistema imunológico (HOBBS; ROBERTS, 1992). Devido à ocorrência de muitos surtos de listeriose de origem alimentar na América do Norte e em países da Europa, inclusive com casos fatais, observa-se aumento do interesse na investigação da presença ou ausência de *Listeria monocytogenes* em alimentos.

Em uma grande proporção de alimentos são comumente encontrados pequenos números de *L. monocytogenes*, porém muitas especificações microbiológicas estipulam a ausência de *L. monocytogenes* em 25 g de alimento (HARRIGAN, 1998; BRASIL, 2001b). O primeiro caso de listeriose humana foi denunciado em 1929, e desde então se tem comprovado que essa enfermidade ocorre esporadicamente em todo o mundo.

*L. monocytogenes* é o agente etiológico de aproximadamente 98% dos casos observados em pessoas e 85% dos que ocorrem em animais (JAY, 2005). Os estudos e procedimentos para isolamento e enumeração de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* em alimentos têm aumentado muito nos últimos anos.

A presença de *Listeria* spp. em ambientes de processamento de alimentos ocorre devido à sobrevivência em aerossol ou em células que aderem às superfícies de contato. Desse modo, proliferando em microcolônias, formando-se um biofilme, pela inadequada limpeza e higienização (SASAHARA; ZOTTOLA, 1993). As mudanças nas características e nos hábitos alimentares, a forma em que os alimentos são produzidos, a habilidade da *Listeria* de sobreviver em condições adversas, sua capacidade de crescer em temperatura de refrigeração, aliada 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, representando, atualmente um grande problema para as indústrias de alimentos e órgãos oficiais de regulamentação (DONNELLY et al., 1992; FARBER; PETERKIN, 1991).

Vários autores têm empreendido esforços para investigar a frequência ou ocorrência de *Listeria* em alimentos. Particularmente para carnes e produtos cárneos, verificam-se altas taxas de isolamento do microrganismo. No estudo realizado por Yucel et al. (2005), 146 amostras de carne bovina inteira e moída e carne de frango, cruas e cozidas, foram analisadas em relação à presença de *Listeria* spp. Destas, 79 amostras (54,1%) apresentaram-se contaminadas por *Listeria* spp.; a maior ocorrência de isolamento (86,4%) se deu na carne bovina

moída crua. *L. monocytogenes* foi isolada em nove das 79 amostras (6,16%), sendo *L. innocua* isolada em 68 delas (46,57%).

De um total de 400 amostras de carne moída analisadas – 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.

De 63 amostras de carcaças de frango analisadas em Portugal, todas se apresentavam contaminadas com *Listeria* spp., sendo 26 delas (41%) 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. e oito (26,7%) para *L. monocytogenes*.

Araújo et al. (2002) encontraram *Listeria* spp. em 80% das amostras de “blanquet” de peru fatiado e em 90% das amostras de presunto de peru fatiado comercializados na cidade de Niterói-RJ. Destas, 52 cepas foram identificadas como *L. monocytogenes*, sendo 51,9%, 34,6%, 7,7% e 5,8%, pertencentes aos sorotipos 4b, 1/2c, 1/2b e 1/2a, respectivamente.

No trabalho desenvolvido por Mena et al. (2004) em Portugal, vários tipos de produtos alimentícios foram analisados quanto à presença de *L. monocytogenes*. Das 1035 amostras (leite, carne, peixes crus e alimentos termicamente processados e fermentados), 72 (7,0%) foram positivas para *L. monocytogenes*. Das 17 amostras de carne bovina crua, três (17,7%) foram positivas para *L. monocytogenes*. A carne de frango crua obteve maior número de amostras positivas (60%), comparada com os alimentos analisados.

Kasnowski (2004) isolou um total de 173 cepas de *Listeria* spp. de amostras de carne bovina (alcatra), das quais, 72 (41,62%) foram originadas da carne inteira e 101 (58,38%) da carne moída. A espécie mais isolada foi *Listeria innocua* 6a, totalizando 91 cepas, seguida de *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 estudo conduzido por Samadpour et al. (2006), de um total de 512 amostras de carne moída analisadas através da “Polymerase Chain Reaction” (PCR) seguida pela confirmação da cultura, 18 (3,5%) foram positivas para *L. monocytogenes*.

Vitas et al. (2004) investigaram a presença de *Listeria* spp. em um total de 3.685 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%), seguida por amostras de carne moída bovina e suína (62,3%). Similarmente, a maior ocorrência de *L. monocytogenes* foi detectada também 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 4 (1,6%) com *L. seeligeri*.

Yucel et al. (2004) isolaram *L. monocytogenes* em 8,25% das amostras de três tipos de carne crua: carne moída, carne de frango e carne bovina. Das nove cepas de *L. monocytogenes* isoladas, 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.

Bohaychuk et al. (2006) avaliaram a prevalência de *E. coli* produtora de toxina de Shiga, *L. monocytogenes*, *Salmonella* e *Campylobacter* spp. em amostras de produtos crus e prontos para o consumo, à base de carne e carne de frango, coletadas no mercado Edmonton, Canadá. Esses autores relataram que *L. monocytogenes* foi encontrada em 52% das amostras de carne moída crua, em 34% das de coxas de frango cruas, em 24% das de carne de porco crua, em 4% das de linguiças fermentadas e em 3% das de peito de peru.

Na região Nordeste do Brasil foram analisadas 127 amostras de queijo tipo coalho, produzidos e comercializados no Estado de Pernambuco, das quais 9,5% foram positivas para *Listeria* spp. e 5,5% positivas para *Listeria monocytogenes* (DUARTE et al., 2005). No Estado do Ceará, foram analisadas 70 amostras de queijo artesanal tipo coalho coletadas em mercados da cidade de Fortaleza. Os resultados mostraram uma incidência de 12 (17,1%) amostras contaminadas por *Listeria* spp. sendo duas positivas para *L. monocytogenes* (SOUSA et al., 2006). Ainda na cidade de Fortaleza, outro estudo analisou 84 amostras de queijo de

coalho industrializado: 16 (19%) estavam contaminadas com *Listeria monocytogenes*, cinco (5,9%) com *Listeria innocua* e uma (1,2%) com *Listeria grayi* (BRANCO et al., 2003). Na cidade de Salvador, Bahia, de 17 amostras analisadas desse mesmo produto, a presença de *L. monocytogenes* foi evidenciada em apenas uma delas (LEITE et al., 2002).

### 5.1 Ocorrência de *L. monocytogenes* em embutidos cárneos

Segundo Benkerroum et al. (2005), *L. monocytogenes* continua comprometendo a segurança dos alimentos, principalmente de alimentos prontos para o consumo. Esse microrganismo é frequentemente encontrado em carnes e produtos cárneos e, embora se apresente, geralmente, em baixas contagens em carnes frescas, à medida que aumenta seu grau de processamento, o risco de contaminação também é aumentado (CASTELLANO et al., 2004; JAY, 1996). Por esse motivo, diversos derivados cárneos têm sido envolvidos tanto em surtos de listeriose quanto em casos esporádicos da enfermidade (FARBER; PETERKIN, 1991; ROCOURT; COSSART, 1997).

*L. monocytogenes* apresenta alta resistência a ambientes desfavoráveis, fato que constitui um problema para sua eliminação na indústria alimentícia, sendo comum a presença do patógeno no ambiente industrial (CASTELLANO et al., 2004). Em plantas processadoras de produtos cárneos, *L. monocytogenes* pode estar presente em diversos locais, incluindo as salas de corte, e eventualmente contaminar os produtos após tratamento térmico, como a pasteurização (ABEE et al., 1995).

Nos animais, esse microrganismo pode ser encontrado nas fezes, sem que haja manifestação de sintomatologia (JAY, 1996; MARTÍN et al., 2004; BENKERROUM et al., 2005). Estudos realizados no Brasil demonstram que a presença de *L. monocytogenes* em produtos cárneos é frequente. Destro et al. (1991) relataram uma incidência de 32% desse microrganismo em diferentes alimentos, como carne, linguiça, salsicha, leite *in natura* e queijo tipo “minas frescal”, sendo que 80% das amostras de linguiças foram positivas para o microrganismo.

Os alimentos de origem animal, particularmente os que passam por apreciável manuseio, como, por exemplo, os produtos cárneos que sofrem processo de moagem, apresentam condições propícias para instalação, sobrevivência e

multiplicação de grande número de microrganismos (MOTTA et al., 2000). Linguiças mistas do tipo frescal são produtos de origem animal que apresentam alta atividade de água e, por serem intensamente manipulados e não submetidos a tratamento térmico, podem conter microrganismos patogênicos. Esses produtos, que têm grande aceitação de consumo, principalmente no Sul do Brasil, têm sido relacionados com surtos de toxinfecções alimentares (SILVA et al., 2004).

Silva et al. (2004) estudaram a presença de *L. monocytogenes* em plantas de processamento de linguiças mistas do tipo frescal na região de Pelotas, RS. *Listeria* spp. foi observada em 100% das amostras analisadas, e 29,3% destas foram identificadas como *L. monocytogenes*. Esses resultados são preocupantes, porque 16,6% das amostras positivas para o patógeno correspondiam ao produto final.

Lima et al. (2003) verificaram a ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos por meio da análise de 106 amostras de cinco tipos diferentes de linguiças (de carne suína, de carne de frango, tipo calabresa, mista e tipo toscana). A presença de *Listeria* spp. foi evidenciada em 62 amostras (58,5%) e a de *L. monocytogenes* em 11 (10,4%). A maior ocorrência de *L. monocytogenes* foi observada em linguissa de carne de frango (18,2%).

A elevada resistência fisiológica de *L. monocytogenes*, torna difícil o controle ou prevenção da contaminação em alimentos, sobretudo naqueles que não sofrem tratamento térmico durante o processamento. Sua capacidade de colonização, multiplicação e formação de biofilmes nos equipamentos de plantas processadoras de alimentos torna esse microrganismo uma ameaça à indústria (RØRVIK et al., 2003). Assim, cuidados especiais, como adoção de boas práticas de higiene durante as etapas de produção de alimentos, associadas às técnicas de preservação do produto final, tornam-se imprescindíveis (FENLON, 1999; BERSOT et al., 2001; DEVLIEGHIERE et al., 2004).

## **6      LEGISLAÇÃO E *Listeria monocytogenes***

A legislação sobre alimentos surgiu em muitos países para prevenir a venda de produtos fraudulentos, preocupando-se inicialmente com os defeitos de composição e peso. Atualmente, tem se estendido para outros aspectos da saúde pública, como os que se referem à transmissão das bactérias patogênicas através de alimentos, no intuito de garantir a segurança e a qualidade destes. O “Codex

Alimentarius” da “Food Agricultural Organization” (FAO) é tido como ponto de referência para os consumidores, produtores e processadores de alimentos, para agências nacionais de controle de alimentos, bem como para o comércio internacional de produtos alimentícios (GERMANO et al., 2000).

Os países apresentam condutas diferentes no tocante aos limites toleráveis de *Listeria monocytogenes* por grama de alimento. Nos Estados Unidos, estabeleceu-se a chamada "Tolerância Zero", em que não é permitida a presença do patógeno em 25 gramas de qualquer tipo de alimento (SHANK et al., 1996). A Alemanha tem sido mais tolerante, permitindo um máximo de 100 UFC/g para alguns tipos de alimento (SILVA; TIBANA, 1995).

No Brasil, a RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001, da ANVISA/MS, determina a ausência de *Listeria monocytogenes* em 25 g em vários tipos de queijo (BRASIL, 2001b), porém, para linguiças do tipo frescal, ainda não há exigência legal quanto à presença do referido patógeno.

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, pode ser considerado aceitável para indivíduos que não estão sob risco.

## **7 MÉTODOS DE DETECÇÃO DO MICRORGANISMO EM ALIMENTOS**

Em razão da resistência às condições ambientais desfavoráveis e da severidade das infecções causadas, *L. monocytogenes* é considerada um dos patógenos de infecção de origem alimentar mais temido na atualidade (ALMEIDA; ALMEIDA, 2003).

Os métodos de detecção de *Listeria* spp. em alimentos utilizam principalmente a sua capacidade de crescer em baixas temperaturas e a resistência a vários antibióticos como características seletivas de isolamento. A técnica de enriquecimento a frio em meios não-seletivos ainda é considerada a mais segura para o sucesso das análises; contudo, em razão do longo tempo de refrigeração requerido, tem sido substituída pelo enriquecimento em meios seletivos. Esses meios geralmente são caldos nutritivos suplementados com vários agentes

antimicrobianos, sendo mais utilizados o ácido nalidíxico, a acriflavina e a cicloeximida (SILVA et al., 2007).

Segundo Pereira e Rocourt (1993), desde 1960 os métodos para a pesquisa de *L. monocytogenes* em alimentos e outros substratos vêm utilizando agentes seletivos para inibição da microbiota acompanhante, em especial *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* e *Lactobacillus*, havendo variações diversas no tocante às suas dosagens e associações. Algumas substâncias são recomendadas para o isolamento de *Listeria* spp. em culturas mistas, como telurito de potássio, fenil etanol, cloreto de lítio, tiocianato de potássio e guanofuracin. O ácido nalidíxico e o acetato de tálio são utilizados como fungicida e contra microrganismos Gram-negativos, incluindo *Proteus*. Por outro lado, o moxalactam possui largo espectro de ação contra microrganismos Gram-positivos e negativos, incluindo *S. aureus*, *Proteus* e *Pseudomonas*. A tripaflavina e ácido nalidíxico possuem a mesma faixa de atuação. A combinação de acriflavina e ceftazidima parece inibir totalmente o crescimento de *S. epidermidis*, *E. coli* e *E. faecalis*, não afetando o desenvolvimento de *L. monocytogenes* e *L. innocua* e inibindo levemente o crescimento de *L. seeligeri*.

Um grande número de métodos de detecção de *Listeria* spp. em alimentos tem sido desenvolvido nos últimos anos, sendo mais amplamente difundidos e utilizados o método do “Bacteriological Analytical Manual” (BAM) da “United States Food and Drug Administration” (FDA) (HITCHINS, 2003), usualmente aplicado na análise de leite e produtos lácteos, e o método do “Microbiology Laboratory Guidebook” (MLG) do “United States Department of Agriculture” (USDA/FSIS, 2005), usualmente aplicado na análise de carne, produtos cárneos e esfregaços de superfície.

No método da FDA é utilizado o Caldo de Enriquecimento para *Listeria* (LEB) a 30 °C/24 e 48h, acompanhado da semeadura na superfície do ágar Oxford (OXA) a 35 °C/24 e 48h e ágar Cloreto de Feniletanol Moxalactam (LPM) a 35 °C/24 e 48h. O método da USDA utiliza enriquecimento primário em Caldo Universidade de Vermont (UVM) a 30 °C/24h, enriquecimento secundário em Caldo Fraser a 35 °C/24 e 48h e semeadura de superfície no ágar Oxford Modificado (MOX) a 35 °C/24 e 48h (SILVA et al., 2007).

Além dos métodos da FDA e USDA, sobressai também o método do “Health Protection Branch” (HPB) do Canadá, utilizado para todos os tipos de alimentos e

amostras ambientais. Ele é baseado no enriquecimento primário em caldo LEB a 30 °C/24h, no enriquecimento secundário em Caldo Fraser a 35 °C/24 e 48h e na semeadura de superfície no ágar Oxford (OXA) a 35 °C/24 e 48h, ágar Cloreto de Feniletanol Moxalactam (LPM) a 35 °C/24 e 48h, ágar Oxford Modificado (MOX) a 35 °C/24 e 48h e ágar Palcam (PAL) a 35 °C/24 e 48h (WARBURTON et al., 1991).

Uma variedade significativa de métodos bacteriológicos clássicos, incluindo meios e condições distintas, vem sendo reportada para recuperação de *Listeria* spp. em alimentos, demonstrando uma tendência de que a metodologia ideal pode, ainda, estar por ser descrita (SILVA, 2001).

Tendo em vista as dificuldades e morosidade encontradas para o isolamento de *L. monocytogenes* por semeadura em meio sólido em placa, diversos autores têm trabalhado no desenvolvimento de técnicas mais rápidas e precisas, que envolvem sempre uma ou mais etapas de enriquecimento e meios de cultura seletivos (DENDER, 1988).

Uma série de métodos alternativos para detecção rápida de células de *Listeria* tem sido desenvolvida, os quais são baseados na hibridização de ácidos nucleicos (EMOND et al., 1993), amplificação de ácidos nucleicos (STARBUCK et al., 1992) ou uso de anticorpos específicos (RIJPENS et al., 1995). Entretanto, eles nem sempre são apropriados para uso na indústria de alimentos. Além disso, os testes baseados na análise de DNA podem detectar células mortas porventura presentes nos alimentos (ALMEIDA et al., 1999).

Como ainda não é conhecida a dose infectante de *L. monocytogenes* para o homem, o melhor método tem que detectar a presença de quantidade mínima desse patógeno nos alimentos. Também, a diferença de virulência observada entre as cepas de *L. monocytogenes*, inferida por estudos epidemiológicos e experimentais, implica que os métodos futuros de diagnóstico devem ser específicos para cepas patogênicas de *L. monocytogenes* (ALMEIDA, ALMEIDA, 2000).

Nos últimos anos, várias técnicas têm sido propostas e avaliadas para simplificar e melhorar a precisão dos resultados de identificação de microrganismos, patogênicos ou não. Os novos métodos podem ser classificados em três grandes grupos: técnicas bioquímicas miniaturizadas, técnicas imunológicas e técnicas genéticas (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

## 8 BACTERÍOFAGOS PARA CONTROLE DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM ALIMENTOS

Os bacteriófagos são componentes da microbiota natural da produção de alimentos, desde o campo até a comercialização do produto final. São estáveis nesses ambientes e prontamente recuperados do solo, efluentes, água, fezes e alimentos (GREER, 2005).

Os fagos possuem atributos que parecem ser atraentes para aqueles que buscam novos modos para controlar os patógenos de origem alimentar e microrganismos deterioradores. Têm um histórico de utilização segura, podem ser altamente específicos para o hospedeiro e replicar na presença deste. *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e outros microrganismos têm respondido ao controle com fago em alguns alimentos (HUDSON et al., 2005).

Os fagos podem ser considerados inimigos naturais das bactérias e são, portanto, candidatos lógicos à avaliação como agentes para controle de patógenos de origem alimentar, como a *Listeria* (CARLTON et al., 2005). Os atributos para os fagos incluem: (i) são designados para matar células-alvo viáveis de bactérias; (ii) não atravessam as fronteiras das espécies ou dos genes e, portanto, não afetarão (a) as bactérias desejáveis nos alimentos (por exemplo, culturas starter), (b) bactérias comensais do trato gastrointestinal ou (c) a microbiota bacteriana do ambiente; e (iii) como os fagos são geralmente compostos inteiramente de proteínas e ácidos nucleicos, seus produtos de decomposição consistem exclusivamente de aminoácidos e ácidos nucleicos. Assim, não são xenobióticos e, ao contrário de antibióticos e agentes antissépticos, sua introdução e distribuição dentro de um dado ambiente podem ser vistas como um processo natural (CARLTON et al., 2005).

Com relação ao seu potencial de aplicação para biocontrole de patógenos indesejáveis nos alimentos e nos ambientes relacionados, deve ser considerado que os fagos são as unidades mais abundantes de autorreplicação no ambiente e estão presentes em quantidade significativa na água e nos mais diversos tipos de alimentos, particularmente nos fermentados (SULAKVELIDZE; BARROW, 2005). Na carne *in natura* e processada e em produtos derivados da carne, encontram-se frequentemente mais do que  $10^8$  células viáveis de fago por grama (KENNEDY; BITTON, 1987). É um fato que os fagos são rotineiramente consumidos com o nosso alimento, em números significativos. Além do mais, também são organismos

comensais normais do homem e dos animais e são abundantes, especialmente no trato gastrintestinal (FURUSE, 1987; BREITBART et al., 2003).

Devido à sua especificidade inerente, os fagos abrigam potencial para uma escolha precisa, objetivando uma contaminação bacteriana, sem comprometer a viabilidade de outros microrganismos no *habitat*. Alguns estudos (GREER, 2005; HUDSON et al., 2005; SULAKVELIDZE; BARROW, 2005; WITHEY et al., 2004) resumiram o *status* atual do uso de fagos para o controle de bactérias indesejáveis, exceto em terapia de doenças em humanos e animais.

Em 1915, Frederick W. Twort, na Inglaterra, publicou uma nota em que descrevia a destruição infecciosa de colônias de micrococos por um agente que parecia ser viral porque atravessava os filtros que retinham bactérias. Estes eram inativados por aquecimento a 60 °C durante uma hora e não podiam proliferar de forma autônoma. Em 1917, Felix d'Herelle, no Instituto Pasteur, em Paris, foi quem descobriu esse fenômeno de maneira independente e demonstrou a natureza da partícula, ao qual denominou de bacteriófago, que significa “comedor de bactérias” (JOKLIK et al., 1994; PELCZAR et al., 1997). A partir dessas observações, o fenômeno foi denominado de *Twort-d'Herelle* (JOKLIK et al., 1994; PELCZAR et al., 1997).

O caráter viral do bacteriófago foi confirmado pelo trabalho de Burnet e de Schlsinger na década de 1930 (JOKLIK et al., 1994; PELCZAR et al., 1997). Os estudos sobre os bacteriófagos continuaram e, em 1943, Felix e Callow isolaram o bacteriófago virulento Felix 01 (FELIX; CALLOW, 1943).

Atterbury et al. (2003b) isolaram e caracterizaram 34 fagos de *Campylobacter* em porções de frango vendidas no varejo. A ubiquidade dos fagos em aves comerciais apoia a conclusão de que a sua utilização como agente de biocontrole não constituiria a introdução de um aditivo externo ao produto.

Fagos isolados a partir de fontes ambientais e o fago Felix 01, que possui ampla escala de hospedeiros, produziram uma redução de dois ciclos log na população de *Salmonella* Typhimurium DT104 inoculada em coxas de frango (KOSTRZYNSKA et al., 2002) e em linguiça de frangos (“frankfurters”) (WHICHARD et al., 2003).

Com notáveis exceções, a maioria dos dados obtidos em estudos laboratoriais, utilizando números de bactérias na faixa de 3 a 6 log UFC/g, reporta

eficácia do uso de fagos para controle de patógenos mesofílicos (GOODE et al., 2003).

Fagos foram encontrados reduzindo os números de *Salmonella* em queijo (MODI et al., 2001) e em frango (GOODE et al., 2003; KOSTRZYNSKA et al., 2002), na ausência de crescimento bacteriano. A redução por fagos de *Salmonella enteritidis* em fatias de melão foi independente da temperatura de armazenamento na faixa de 5 a 20 °C (LEVERENTZ et al., 2001).

Um exemplo ainda mais relevante foi encontrado nos estudos com *Campylobacter jejuni* (microrganismo termófilo; sem crescimento abaixo de 31 °C e crescimento ótimo a 42 °C). Na ausência de crescimento bacteriano ou replicação do fago, os fagos reduziram significativamente o número de *C. jejuni* em pele de frango contaminada experimentalmente e armazenada a 4 °C (ATTERBURY et al., 2003a).

Dykes e Moorhead (2002) analisaram o efeito antibacteriano combinado de nisina e listeriófago. A aplicação do fago LH7 sobre dois isolados de *L. monocytogenes* inoculados em carne embalada a vácuo e armazenada a 4 °C não teve qualquer efeito sobre o número de células bacterianas durante o experimento. No entanto, quando a nisina foi utilizada em associação com o fago, um decréscimo na contagem bacteriana foi constatado, o qual foi superior ao observado com uso apenas da nisina. A maior parte da redução da população bacteriana ocorreu imediatamente, e as contagens resultantes do uso de apenas nisina e nisina com o fago foram de pouco menos que uma unidade logarítmica no dia zero, em comparação com o controle e com as amostras em que apenas tinha sido usado o fago.

## **8.1 Considerações em uma estratégia de biocontrole com fago**

Uma vez que muitos alimentos são distribuídos sob refrigeração e a maioria dos agentes patogênicos de origem alimentar não se desenvolve nessas condições, é importante determinar se os fagos podem eliminar seus hospedeiros em alimentos refrigerados. Outras considerações da relação fago-hospedeiro incluem os efeitos da presença de organismos não-hospedeiros, a influência do pH e outras propriedades físico-químicas dos alimentos, a atividade em um substrato sólido ou biofilme, o

surgimento de bactérias mutantes resistentes e os números de fagos e hospedeiros necessários para permitir a replicação (HUDSON et al., 2005).

O biocontrole com fagos tem a vantagem exclusiva de se tratar de um reagente natural, que se auto multiplica e é altamente específico. Fagos são componentes integrantes da microbiota indígena residindo na maioria dos alimentos vendidos nos mercados; na presença de um número suficiente de hospedeiros suscetíveis, eles irão replicar e continuar a infectar bactérias (GREER, 2005). São facilmente isolados de alimentos, das suas etapas e ambiente de processamento, e suspensões altamente concentradas podem ser preparadas de modo simples e barato (GREER, 2005). Outra qualidade valiosa é a notável estabilidade dos fagos em alimentos (KENNEDY; BITTON, 1987). Bacteriófagos de *Campylobacter* podem sobreviver aos procedimentos de abate de aves (ATTERBURY et al., 2003b), uma característica necessária se os fagos são para manter a sua capacidade de controlar as bactérias durante a vida útil dos alimentos.

Estudos anteriores da aplicação do fago em animais não reportaram qualquer efeito adverso ou inesperado do vírus de bactérias em animais (BERCHIERI et al., 1991; BISWAS et al., 2002; CERVENY et al., 2002; CHIBANI-CHENNOUFI et al., 2004; MERRIL et al., 1996). Paralelamente a esses resultados, um estudo com voluntários humanos que receberam o fago T4 indicou que este é seguro para a administração oral; nenhum fago ou anticorpo específico do fago pôde ser detectado (BRUTTIN; BRÜSSOW, 2005). Concluindo, não há razão para assumir que o consumo de fagos com os alimentos tenha algum efeito negativo ao homem.

Apesar dessas vantagens excepcionais, alguns autores têm desenvolvido argumentos questionando a eficácia de fagos como agentes antimicrobianos (JOERGER, 2003; SKLAR; JOERGER, 2001; VIDAVER, 1976). A transdução dos fagos pode transferir características indesejáveis, como genes virulentos, de um organismo para outro, e a conversão lisogênica pode produzir células bacterianas que não são mais suscetíveis a ataques. Fagos por si só podem sofrer mutações de fagos líticos virulentos para fagos temperados, que geralmente formam uma associação não-lítica com as bactérias hospedeiras, resultando em lise de apenas uma pequena proporção da população. Embora esses fenômenos de transferência e conversão tenham sido documentados com patógenos de plantas e animais, não há provas de que eles ocorram em alimentos. No entanto, existem evidências de que a bactéria de origem alimentar pode abrigar fagos temperados (ACKERMANN et al.,

1988). Portanto, quando usados em qualquer aplicação de biocontrole, os fagos devem ser cuidadosamente caracterizados para determinar se eles podem executar transdução generalizada ou se eles carregam qualquer gene de virulência que poderia ser expresso no hospedeiro antes da morte (HUDSON et al., 2005).

A utilização de misturas de fagos de distintas famílias pode ajudar a resolver problemas relacionados com a resistência bacteriana (BARROW; SOOTILL, 1997; LEVERENTZ et al., 2003; SKLAR; JOERGER, 2001; TANJI et al., 2004). Em uma investigação de controle do fago de *E. coli* O157: H7, O'Flynn et al. (2004) concluíram que a frequência de formação de mutantes bacterianos insensíveis ao fago era muito baixa e os mutantes apareceram para reverter a sensibilidade ao fago. Tanji et al. (2004) conduziram um estudo do mecanismo de resistência do fago em *E. coli* O157: H7 e verificaram que o uso de coquetéis de fagos com receptores celulares distintos reprimia o aparecimento da resistência.

Um obstáculo importante do biocontrole com fago é a exigência de uma densidade limiar de células bacterianas hospedeiras. A necessidade de populações bacterianas de 3 a 5 log UFC tem sido relatada para que o uso do fago possa ter um impacto sobre esses hospedeiros (GREER, 1988; KENNEDY; BITTON, 1987; WIGGINS; ALEXANDER, 1985). Os números das células bacterianas alvo não seriam preocupantes em alimentos deteriorados, onde grandes populações de bactérias deteriorantes residem, mas seriam de fundamental importância no controle de patógenos em alimentos em que os números são normalmente mais baixos.

Essa exigência tem sido demonstrada por fagos que infectam *Pseudomonas* em leite (ELLIS et al., 1973), *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *E. coli* em cultura (WIGGINS; ALEXANDER, 1985) e *Salmonella* no ceco de frango (BERCHIERI et al., 1991). Esses autores concluíram que os fagos afetariam o seu hospedeiro somente quando a densidade deste ultrapassasse um determinado limiar (cerca  $10^4$ /mL). No entanto, nos alimentos, Greer (1988) demonstrou que a atividade foi observada quando a densidade do hospedeiro foi de 46 células/cm<sup>2</sup>.

Após uma série de publicações, entre 1982 e 1990, foi demonstrado o efeito preservativo de fagos de *Pseudomonas* em carne crua refrigerada (GREER, 1982, 1986, 1988; GREER; DILTS, 1990). A interação dos fagos com as bactérias na superfície das carnes não foi afetada pela temperatura (1 a 10 °C), mas foi significativamente influenciada pelo número inicial de fagos e bactérias inoculados. Para um aumento máximo da vida útil da carne do varejo foi necessário uma

densidade inicial de bactérias superior a 3 log UFC/cm<sup>2</sup> e concentração de fagos superior a 7 log UFP/cm<sup>2</sup> (GREER, 1988).

Uma das mais importantes vantagens do biocontrole de bactérias patogênicas por fagos é a especificidade por um hospedeiro particular. A gama de hospedeiros de um fago é determinada pela sua entrada na célula, pela interação com receptores celulares do hospedeiro e, posteriormente, por sistemas de restrição e modificação. A afinidade bem sucedida de um fago para com o seu hospedeiro exige vínculo entre receptores específicos na superfície celular e antirreceptores no fago (HUDSON et al., 2005).

Os receptores típicos incluem a membrana externa, que transporta proteínas, lipopolissacarídeos, carboidratos e estruturas especializadas, como os flagelos. Alguns fagos podem se ligar a vários receptores ou a mais de um receptor simultaneamente (GOLDBERG et al., 1994; HENNING; HASHEMOLHOSSEINI, 1994; SCHWARTZ, 1980). Conseqüentemente, um patógeno, como *E. coli* O157:H7, pode ser infectado por um fago em particular, mas sorovares não-patogênicas estreitamente relacionadas podem permanecer inalteradas.

Um dos maiores obstáculos para o controle com fago de bactérias deteriorantes de origem alimentar é a diversidade de tipos de fago. Na investigação sobre a deterioração da carne por *Pseudomonas* (GREER, 1982) e *B. thermosphacta* (GREER, 1983) foi revelada uma gama muito restrita de fagos isolados da carne deteriorada e muitos destes só poderiam lisar os seus homólogos hospedeiros. Até mesmo um “pool” de fagos com hospedeiros distintos foi incapaz de controlar a deterioração da carne naturalmente contaminada (GREER; DILTS, 1990).

Assim, o grande fator que contribui para o poder discriminatório dos fagos, ou seja, uma estreita gama de hospedeiros, também se traduz em inconveniente. Barrow e Soothill (1997) propuseram métodos para solucionar esse problema, incluindo a adaptação dos fagos a cepas resistentes, a identificação de fagos que atacam a superfície receptora das células compartilhadas por muitas cepas e a utilização de vários fagos em combinação.

## 8.2 Fatores que afetam o sucesso dos fagos como agentes de biocontrole

Os fagos têm um histórico de utilização segura. A sua especificidade com o hospedeiro sugere que a infecção de células humanas é improvável (HUDSON et al., 2005). O uso medicinal extensivo de terapia com fagos na antiga União Soviética e nos países da Europa Oriental é sugestivo que as preparações de fagos podem ser ingeridas com segurança (ALISKY et al., 1998; SULAKVELIDZE et al., 2001). Trabalhadores e seus familiares ingeriram preparações de fagos antes da avaliação clínica, com o intuito de comprovar sua segurança (SUMMERS, 2001). Por meio de experiências com animais foi possível demonstrar que a dose oral para o hospedeiro não adaptado ao fago, mesmo quando elevada, não desencadeava a presença de fagos no sistema circulatório (MERRIL et al., 1996). Mesmo quando fagos são utilizados em doses terapêuticas, há pouca evidência em seres humanos sobre graves reações imunes aos fagos. Algumas leves reações adversas foram relatadas em menos de 0,5% dos pacientes com terapia, porém os efeitos foram facilmente revertidos (MERRIL et al., 1996).

Um grande problema que pode advir do uso de fagos é a liberação de toxinas bacterianas oriundas da lise dessas células, mas isso também é observado com outras práticas usadas no controle do crescimento bacteriano.

Quando os fagos lisam as paredes das células bacterianas, eles o fazem através de enzimas (BERNHARDT et al., 2002); assim, a possibilidade de utilização de enzimas específicas codificadas para destruir bactérias responsáveis por intoxicações alimentares deve ser considerada. Uma endolisina de um fago de *L. monocytogenes* foi clonada em *Lactococcus lactis* e uma vez que o gene tinha sido fundido com um sinal peptídeo que permitiu que a proteína lítica fosse extravasada da célula, células de *L. monocytogenes* no meio circundante foram rapidamente lisadas (GAENG et al., 2000).

Outro fator, em alguns sistemas alimentares, é a presença de um número significativo de células bacterianas não-hospedeiras. Nesse caso, a eficiência dos fagos como agentes de biocontrole é limitada por uma dependência em relação à difusão passiva do transporte de partículas infecciosas para o hospedeiro (HUDSON et al., 2005). Por meio de um modelo matemático, Wilkinson (2001) comprovou que o impedimento competitivo da ação do fago devido à elevada densidade de espécies não-hospedeiras ou outras partículas tende a reduzir a probabilidade de extinção do

organismo-alvo. Embora o modelo seja uma indicação, existem poucos ou nenhum dado disponível para avaliar o efeito dos componentes dos alimentos ou espécies não-hospedeiras sobre a habilidade dos fagos serem transportados para os seus hospedeiros.

### **8.3 Sobrevivência do fago em alimentos e nas instalações do processamento**

Considerações sobre a estabilidade de fagos em alimentos são importantes porque, para se ter sucesso com o uso de fagos como agentes de biocontrole, eles precisam ser estáveis sob as condições físico-químicas (por exemplo, o pH e a atividade de água) dos alimentos em que serão aplicados (HUDSON et al., 2005).

#### Tolerância ao pH.

Estudos prévios indicaram que os fagos são geralmente estáveis em valores de pH entre 5 e 8; em baixas temperaturas, esse intervalo pode ser aumentado para valores entre 4 e 10 (ADAMS, 1959).

Na investigação de *Salmonella* em frutas frescas, usando o biocontrole com fagos (LEVERENTZ et al., 2001), foi indicado que a estabilidade dos fagos dependia do pH. Quando fagos foram incubados após ajuste de pH para 4,2, o seu número foi quatro vezes menor do que o daqueles em preparações ajustadas para pH 5,8 após 48 h a 5 °C.

Misturas de fagos específicos de *L. monocytogenes* controlaram o número de células bacterianas em cortes de melão fresco, mas o efeito em maçãs artificialmente contaminadas não pôde ser demonstrado (LEVERENTZ et al., 2003). Segundo esses autores, o número de fagos nas amostras de melão encontrava-se estável, mas aquele observado nas fatias de maçãs rapidamente diminuiu, possivelmente devido ao baixo pH. Quando aplicada ao melão, a mistura de fagos resultou em redução imediata de cerca de dois ciclos logarítmicos nos números de *L. monocytogenes* e continuou a inibir o crescimento em até dois dias a 10 °C. Aos sete dias de armazenamento, observou-se uma diferença de mais de quatro ciclos logarítmicos nos números de *L. monocytogenes*, quando comparados às amostras não-tratadas. Em maçãs, essa diferença foi inferior a 0,4 log.

### Termotolerância.

A inativação térmica de colifagos em condições de laboratório geralmente ocorre em 60 a 75 °C e o efeito do estresse térmico pode ser variável (ADAMS, 1959).

A sobrevivência de fagos termotolerantes ao processo de pasteurização é um importante ponto de entrada em indústrias de laticínios. No exame de fagos de *Lactobacillus helveticus* realizado por Quiberoni et al. (1999) evidenciou-se que a termotolerância foi dependente do fago e do meio utilizado, com alguns isolados inativados em temperaturas de pasteurização de 63 a 72 °C e outros exigindo tratamento a 90 °C.

Fagos isolados a partir de soro de queijo e iogurte requereram aquecimento a 90 °C durante cinco minutos para reduzir os números de  $10^6$ - $10^7$  UFP/mL para menos de 10 UFP/mL (BINETTI; REINHEIMER, 2000). Assim, como os fagos podem ser mais resistentes ao calor do que a maioria das bactérias vegetativas, eles podem sobreviver a tratamentos térmicos aplicados rotineiramente em alguns alimentos.

### Luz visível e ultravioleta.

Evidências sugerem uma inativação exponencial para a maioria dos fagos quando expostos à luz ultravioleta (ADAMS, 1959). A maior parte dos efeitos inativadores parece ser devido aos danos acumulados nos ácidos nucleicos. Em sistemas aquáticos, a luz solar (em especial UV-B) parece ser o principal fator no declínio do número de fagos (SINTON et al., 2002; WOMMACK et al., 1996). Em laboratório, observou-se que os fagos irradiados com UV podem ser reativados após a reparação de seus ácidos nucleicos por vias de reparação luz-dependente das células hospedeiras ou, em casos de infecção múltipla, por recombinação entre diferentes clones (ADAMS, 1959).

### Sanitizantes.

Quiberoni et al. (1999) demonstraram que o hipoclorito de sódio (100 ppm de cloro livre) e o ácido peracético inativaram fagos do leite dentro de 5 a 10 min. O uso de etanol a 75% (v/v) foi efetivo contra fagos, enquanto o isopropanol não foi tão eficaz. Como os fagos são em geral mais capazes de resistir às mudanças ambientais do processamento de alimentos que as bactérias, eles podem persistir

em locais que não sejam limpos e sanitizados adequadamente (KENNEDY; BITTON, 1987).

#### **8.4 Uso do bacteriófago P100 para controle de *Listeria monocytogenes***

Apesar da aplicação de rigorosos procedimentos de limpeza e sanitização no ambiente de processamento da indústria, os alimentos processados têm sido contaminados por *L. monocytogenes* mesmo quando a matéria-prima está livre do patógeno. *L. monocytogenes* pode aderir a vários tipos de superfície, sendo encontrada em biofilmes nos ambientes de processamento de carnes e produtos de laticínios. É possível que algumas linhagens de *L. monocytogenes* possam ter adquirido resistência aos sanitizantes comumente usados pelas indústrias (MEREGETTI et al., 2000).

Os agentes químicos como os compostos clorados e ácidos orgânicos e seus sais são comumente utilizados no processo de abate de animais para redução da microbiota contaminante, visando principalmente a eliminação de *Salmonella* spp. O cloro em solução aquosa é largamente empregado no processamento de alimentos para controlar o crescimento microbiano. Entretanto, sua atividade diminui em condições alcalinas e/ou na presença de altos níveis de matéria orgânica. Além disso, produtos potencialmente tóxicos/ mutagênicos, incluindo trialomitanos, são formados durante o tratamento de água com cloro (WEI et al., 1985, 1996).

Em 1992, o uso de tripolifosfato de sódio (TSP) para redução da contaminação de carcaças de aves foi aprovado nos Estados Unidos. No Brasil, o Ministério da Agricultura autorizou em 1995 o uso desse composto em estabelecimentos com Serviço de Inspeção Federal e, em 2001, foi aprovado o uso do ácido láctico e do ácido peracético para descontaminação de ovos e carcaças de aves (BRASIL, 2001a).

A atividade germicida dos sanitizantes depende de vários fatores, como concentração, tempo, temperatura, pH, solubilidade, concentração de matéria orgânica, tipo de superfície, espécie e população do microrganismo que se quer destruir (BEUCHAT et al., 2001; BRENES, 2002). Embora os tratamentos com sanitizantes tenham demonstrado algum grau de eficácia no tocante à redução da população bacteriana, cada um deles apresenta desvantagens, como perda da

estabilidade, alto grau de reatividade, riscos à saúde, questionamento pelos consumidores com relação à segurança do produto, alto custo ou mudanças sensoriais adversas, limitando, com isso, o seu uso (CAPITA et al., 2001).

A resistência natural de *L. monocytogenes* a muitos dos sistemas de preservação de alimentos, que são efetivos contra outros patógenos responsáveis por toxinfecções alimentares, tem despertado a atenção e incentivado as pesquisas para o desenvolvimento de sistemas mais efetivos para o controle da bactéria (OH; MARSHALL, 1993, citados por BARKER; PARK, 2001).

A indústria de alimentos busca técnicas alternativas para substituir os métodos tradicionais de controle de microrganismos nos alimentos, como tratamentos intensos de calor, acidificação, congelamento, desidratação e adição de sal e de agentes químicos. Nos últimos anos, as tecnologias mais estudadas são as de inativação de microrganismos por métodos não-térmicos, como o uso de alta pressão hidrostática, utilização de pulsos eletromagnéticos, sistemas de embalagens ativas ou com atmosfera modificada, uso de compostos antimicrobianos naturais e bioconservação (DEVLIEGHIERE et al., 2004).

Também, nos últimos anos, os consumidores passaram a exigir alimentos com mais qualidade, sem conservadores químicos e com longa vida útil (BRUL; COOTE, 1999; PRANOTO et al., 2005). Segundo Rodgers (2001), a utilização de agentes químicos para conservação de alimentos não é compatível com a imagem de produtos “frescos”. Além disso, a adição de nitrato a alimentos cárneos, visando o aumento da segurança e da vida útil, pode levar à formação de nitrosaminas, que têm efeito carcinogênico ao organismo humano (ABEE et al., 1995).

Em consequência do aumento do interesse dos consumidores por produtos naturais (ZINK, 1997; CLEVELAND et al., 2001; PRANOTO et al., 2005), o uso de antimicrobianos naturais pode ser uma alternativa aos métodos utilizados atualmente pelas indústrias. Uma opção seria o uso de bacteriófagos, que são vírus que infectam somente bactérias e não infectam células animais ou vegetais.

Em 2006, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) e a agência norte-americana Food and Drug Administration (FDA) aprovaram o uso de um bacteriófago específico para o controle de *Listeria* em queijos. Um ano depois, essa aprovação se estendeu a todos os tipos de alimento. LISTEX™ P100 é uma cultura de microrganismos seguros, composta de seis bacteriófagos específicos para

o patógeno em questão, que pode ser usada na produção de alimentos como um aditivo natural do processo (EBI FOOD SAFETY, 2007).

Quase todos os fagos que infectam organismos do gênero *Listeria* são temperados e apresentam uma escala muito estreita do hospedeiro (LOESSNER; REES, 2005). O bacteriófago P100 representa um dos poucos fagos virulentos conhecidos para esse gênero, é estritamente lítico e, portanto, invariavelmente letal à célula bacteriana, uma vez que a infecção for estabelecida. Na Figura 4 é mostrada uma visão esquemática do ciclo lítico. Além disso, P100 apresenta uma escala raramente larga do hospedeiro dentro do gênero *Listeria*, similar ao fago A511 (LOESSNER, 1991; LOESSNER; BUSSE, 1990; Van der MEE-MARQUET et al., 1997).

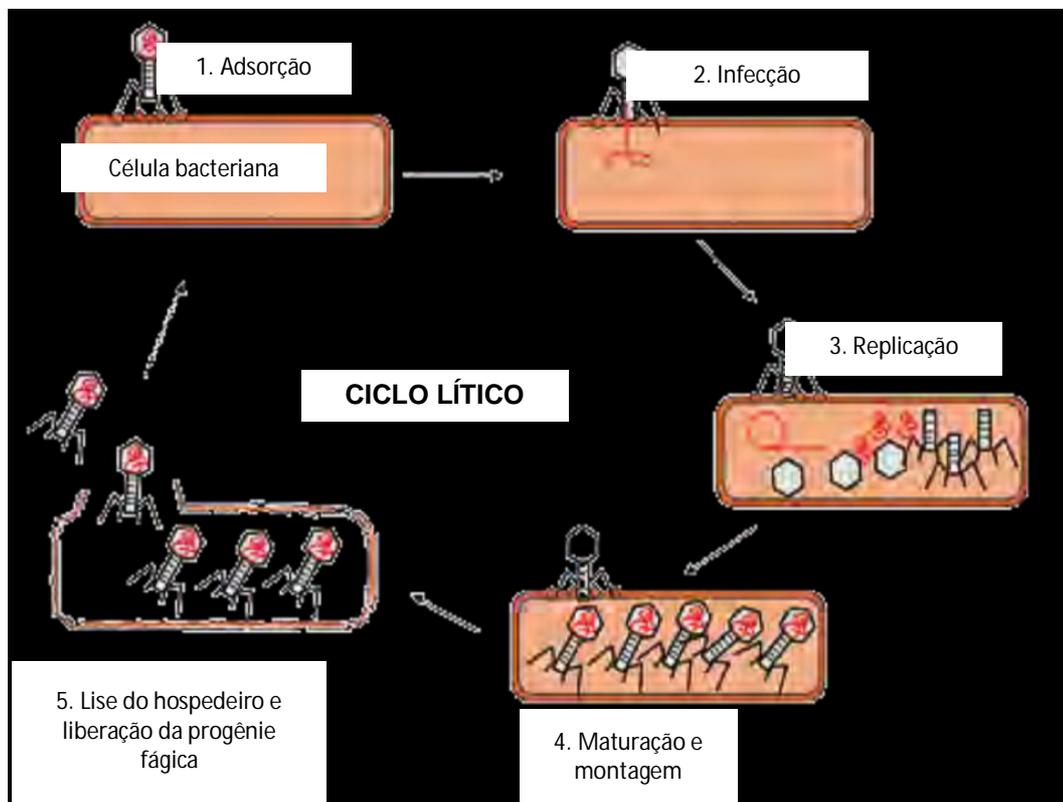


Figura 4 – Visão esquemática dos passos que levam à liberação de uma progênie fágica de uma célula infectada. Adaptado de Hagens; Offerhaus (2008).

Estudo desenvolvido por Carlton et al. (2005), com base na otimização de testes preliminares, utilizou o bacteriófago P100 durante a fase de produção/maturação da superfície artificialmente contaminada de queijo macio. Dependendo dos pontos, da frequência e da dose de aplicações do fago, obteve-se redução significativa (pelo menos 3,5 logs) ou uma completa erradicação de células

viáveis de *Listeria*. Não foram encontradas evidências para resistência do fago em isolados de *Listeria* recuperados das amostras. É também importante notar que o fago não afetou notoriamente a funcionabilidade da microbiota natural no processo de maturação, ou seja, não ocorreram mudanças aparentes no produto tratado, comparado ao controle, em termos de aparência geral ou cor. Os resultados indicam que o P100 pode fornecer uma medida efetiva e segura para o controle da contaminação de *Listeria* em alimentos e equipamentos de produção. Nesse mesmo experimento, foi realizado um estudo toxicológico em ratos e nenhuma alteração histopatológica, mortalidade ou morbidade relacionada ao P100 foi observada.

Carlton et al. (2005) também determinaram e analisaram o sequenciamento completo do genoma do bacteriófago P100. Não foi encontrada nenhuma similaridade com qualquer um dos 174 produtos dos genes preditos do P100 para qualquer toxina conhecida ou suspeita ou outro fator envolvido na regulação da virulência e/ou patogenicidade de *Listeria* ou outros organismos.

Com relação ao fago P100, os dados disponíveis sugerem que o seu uso como aditivo para biopreservação dos alimentos é esperado ser seguro aos consumidores, assim como para o meio ambiente.

## REFERÊNCIAS

ABEE, T.; KROCKEL, L.; HILL, C. Bacteriocins: mode of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, v.28, p. 169-185, 1995.

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.

ACKERMANN, H. W.; GREER, G. G.; ROCOURT, J. Morphology of *Brochothrix thermosphacta* phages. **Microbios**, v. 56, p. 19-26, 1988.

ADAMS, M. H. **Bacteriophages**. NewYork: Interscience Publishers, 1959.

ALISKY, J.; ICZKOWSKI, K., RAPPAPORT, A., TROITSKY, N. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. **J. Infect**, v. 36, p. 5-15, 1998.

ALMEIDA, P. F.; ALMEIDA, R. C. C. Métodos de detecção e mecanismos de virulência de *Listeria monocytogenes*. **Bol. SBCTA**, v. 37, p. 136-145, 2003.

ALMEIDA, P. F.; ALMEIDA, R. C. C.; RODRICK G. E. *Listeria monocytogenes*: importância e distribuição nos alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 17, p. 19-23, 1999.

ALMEIDA, P. F.; ALMEIDA, R. C. C. A PCR protocol using *Inl* gene as a target for specific detection of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 11, p. 97-101, 2000.

ALTEKRUSE, S. F.; COHEN, M. L.; SWERDLOW, D. L. Emerging foodborne diseases. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 3, p. 285-293, 1997.

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.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; CARVALHO, J. C. A. P. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em produtos de carne de peru comercializados na cidade de Niterói-RJ-Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 30, p. 19-25, 2002.

ATTERBURY, R.J.; CONNERTON, P.L., DODD, C.E., REES, C.E., CONNERTON, I.F. Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 6302-6306, 2003a.

ATTERBURY, R. J.; CONNERTON, P.L., DODD, C.E., REES, C.E., CONNERTON, I.F. Isolation and characterization of *Campylobacter* bacteriophages from retail poultry. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 4511-4518, 2003b.

AZADIAN, B. S.; FINNERTY, G.T; PEARSON, A. D. Cheese-borne *Listeria* meningitis in immunocompetent patient. **Lancet**, v. 1, p. 322-3, 1989.

BACKER, M.; BRETT, M.; SHORT, P. Listeriosis and mussels. **Commun. Dis. New Zealand**, v. 93, p. 13-14, 1993.

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

BARROW, P. A.; SOOTHILL, S. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. **Trends Genetics**, v. 5, p. 268-271, 1997.

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. *Listeria*. Zaragoza: Acribia, 1998. 173 p.

BENKERROUM, N.; DAOUDI, A.; HAMRAOUI, T.; GHALFI, H.; THIRY, C.; DUROY, M.; EYRART, P.; ROBLAIN, D. Lyophilized preparations of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* and *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* as potential protective adjuncts to control *Listeria monocytogenes* in dry-fermented sausages. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 56-63, 2005.

BENNIK, M. H. J.; PEPPELENBOS, H.W.; NGUYEN-THE, C.; CARLIN, F.; SMID, E.J.; GORRIS, L.G.M. Microbiology of minimally processed, modified-atmosphere packaged chicory endive. **Postharvest Biol. Technol.**, v. 9, n. 2, p. 209-221, 1996.

BERCHIERI Jr., A.; LOVELL, M. A.; BARROW, P. A. The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella typhimurium*. **Res. Microbiol.**, v. 142, p. 541-549, 1991.

BERNHARDT, T. G.; WANG, I.N., STRUCK, D.K., YOUNG, R. Breaking free: "protein antibiotics" and phage lysis. **Res. Microbiol.**, v. 153, p. 493-501, 2002.

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.13-17, 2001.

BEUCHAT, L. R.; FARBER, J.M., GARRET, E.H., HARRIS, L.J., PARISH, M.E., SUSLOW, T.V., BUSTA, F.F. Standardization of a method to determine the efficacy of sanitizers in inactivating human pathogenic microorganisms on raw fruits and vegetables. **J. Food Protect.**, v. 64, n. 7, p. 1079-1084, 2001.

BHUNIA, A. K. Antibodies to *Listeria monocytogenes*. **Critical Rev. Microbiol.**, v. 23, p. 77, 1997.

BILLE, J. Epidemiology of human listeriosis in Europe with special reference to the Swiss outbreak. In: MILLER, A **Food borne listeriosis**. New York: Elsevier, 1990. cap.12, p.71-74.

BINETTI, A. G.; REINHEIMER, J. A. Thermal and chemical inactivation of indigenous *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from Argentinian dairy plants. **J. Food Prot.**, v. 63, p. 509-515, 2000.

BISWAS, B.; ADHYA, S., WASHART, P., PAUL, B., TROSTEL, A.N., POWELL, B., et al. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. **Infect. Immunol.**, v. 70, p. 204-210, 2002.

BOGGS, G. D.; WHITWAM, R. E.; HALE, L. M.; BRISCOE, R. P.; KAHN, S. E. Outbreak of Listeriosis associated with homemade mexican-style cheese – North Carolina. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 50, n. 26, 2001.

BOHAYCHUK, V. M.; GENSLER, G. E.; KING, R. K.; MANNINEN, K. I.; SORENSEN, O.; WU, J. T.; STILES, M. E.; McMULLEN, L. M. Occurrence of pathogens in raw and ready-to-eat meat and poultry products collected from the retail marketplace in Edmonton, Alberta, Canada. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 9, p. 2176-2182, 2006.

BRANCO, M.A.A.C.; FIGUEIREDO, E. A. T.; BORGES, M. F.; SILVA, M. C. D.; DESTRO, M. T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. B. CEPPA, Curitiba.v.21, n.2, p.393-408, jul/dez 2003.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução de Diretoria Colegiada** n. 7, de 2 de janeiro de 2001a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 7-E, 10 jan. 2001b.

BREHM, K.; KREFT, J.; RIPIO, M.T.; VÁZQUEZ-BOLAND, J.A. Regulation of virulence gene expression in pathogenic *Listeria*. **Microbiologia**, v. 12, p. 219-236, 1996.

BREITBART, M.; HEWSON, I., FELTS, B., MAHAFFY, J.M., NULTON, J., SALAMON, P., et al. Metagenomic analysis of an uncultured viral community from human feces. **J. Bacteriol.**,v. 185, p. 6220-6223, 2003.

BRENES, C. H. Good manufacturing practices (GMP's) – Buenas prácticas para la manipulación, embalaje, almacenamiento y transporte de productos frescos. In: FDA, Food and Drug Administration. Manual de formación para instructores. Campus Monterrey, México, 2002.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 1-17, 1999.

BRUTTIN, A.; BRÜSSOW, H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, p. 2874-2878, 2005.

- CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C., GARCIA-FERNANDEZ, C., MORENO, B. Efficacy of trisodium phosphate solutions in reducing *L. monocytogenes* populations on chicken skin during refrigerated storage. **J. Food Protect.**, v. 64, n. 10, p. 1627-1630, 2001.
- CARLTON, R. M.; NOORDMAN, W.H.; BISWAS, B.; MEESTER, E.D.; LOESSNER, M.J. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 43, p. 301-312, 2005.
- CASTELLANO, P. H.; HOLZAPFEL, W.; VIGNOLO, G. M. The control of *Listeria innocua* and *Lactobacillus sakei* in broth and meat slurry with the bacteriocinogenic strain *Lactobacillus casei* CRL705. **Food Microbiology**, v.21, p. 291-298, 2004.
- CASTRO, A. F. P. *Listeria*. In: TRABULSI, L.R. (Ed.). **Microbiologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1989. p. 131-132.
- CERVENY, K. E.; DePAOLA, A., DUCKWORTH, H., GULIG, P.A. Phage therapy of local and systemic disease caused by *Vibrio vulnificus* in iron-dextran- treated mice. **Infect. Immunol.**, v. 70, p. 6251-6262, 2002.
- CHIBANI-CHENNOUFI, S.; BRUTTIN, A., DILLMANN, M.L., BRÜSSOW, H. Phage-host interaction: an ecological perspective. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 3677-3686, 2004.
- CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 1-20, 2001.
- CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p. 367-373.
- DANCZ, C. E.; HARAGA, A.; PORT NOY, D. A.; HIGGINS, D.E. Inducible control of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*: Temporal requirement of listeriolysin O during intracellular infection. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 5935-5945, 2002.
- DEDIOL, C. et al. Incidência de *Listeria monocytogenes* em Carne Vacuna Fresca em el Área del Gran Mendoza. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 102/103, p. 13-16, 2002.
- DENDER, A. G. F. V. *Listeria monocytogenes*: um problema em leite e produtos lácteos. **Informe Agropecuário**, v. 13, p. 19-23, 1988.
- DESEO, J. *Listeria monocytogenes* in processed meats. **AOAC Int.**, v. 3, n. 4, p. 23-24, 1999.

DESTRO, M. T.; KABUKI, D. Y.; SERRANO, A. M. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, v. 2, p. 110-112, 1991.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 273-285, 2004.

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

DONNELLY, C. W. et. al. *Listeria* spp. In: VANDERZANT, C. SPLITTSTOESSER, D. F. (Eds.). **Compedium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: APHA, 1992. p. 637-664.

DOROZYNSK, A. Seven dye in french *Listeria* outbreak. **B.M.J.**, v. 320, p. 601, 2000.

DOYLE, M.P. Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. **Food Technol.**, v. 42, p.169-171, 1988.

DOYLE, M.P.; MESKE, L.M.; MARTH, E.H. Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufactory and storage of non fat dry milk. **Journal of Food Protection**, v. 48, n.9, p. 740-742, 1985.

DUARTE, D.A.M. SCHUCH, D. M. T.; SANTOS, S. B.; RIBEIRO, A. R.; VASCONCELOS, A. M. M.; SILVA, J. V. D.; MOTA, R. A. Pesquisa de *Listeria monocytogenese* microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 297-302, 2005.

DUFFY, G.; CLOAK, O.M.; SHERIDAN, J.J.; BLAIR, I.S.; McDOWELL, D.A. The development of a combined surface adhesion and polymerase chain reaction technique in the rapid detection of *Listeria monocytogenes* in meat and poultry. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 49, p. 151-159, 1999.

DYKES, G. A.; MOORHEAD, S. M. Combined antimicrobial effect of nisin and a listeriophage against *Listeria monocytogenes* in broth but not in buffer or on raw beef. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 71-81, 2002.

EBI FOOD SAFETY. **FDA and USDA extend GRAS approval for LISTEX™ for all food product**. News 2007, July, 2007. Disponível em: <<http://www.ebifoodsafety.com/en/news-2007.aspx>>. Acesso em: 10 jan. 2009.

ELLIS, D. E.; WHITMAN, P. A.; MARSHALL, R. T. Effects of homologous bacteriophage on growth of *Pseudomonas fragi* wy in milk. **Appl. Microbiol.**, v. 25, p. 24-25, 1973.

EMOND, E.; FLISS, I.; PANDIAN, S. A ribosomal DNA fragment of *Listeria monocytogenes* and its use as a genus-specific probe in a aqueous-phase hybridization assay. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, p. 2690-7, 1993.

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-born pathogen. **Microbiological Reviews**, v.55, n.3, p. 476-511, 1991.

FELIX, A.; CALLOW, B. Typing of paratyphoid B bacilli by means of Vi bacteriophage. **Br. Med. J.**, v. 2, p. 127-130, 1943.

FENLON, D. R. *Listeria monocytogenes* in the natural environment. In: RYSER, E. T.; MARTH, E. H. (Eds.). **Listeria, listeriosis and food safety**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 21-37.

FLEMING, D. W.; COCHI, S.L.; MACDONALD, K.L.; BRONDUM. J. HAYES, P.S.; PLIKAYTIS, B.D.; HOLMES, M.B.; AUDURIER, A.; BROOME, C.V.; REINGOLD, A.L. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. **New Eng. J. Med.**, v. 312, p. 404-407, 1985.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. Report of the FAO expert consultation on the trade impact of *Listeria* in fish products. Rome: FAO, 1999. 34 p. (FAO Fisheries Report, 604).

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

FREEMAN, B. A. **Tratado de microbiologia de Burrows**. 21.ed. Mexico: Interamericana, 1983. 630 p.

FURUSE, K. Distribution of coliphages in the general environment general considerations. In: GOYAL, S.M.; GERBA, C.; BITTON, G. (Eds.). **Phage ecology**. New York: John Wiley & Sons, 1987. p. 87-124.

- GAENG, S.; SCHERER, S., NEVE, H., LOESSNER, M.J. Gene cloning and expression and secretion of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 2951-2958, 2000.
- GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L.; KAMEI, C. A. K. et al. Manipuladores de alimentos: capacitar? É preciso. Regulamentar? Será preciso??? **Higiene Alimentar**, v.14, n.78/79, 2000.
- GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela. 2001. 629 p.
- GILBERT, R. J. Foodborne infections and intoxications: recent problems and new organisms. **Brit. Food J.**, v. 96, p.85-87, 1994.
- GOLDBERG, E. L.; GRIUIUS, L.; LETELLIER, L. Recognition, attachment, and injection. In: KARAM, J. D. (Ed.). **Molecular biology of bacteriophage T4**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1994. p. 347-356.
- GOODE, D.; ALLEN, V. M.; BARROW, P. A. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 8, p. 5032-5036, 2003.
- GOULET, V.; JACQUET, C.; VAILLANT, V. Listeriosis from consumption of raw-milk cheese. **Lancet**, v. 345, p. 1581-1582, 1995.
- GREER, G. G. Psychrotrophic bacteriophages for beef spoilage pseudomonas. **J. Food Prot.**, v. 45, p. 1318-1325, 1982.
- GREER, G. G. Psychrotrophic *Brochothrix thermosphacta* bacteriophages isolated from beef. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 46, p. 245-251, 1983.
- GREER, G. G. Homologous bacteriophage control of *Pseudomonas* growth and beef spoilage. **J. Food Prot.**, v. 49, p. 104-109, 1986.
- GREER, G. G. Effect of phage concentration, bacterial density, and temperature on phage control of beef spoilage. **J. Food Sci.**, v. 53, p. 1226-1227, 1988.
- GREER, G. G. Bacteriophage control of foodborne bacteria. **Journal of food Protection**, v. 68, n. 5, p. 1102-1111, 2005.
- GREER, G. G.; DILTS, B. D. Inability of a bacteriophage pool to control beef spoilage. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 10, p. 331-342, 1990.

GREIFFENBERG, L.; SOKOLOVIC, Z.; SCHNITLER, A.S.; BOCKMANN, R. et al. *Listeria monocytogenes* - infected human umbilical vein endothelial cells: internalin-independent invasion, intracellular growth, movement, and host cell responses. **FEMS Microbiology Letters**, v. 157, p. 163-170, 1997.

GRENNINGLOH, R.; DARJI, A.; WEHLAND, J.; CHAKRABORTY, T.; WEISS, S. Listeriolysin and IrpA are major protein targets of the human humoral response against *L. monocytogenes*. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 3976-3980, 1997.

HAGENS, S.; OFFERHAUS, M. L. Bacteriophages – New weapons for foods safety. **Food Technology**, v. 62, n. 4, p. 46-54, 2008.

HARRIGAN, W. F. **Laboratory methods in food microbiology**. 3-ed. California: Academic Press, 1998. 531 p.

HENNING, U.; HASHEMOLHOSSEINI, S. Receptor-recognition by T-even-type coliphages. In: KARAM, J. D. (Ed.). **Molecular biology of bacteriophage T4**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1994. p. 291-298.

HITCHINS, A. D. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. In: US Food and Drug Administration (FDA), **Bacteriological Analytical Manual Online**, Chapter 10, revised January 2003. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>>. Acesso em: 17 set. 2008.

HO, J. L.; SHANDS, K.N.; FRIEDLAND, G.; ECKLAND, P.; FRAISER, D.W. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. **Arch. Intern. Med.**, v. 146, p. 520-524, 1986.

HOBBS, B. C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos**. São Paulo: Varela, 1992. 425p.

HOFER, E. **Três décadas de experiência sobre *Listeria* no Brasil**. Campinas, SP, 1999, 111 p. (Texto extraído de palestra proferida no III Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos).

HOFER, E. Species and sorovares of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 615-620, 2000.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. Regular, nonsporng gram-positive rods. Genus *Listeria*. In: HENSYL, W. R (Ed.). **Berguey's manual of sistematic bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Willians Wilkins, 1994. p. 565-570.

- HUDSON, J. A.; BILLINGTON, C., CAREY-SMITH, G., GREENING, G.  
Bacteriophages as biocontrol agents in food. **J. Food Prot.**, v. 68, p. 426-437, 2005.
- JAY, J. M. Introdução aos microrganismos causadores de doenças de origem alimentar. In: JAY, J. M. (Ed.). **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005, cap. 22. p. 454-489.
- JAY, J. M. Listerioses de origem animal. In: JAY, J. M. (Eds.). **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.
- JAY, J. M. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. **Food Control**, v. 7, n. 4/5, p. 209-214, 1996.
- JOERGER, R. D. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. **Poult. Sci.**, v. 82, p. 640-647, 2003.
- JOKLIK, W. K.; WILLENTÉ, H.P., AMOS, D.B., WILFERT, C.M. **Zinsser Microbiologia**. 20.ed. Bogotá: Panamericana, 1994. 1696 p.
- KACZMARSKI, E. B.; JONES, D. M. Listeriosis and ready-cooked chicken. **Lancet**, v. 1, n. 8635, p. 549, 1989.
- KASNOWSKI, M. C. ***Listeria* spp., *Escherichia coli*: Isolamento, identificação, estudo sorológico e antimicrobiano em corte de carne bovina (alcatra) inteira e moída**. 2004. 111 f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense, Niterói-RJ, 2004.
- KAYAL, S.; LILIENBAUM, A.; POYART, C.; MEMET, S.; ISRAEL, A.; BERCHE, P. Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NF-Kappa B and up regulation of adhesion molecules and chemokines. **Molecular Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 1709-1722, 1999.
- KENNEDY, J. E. J.; BITTON, G. Bacteriophages in foods. In: GOYAL, S. M.; GERBA, C. P.; BITTON, G. (Eds.). **Phage ecology**. New York: John Wiley & Sons, 1987. p. 289-316.
- KERR, K.G. Materno-fetal listeriosis from cook-chill and refrigerated foods. **Lancet**, v. 2, n.1133, p. 11-13, 1988.
- KLIMA, R. A.; MONTVILLE, T. J. The regulatory and industrial responses to listeriosis in the USA: a paradigm for dealing with emerging food borne pathogens. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 6, p. 87-93, 1995.

KOSTRZYNSKA, M.; CAMPOS, M.C., GLIFFITHS, M., LEPP, D. Biocontrol of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 on poultry products using bacteriophages, In: AGRICULTURE AND AGRI-FOOD CANADA FOOD NETWORK MEETING, Lacombe, Alberta, Canada, 2002. **Proceedings...** Lacombe: 2002. p. 35.

KUHN, M.; GOEBEL, W. Molecular studies on the virulence of *Listeria monocytogenes*. **Genetic Engineering**, v. 17, p. 31-51, 1995.

LEIMEISTER-WACHTER, M.; DOMANN, E.; CHAKRABORTY, T. The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 947-52, 1992.

LEITE, C. C.; GUIMARÃES, A. G.; RIBEIRO, N. S.; SILVA, M. D.; ASSIS, P. N. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em queijo do tipo "coalho" comercializado em Salvador (Ba). Importância para a saúde. **Revista Analytica**, n. 2, p. 38-41, 2002.

LEVERENTZ, B.; CONWAY, W.S., ALAVIDZE, Z., JANISIEWICZ, W.J., FUCHS, Y., CAMP, M.J., CHIGHLADZE, E., SULAKVELIDZE, A., Examination of bacteriophage as a biocontrol method for salmonella on fresh-cut fruit: a model study. **J. Food Prot.**, v. 64, p. 1116-1121, 2001.

LEVERENTZ, B.; CONWAY, W.S., CAMP, M.J., JANISIEWICZ, W., ABULADZE, T., YANG, M., SAFTNER, R., SULAKVELIDZE, A. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 4519-4526, 2003.

LIMA, A. T. F.; ROSSINI, E. M. M.; POMPERMAYER, D. M. C. Incidência de *Listeria* sp. e *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22., Florianópolis, 2003. **Resumos...** Florianópolis: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003.

LINNAN, M. J. MASCOLLA, L.; LOU, X.D.; GOULET, v.; MAY, S.; SALMINEN, C.; YONEKURA, M. L.; HAYES, P.; WEAVER, R; AUDURIER, A; PLIKAYTIS, B.D.; FANNIN, S.L.; KLEKS, A; BROOME, C.V. Epidemic listeriosis associated with mexican-style cheese. **N Engl. J Med**, v. 319, p. 823-828, 1988.

LOESSNER, M. J. Improved procedure for bacteriophage typing of *Listeria* strains and evaluation of new phages. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, p. 882-884, 1991.

LOESSNER, M. J.; BUSSE, M. Bacteriophage typing of *Listeria* species. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 1912-1918, 1990.

LOESSNER, M. J.; REES, C. E. D. *Listeria* phages: basics and applications. In: WALDOR, M. K.; FRIEDMANN, D. I.; ADHYA, S. L. (Eds.). **Phages: their role in bacterial pathogenesis and biotechnology**. Washington, DC.: American Society for Microbiology, 2005.

LOESSNER, M. J.; RUDOLF, M.; SCHERER, S. Evaluation of luciferase reporter bacteriophage *A511:lux* AB for detection of *Listeria monocytogenes* in contaminated foods. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2961-5, 1997.

LOGUERCIO, A. P. SILVA, W. P.; ALEIXO, J. A. G.; COSTA, M. M.; VARGAS, A. C. *Listeria monocytogenes*: um importante patógeno de origem alimentar. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 80/81, p. 39-48, 2001.

LOVETT, J. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M. P. (Ed.). **Food-borne pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 283-310.

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

MADDEN, J. M. Regulatory concerns of *Listeria* in foods. In: IFT ANNUAL MEETING. **Book of abstracts**. [s.l.: s.n.], 1992. p.102.

MAIJALA, R.; LYYTIKAINEN, O.; JOHANSSON, T.; AUTIO, T.; AALTO, T.; HAAVISTO, L.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Exposure of *Listeria monocytogenes* within an epidemic caused by butter in Finland. **Int. J Food Microbiol.**, v. 70, p. 97-109, 2001.

MARCO, F.; ALMELA, M.; NOLLA-SALAS, J.; COLL, P.; GASSER, J.; FERRER, M. D.; SIMON, M. *In vitro* activities of 22 antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* strains in Barcelona-Spain. **Diagnostic Microbiology and Infections Disease**, v. 38, p. 259-261, 2000.

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

MARTÍN, B.; JOFRÉ, A.; GARRIGA, M.; HUGAS, M.; AYMERICH, T. Quantification of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages by MPN-PCR method. **Journal of Applied Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 290-295, 2004.

MARTINIS, E. C. P.; FRANCO, B. D. G. M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. **International Journal of Microbiology**, v. 42, p. 119-126, 1998.

- MASCOLA, L.; SORVILLO, F.; NEAL, J.; IWAKOSHI, K.; WEAVER, R. Surveillance of listeriosis in Los Angeles country, 1985-1986. **Arch. Int. Med**, v. 149, p. 1569-1572, 1989.
- McLAUCHLIN, J. Human listeriosis in Britain, 1967-1985, a summary of 722 cases. In. Listeriosis during pregnancy and in the newborn. **Epidemiol. Infect.**, v. 104, p. 181-9, 1991.
- McLAUCHLIN, J. Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. **Environ. Policy Prat.**, v. 3, p. 201-214, 1993.
- McLAUCHLIN, J. The relationship between *Listeria* and Listeriosis. **Food Control.**, v. 7, p. 187-193, 1996.
- McLAUCHLIN, J. The identification of *Listeria* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 38, p. 77-81, 1997a.
- McLAUCHLIN, J. The pathogenicity of *Listeria monocytogenes*: a public health perspective. **Rev. Med. Microbiol.**, v. 8, p. 1-14, 1997b.
- MEAD, P. S.; DUNNE, E. F.; GRAVES, L.; WIEDMANN, M.; PATRICK, M.; HUNTER, S.; SALEHI, E.; MOSTASHARI, F.; CRAIG, A.; MSHAR, P.; BANNERMAN, T.; SAUDERS, B. D.; HAYES, P.; DEWITT, W.; SPARLING, P.; GRIFFIN, P.; MORSE, D.; SLUTSKER, L.; SWAMINATHAN, B. Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. **Epidemiol. Infect.**, v. 134, p. 744-751, 2006.
- MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; HOGG, T.; GIBBS, P. A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. **Food Microbiology**, v. 21, p. 213-216, 2004.
- MEREGHETTI, L.; QUENTIN, R.; MAEQUET-VAN DER MEE, N.; AUDURIER, A. *Low sensitivity of Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5083-5086, 2000.
- MERRIL, C. R.; BISWAS, B., CARLTON, R., JENSEN, N.C., CREED, G.J., ZULLO, S., et al. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 3188-3192, 1996.
- MODI, R.; HIRVI, Y., HILL, A., GRIFFITHS, M.W. Effect of phage on survival of *Salmonella* Enteritidis during manufacture and storage of Cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. **J. Food Prot.**, v. 64, p. 927-933, 2001.

- MOTTA, M. R. A.; BELMONTE, M. A.; PANETTA, J. C. Avaliação microbiológica de amostras carne moída comercializada em supermercados da região oeste de São Paulo. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 78/79, p. 59-62, 2000.
- MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.; KOBAYASHI, G. *Listeria*, *Erysipelothrix* e outros bacilos Gram positivos. In: \_\_\_ **Microbiologia médica**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 181-184.
- NASCIMENTO, M. G. F.; CULLOR, J. S. Listeriose Humana – Epidemiologia e fontes de contaminação. **Higiene Alimentar**, v. 8, n. 32, p. 13-17, 1994.
- NICOLAS, J. A.; ESPAZE, E.P.; CATIMEL, B.; VIDAUD, D.; ROCOURT, J.M.; COURTIEU, A. L. Isolation of *Listeria* from French meat products. **Int. Journal Med. Microbiol**, v. 27, p. 242-247, 1989.
- NUNES, I. A. **Bactérias do gênero *Listeria* em carcaças e cortes comerciais de frangos obtidos no varejo. Avaliação da eficiência de meios para isolamento e variantes da técnica**. 1994, 108 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 1994.
- O'FLYNN, G.; ROSS, R.P., FITZGERALD, G.F., COFFEY, A. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* 0157:H7. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, p. 3417-3421, 2004.
- PANDIRIPALLY, V. K.; WESTBROOK, D. G.; SUNKI, G. R.; BHUNIA, A, K. Surface protein p104 is involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to human intestinal cell line, Caco-2. **Journal Med. Microbiology**, v. 48, p. 117-124, 1999.
- PEARSON, L. J.; MARTH, E. H. *Listeria monocytogenes*: threat safe a food supply. **Journal Science Dairy**, v. 73, p. 912-928, 1980.
- PELCZAR, Jr.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia** – conceitos e aplicação. 1997. 2.ed. São Paulo: Makron, v. 1, 525 p.
- PEREIRA, M. L.; ROCOURT, J. *Listeria monocytogenes* – Uma revisão sobre Aspectos Taxonômicos, Importância médica e em alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 7, n. 26, p. 5-12, 1993.
- PHAN-THANH, L.; MAHOUIN, F.; ALIGÉ, S. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 55, p. 121-126, 2000.

PICHI, V.; RAMOS e SILVA, E.O.T.; SOUZA, S.L.P. et al. Isolamento e identificação de *Listeria* spp., em quartos dianteiros de bovinos desossados. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 63, p. 38-42, 1999.

POYART, C.; TRIEU-CUOT, P.; BERCHE, P. The *inlA* gene required for cell invasion is conserved and specific to *Listeria monocytogenes*. **Microbiology**, v. 142, p. 173-180, 1996.

PRANOTO, Y.; RAKSHIT, S. K.; SALOKHE, V. M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. **Lebensmittel Wissenschaft and Technologie (LWT)**, v. 38, p. 859-865, 2005.

QUIBERONI, A.; SUAREZ, V. B.; REINHEIMER, J. A. Inactivation of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages by thermal and chemical treatments. **J. Food Prot.**, v. 62, p. 894-898, 1999.

RIJPENS, N. P.; JANNES, J.; VAN ASBROECK, M.; HERMAN, L. M.; ROSSAU, R. Simultaneous detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by reverse hybridization with 16S-23Sr RNA spacer probe. **Molecular and Cellular Probes**, v. 9, p. 423-32, 1995.

ROCOURT, J. Risk factors for listeriosis. **Food Control.**, v. 7, n. A/5, p. 195-202, 1996.

ROCOURT, J. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy and identification. In: RYSER, E. T.; MARTH, E. H. (Eds.) **Listeria, listeriosis and food safety**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 1-20.

ROCOURT, J.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Eds.) **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM, 1997. p. 337-352.

RODGERS, S. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures – A Review. **Trends in Food Science; Technology**, v. 12, p. 276-284, 2001.

RØRVIK, L. M.; AASE, B.; ALVESTAD, T.; CAUGANT, D. A. Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in broilers and poultry products. **Letters in Applied Microbiology**, v. 94, n. 4, p. 633-640, 2003.

RYSER, E. T.; DONNELLY, C. W. *Listeria*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Eds.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. p. 343-363.

RYSER, E. T.; MARTH, E. H. **Listeria, listeriosis, and food safety**. New York: Marcel Dekker, 1991. 632 p.

SAMADPOUR, M.; BARBOUR, M. W.; NGUYEN, T.; CAO, T. M.; BUCK, F.; DEPAVIA, G. A.; MAZENGLIA, E.; YANG, P.; ALFI, D.; LOPES, M.; STOPFORTH, J. D. 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.

SAMPATHKUMAR, B.; XAVIER, I. L.; YU, L.S.L.; KHACHATOURIANS, G.G. Production of Listeriosyn O by *Listeria monocytogenes* (Scott A) under heat-shock conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 48, p.131-137, 1999.

SASAHARA, K. C.; ZOTTOLA, E. A. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 112, p. 1022-1028, 1993.

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

SCHUCHAT, A; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C.V. *Listeria monocytogenes* CAMP reaction. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 4, p. 396, 1991.

SCHWARTZ, M. Interaction of phages with their receptor proteins. In: RANDALL, L. L.; PHILIPSON, L. (Eds.). **Virus receptors, part 1**. Bacterial viruses. London: Chapman and Hall, 1980. p. 59-94.

SCHWARTZ, B.; HEXTER, D.; BROOME, C.V.; HIGHTOWER, A. W.; HIRSCHORN, R. B.; PORTER, J. D.; HAYES, B. S.; BIBB, W.F.; LORDER, B; FARIS, D.G. Investigation of an outbreak of listeriosis; new hypothesis for the etiology of epidemic *Listeria monocytogenes* infections. **J. Infect. Dis.**, v. 159, p. 680-685, 1989.

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

SEELIGER, H. P. R.; LANGER, B. Serological analysis of the genus *Listeria* its value and limitations. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 8, p. 245-248, 1989.

SHANK, F. R.; ELLIOT, E. L.; WACHSMUTH, I. K.; LOSIKOFF, M. E. US position on *Listeria monocytogenes* in foods. **Food Control**, v. 7, n. 4/5, p. 229-234, 1996.

SILVA, I. M. M. **Ocorrência de *Listeria* spp. em pontos críticos de controle e ambiente no processamento do queijo minas frescal.** 2001. 76 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Bahia, Salvador, 2001.

SILVA, M. C. C. **Ocorrência de *Listeria* spp. em embutidos cárneos artesanais comercializados no mercado varejista da cidade de Contagem-MG.** 1996. 76 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 1996.

SILVA, M.C.D.; TIBANA, A. *Listeria monocytogenes* em alimentos: seu significado nos dias atuais. **Higiene Alimentar**, v. 9, p. 7-10, 1995.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** 3.ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 552 p.

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

SINTON, L. W.; HALL, C.H., LYNCH, P.A., DAVIES-COLLEY, R.J. Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from water stabilization pond effluent in fresh and saline waters. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 1122-1131, 2002.

SKLAR, I. B.; JOERGER, R. D. Attempts to utilize bacteriophage to combat *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection in chickens. **J. Food Saf.**, v. 21, p. 15-29, 2001.

SLUTSKER, L.; SCHUCHAT, A. Listeriosis in humans. In: RYSER, E. T.; MARTH, E. H. (Eds.). **Listeria, listeriosis and food safety.** 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 75-96.

SOUSA, R. A.; FIGUEIREDO, E. A. T.; MAIA, G. A.; FRIZZO, S. E. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho artesanal, comercializado à temperatura ambiente, em Fortaleza, CE. **Higiene Alimentar**, v. 20, n. 138, p. 66-69, 2006.

STARBUCK, M. A. B.; HIL, P. T.; STEWART, G. S. A. B. Ultrasensitive detection of *L. monocytogenes* in milk by the polymerase chain reaction trans PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 15, p. 248-52, 1992.

SULAKVELIDZE, A.; BARROW, P. Phage therapy in animals and agribusiness. In: KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. (Eds.). **Bacteriophages: Biology and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2005. p. 335-380.

SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, J. G. J. Bacteriophage therapy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, p. 649-659, 2001.

SUMMERS, W. C. Bacteriophage therapy. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 55, p. 437-451, 2001.

SVABIC-VLAHOVIC, M.; PANTIC, D.; PAVICIC, M. Transmission of *Listeria monocytogenes* from mother's milk to her baby and to puppies. **Lancet**, v. 2, p. 1201, 1988.

TANJI, Y.; SHIMADA, T., YOICHI, M., MIYANAGA, K., HORI, K., UNNO, H. Toward rational control of *Escherichia coli* 0157:H7 by a phage cocktail. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 64, p. 270-274, 2004.

TODAR, K. **Listeria monocytogenes and listeriosis**. Todar's on line textbook of bacteriology. University of Wisconsin-Madison. Department of Bacteriology. 2003. Disponível em: <<http://textbookofbacteriology.net>>. Acesso em: 10 out. 2008.

UBOLDI EIROA, M. N. *Listeria monocytogenes* – características, ocorrência e desenvolvimento em alimentos. **ITAL.**, v. 20, n. 1, p. 13-22, 1990.

USDA/FSIS. **Isolation and identification of Listeria monocytogenes from red meat, poultry, egg and environmental samples**. In: United States Department of Agriculture (USDA)/Food Safety and Inspection Service (FSIS), Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 8.06, revised February 2005. Disponível em: <<http://www.fsis.usda.gov/>>. Acesso em: 10 out. 2008.

VAN der Mee-MARQUET, N., LOESSNER, M.J., AUDURIER, A. Evaluation of seven experimental phages for inclusion in the international phage set for the epidemiological typing of *Listeria monocytogenes*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 63, p. 3374–3377, 1997.

VIDAVER, A. K. Prospects for control of phytopathogenic bacteriophages by bacteriophages and bacteriocins. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 14, p. 451-465, 1976.

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.

- WARBURTON, D. W.; FARBER, J. M.; BABIUK, T. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. In: CANADA. Health and Welfare (Ed.). **Compendium of analytical methods**: laboratory procedures of microbiological analytical of foods. Ottawa: Poliscience, 1991.
- WEI, C. I.; COOK, D. L.; KIRK, J. R. Use of chlorine compounds in the food industry. **Food Technol.**, v. 39, p. 107-115, 1985.
- WEI, F-L.; TUNG, S-H., CORNELL, J.A., CHENG, M-L. CHENG, I-W. Bactericidal activity of aqueous chlorine and chlorine dioxide solutions in a fish model system. **J. Food Sci.**, v. 61, p. 1030-1034, 1996.
- WHICHARD, J. M.; SRIRANGANATHAN, N.; PIERSON, F. W. Suppression of *Salmonella* growth by wild-type and large-plaque variants of bacteriophage Felix O1 in liquid culture and on chicken frankfurters. **J. Food Prot.**, v. 66, p. 220-225, 2003.
- WHO. Working Group. Foodborne listeriosis. **Bull. WHO.**, v. 66, p. 421-428, 1988.
- WIGGINS, B. A.; ALEXANDER, M. Minimum bacterial density for bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 49, p. 19-23, 1985.
- WILKINSON, M. H. F. Predation and the presence of decoys: an inhibitory factor on pathogen control by bacteriophages or bdellovibrios in dense and diverse ecosystems. **J. Theor. Biol.**, v. 208, p. 27-36, 2001.
- WITHEY, S.; CARTMELL, E., AVERY, L.M., STEPHENSON, T. Bacteriophages potential for application in wastewater treatment processes. **Sci. Total Environ.**, v. 339, p. 1-18, 2004.
- WOMMACK, K. E.; HILL, R.T., MULLER, T.A., COLWELL, R.R. Effects of sunlight on bacteriophage viability and structure. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 1336-1341, 1996.
- 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.
- ZINK, D. L. The impact of consumer demands and trends on food processing. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p. 467-469, 1997.

## CAPÍTULO 2

### INVESTIGAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* EM LINGUIÇAS DO TIPO FRESCAL VENDIDAS A VAREJO NO MUNICÍPIO DE SALVADOR-BA

#### RESUMO

A partir da década de 1980, o aumento de surtos de listeriose humana e a possível relação com alimentos contaminados vêm preocupando as autoridades sanitárias. No Brasil não existe ainda descrição de surtos de listeriose de origem alimentar, porém em diversos trabalhos é relatada a presença de *Listeria monocytogenes* em vários produtos. Alimentos manipulados intensamente, como as linguiças do tipo frescal, são frequentemente responsáveis pelas doenças veiculadas por alimentos. Em razão do risco à saúde pública que esta bactéria representa, objetivou-se investigar a presença de *Listeria* spp., em especial de *L. monocytogenes*, em linguiças do tipo frescal suína e de frango de cinco marcas diferentes, vendidas em estabelecimentos comerciais da cidade de Salvador-BA. Foram analisadas 80 amostras, sendo 40 de linguiça elaborada com carne suína e 40 com carne de frango. Isolou-se *Listeria* spp. em 12 amostras (15%), das quais três (3,75%) foram positivas para *L. monocytogenes*. Entre as espécies, *L. innocua* foi isolada com maior frequência, em 11 (13,75%) amostras; e em duas amostras foram detectadas as duas espécies. As cepas de *L. monocytogenes* isoladas pertenciam ao sorotipo 1/2a. A presença desse microrganismo de características patogênicas no produto final demonstra a necessidade de readequação e implementação de boas práticas de fabricação no recebimento da matéria-prima, utilização de métodos adequados de limpeza e sanitização do ambiente e de equipamentos e no processamento desses produtos, evitando assim, risco potencial de listeriose e contribuindo para a segurança alimentar do consumidor.

**Palavras-chave:** *Listeria monocytogenes*, linguiça, listeriose, alimento seguro.

## ABSTRACT

Since the 1980s, increase in outbreaks of human listeriosis and its possible relation to contaminated food has been a concern of sanitary authorities. In Brazil, food-borne listeriosis outbreak has not been yet described, but in many studies, the presence of *Listeria monocytogenes* has been described in several products. Intensively manipulated foods, such as Brazilian fresh sausage (“linguiça do tipo frescal”) are frequently responsible for food-borne diseases. Due to the risk presented by the bacteria *Listeria monocytogenes*, the objective of this work was to investigate the presence of *Listeria* spp., especially, *L. monocytogenes*, in swine and chicken Brazilian fresh sausage of five brands, sold in commercial establishments in the city of Salvador-BA. Eighty samples were analyzed, 40 each of swine and chicken Brazilian fresh sausage. *Listeria* spp. was isolated from 12 samples (15%), of which three (3.75%) were positive for *L. monocytogenes*. Among the species, *L. innocua* was isolated with higher frequency in 11 samples (13.75%); the two species were detected in two samples. *L. monocytogenes* strains isolated belonged to serotype 1/2a. The presence of this microorganism of pathogenic characteristics in the final product demonstrates the necessity of redefining and implementing good manufacturing practices in raw material acquisition, utilization of adequate cleaning methods, and sanitization of the ambient, equipment, and product processing, thus avoiding potential risk of listeriosis and contributing to consumer food safety.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, Brazilian fresh sausage, listeriosis, food safety.

## 1 INTRODUÇÃO

*L. monocytogenes* é uma bactéria amplamente distribuída na natureza, frequentemente encontrada em produtos cárneos. Devido a essa ampla distribuição no meio ambiente, à habilidade de sobreviver em condições adversas, à resistência a diversos antibióticos e à capacidade de se multiplicar em temperaturas de refrigeração, esse microrganismo tornou-se um importante patógeno oportunista de origem alimentar, podendo infectar qualquer pessoa. Porém, manifestações da doença são mais comuns em humanos com o sistema imune comprometido. A listeriose é uma infecção alimentar atípica que apresenta alta taxa de letalidade e período de incubação longo (ROCOURT; COSSART, 1997). Embora esse microrganismo tenha sido reconhecido há mais de 70 anos como isolado clínico, a literatura é silenciosa quanto à sua presença em carne e produtos cárneos, com exceção dos últimos 10 anos (JAY, 1996).

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

A carne e seus derivados incluem-se entre os alimentos que mais preocupam os serviços de saúde pública, em razão dos riscos que oferecem pela contaminação com uma grande variedade de bactérias patogênicas. As linguiças do tipo frescal apresentam-se como excelentes substratos para o desenvolvimento de microrganismos, devido a uma série de fatores favoráveis, como pH pouco ácido, alta atividade de água, mistura de diferentes tipos de ingredientes, não submissão a tratamento térmico e intenso manuseio durante seu processamento, aumentando a probabilidade de contaminação com microrganismos indesejáveis (LISERRE et al., 2002; MARTINIS; FRANCO, 1998; SAMELIS et al., 2005).

A produção de embutidos exige ampla variedade de ingredientes cárneos e não-cárneos, cada um exercendo função específica de acordo com suas

propriedades. Os ingredientes cárneos podem ter diversas origens e composições, influenciando assim a qualidade do produto final (STOCCO; STOLBERG, 2008).

Em torno de 65% do total da produção brasileira de carne suína destina-se ao mercado interno, na forma de produtos industrializados; as linguiças representam 42% do mercado de industrializados de carne, e o segmento das linguiças frescas, que é o mais importante da categoria, 60% do mercado total de linguiças (ABIPECS, 2006). Entre os produtos processados, a linguiça fresca do tipo toscana (constituída exclusivamente de carne suína) representa alternativa para o aproveitamento de cortes suínos menos nobres, em razão do baixo custo de produção e de grande aceitação pelo mercado consumidor (STOCCO; STOLBERG, 2008).

Embutidos, como linguiças, são definidos como alimentos condimentados contidos em envoltório natural ou artificial, cuja elaboração emprega carne de bovinos, suínos ou aves, bem como suas vísceras, podendo ser cozido ou não, curado, maturado e dessecado (BRASIL, 2001; CHAVES et al., 2000). No Brasil, a linguiça é um dos produtos cárneos mais fabricados, provavelmente porque sua elaboração, além de não exigir tecnologia sofisticada, utiliza poucos equipamentos e é de baixo custo (VAZ, 2005).

A linguiça, por ser um produto fresco, não sofre tratamento térmico que reduza a sua microbiota, e a grande quantidade de água livre (alta atividade de água) confere ao produto uma vida útil curta, apesar da utilização do frio na sua conservação (TERRA, 2000).

A intensa manipulação a que se submete a linguiça na cadeia de processamento eleva as possibilidades de contaminação por uma gama de espécies de microrganismos, patogênicos ou deterioradores, podendo comprometer a qualidade microbiológica do produto final, desde que ocorram falhas e não-conformidades em seu processamento. Diversas podem ser as fontes de introdução desses agentes na cadeia alimentar, como condições inadequadas de abate e evisceração, nas quais as carcaças podem ser contaminadas por enterobactérias presentes no trato gastrointestinal (BORCH et al., 1996; TUTENEL et al., 2003). Dessa forma, a qualidade do produto elaborado reflete de forma clara a qualidade da matéria-prima e dos ingredientes empregados na produção (MAURIELLO et al., 2004; MOROT-BIZOT et al., 2006). Além desses aspectos, o colaborador envolvido na produção, bem como os facilitadores, como equipamentos e utensílios, podem constituir importantes fontes de contaminação (CHEVALLIER et al., 2006).

Para que os produtos embutidos mantenham suas propriedades funcionais e permaneçam seguros para o consumidor, o acondicionamento deve ser feito pelo emprego de envoltórios adequados (PARDI et al., 1996; CORETTI, 1997). De acordo com Vaz (2005), produtos embalados em envoltórios naturais podem deteriorar-se devido o desenvolvimento de microrganismos entre a tripa e a massa, e ao acúmulo de umidade na interface durante o processo.

Na legislação brasileira, os produtos cárneos comercializados no país estão regulamentados pela Portaria nº 1002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 1998). Não se observa na legislação vigente um limite específico para *L. monocytogenes*, porém, de acordo com a Resolução RDC nº 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.”

No Brasil, não foram ainda descritos surtos de listeriose causados por alimentos (NASCIMENTO; CULLOR, 1994), embora diversas pesquisas relatem a presença do microrganismo em alimentos. Já em outros países, ainda que a carne e os produtos cárneos não tenham sido indicados como as principais causas de listeriose humana, existem vários trabalhos sobre a ocorrência de *Listeria monocytogenes* nesses alimentos (BENEZET et al., 1993; GENIGEORGIS et al., 1989; GRAU; VANDERLINDE, 1992; JOHNSON et al., 1990; VORSTER et al., 1993; WONG et al., 1990).

Destro et al. (1991) pesquisaram a incidência desse patógeno em carne, linguiça, salsicha, leite *in natura* e queijo tipo “minas frescal”, encontrando uma incidência média de 32%; as amostras de linguiça foram as que apresentaram maior incidência do microrganismo (80%). Sireli e Erol (1999) examinaram 100 amostras de carne moída em Ankara, Turquia, quanto à presença e ao grau de contaminação com *Listeria* spp. Diferentes espécies de *Listeria* foram isoladas de 97% das amostras. *L. innocua* foi a espécie prevalente (92%), seguida por *L. monocytogenes* (28%), *L. grayi* (9%), *L. seeligeri* (3%) e *L. welshimeri* (2%). Esses 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. Uma vez que as linguiças empregam

em sua elaboração carne bovina, suína ou de aves (BRASIL, 2001), esse produto, de grande aceitação em todo o território nacional, pode representar um grave risco ao consumidor.

Os objetivos deste trabalho foram investigar a ocorrência de bactérias do gênero *Listeria* em linguiças do tipo frescal suína e de frango comercializadas no varejo em Salvador-BA e identificar sorologicamente as espécies isoladas.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Microrganismo de referência**

*L. monocytogenes* SCOTT A (sorotipo 4b), ATCC 15313

#### **2.1.2 Alimentos**

Linguiça tipo frescal preparada com carne suína,  
Linguiça tipo frescal preparada com carne de frango.

### **2.2 Metodologia**

#### **2.2.1 Desenho e local do estudo**

Trata-se de um estudo transversal de caráter exploratório e experimental que foi desenvolvido no Laboratório de Controle de Qualidade dos Alimentos da Escola de Nutrição da Universidade Federal da Bahia e no Laboratório de Zoonoses do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro-RJ.

### 2.2.2 Amostragem

No período de março a outubro de 2008, foram adquiridas 80 amostras de linguiças do tipo frescal de estabelecimentos comerciais e supermercados, da cidade de Salvador-BA, nas condições oferecidas ao consumo, ou seja, resfriadas e acondicionadas em bandejas de isopor. Dessas, 40 amostras eram linguiças preparadas com carne suína de quatro marcas diferentes, que foram codificadas como A, B, C e D, todas elas inspecionadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF). As outras 40 amostras eram linguiças preparadas com carne de frango, das mesmas marcas (A, B e C) mencionadas, e uma da marca E, sob inspeção do Serviço de Inspeção Estadual (SIE) (Tabela 1).

Foram realizadas duas coletas para cada tipo de produto, sendo que em cada coleta foram adquiridas cinco amostras do produto, (n=5), pertencentes à mesma data de fabricação, seguindo recomendação do ICMSF (2000).

Tabela 1 - Amostras de linguiças investigadas para a presença de *Listeria* spp.

Marcas	Linguiça suína		Linguiça de frango	
	1ª coleta	2ª coleta	1ª coleta	2ª coleta
A	5	5	5	5
B	5	5	5	5
C	5	5	5	5
D	5	5	*	*
E	**	**	5	5
<b>Total</b>	20	20	20	20

\* A marca não produz linguiça de frango do tipo frescal. \*\* A marca não produz linguiça suína do tipo frescal.

### 2.2.3 Tratamento das amostras

As amostras foram transportadas para o Laboratório de Controle de Qualidade dos Alimentos da Escola de Nutrição da Universidade Federal da Bahia, em recipientes isotérmicos com gelo reciclável, mantidas sob refrigeração a 4 °C e analisadas dentro de no máximo quatro horas.

O envoltório dos embutidos cárneos foi retirado assepticamente em capela de fluxo laminar tipo II (LABCONCO), e a massa do produto foi transferida, com auxílio de garfos e facas estéreis, para placas de Petri estéreis para serem posteriormente pesadas.

#### **2.2.4 Investigação da presença de *Listeria monocytogenes***

A determinação da presença de *L. monocytogenes* foi realizada de acordo com metodologia descrita e recomendada pelo United States Department of Agriculture (USDA), descrita no capítulo 8.04 do *Microbiology Laboratory Guidebook* (USDA/FSIS, 2005) para carnes vermelhas, aves, ovos e amostras ambientais.

Vinte e cinco gramas de cada amostra foram misturados a 225 mL de caldo Universidade de Vermont (UVM) (DIFCO), em homogeneizador peristáltico (ITR), por 2 min, incubando-se a mistura a  $30 \pm 2$  °C por  $22 \pm 2$  horas, em incubadora tipo B.O.D. (BIOPAR), sob condições normais de atmosfera, para o enriquecimento primário. A seguir,  $0,1 \pm 0,02$  mL do inóculo foi transferido para tubos contendo  $10 \pm 0,5$  mL de caldo Fraser (DIFCO) para o enriquecimento seletivo secundário, seguindo-se a incubação a  $35 \pm 2$  °C por  $24-48 \pm 2$  horas. A partir dos tubos do caldo Fraser que apresentaram escurecimento (redução da esculina), foi inoculado 0,1 mL em ágar Oxford Modificado (MOX) (DIFCO), seguido de incubação a  $35 \pm 2$  °C por  $22 \pm 2$  horas. Tanto o caldo Fraser como o MOX possuem, em sua formulação, esculina e citrato férrico amoniacal, que atuam como indicadores no isolamento e diferenciação da *Listeria*.

Vinte colônias típicas de cada placa (ou número de colônias típicas presentes, se menor que vinte) foram selecionadas e cultivadas por picada para o teste de verificação de hemólise. O teste de hemólise foi realizado em ágar sangue de carneiro (SILVA et al., 2007) em sobrecamada com incubação a  $35 \pm 2$  °C por  $22 \pm 4$  horas. A observação de uma zona clara ao redor da perfuração é uma indicação da ação beta-hemolítica do microrganismo, quando presente. Concomitantemente, foram preparados esfregaços em lâmina e corados pelo método de Gram para verificação das características morfotintoriais das bactérias (bastonetes Gram-positivos pequenos e curtos, em cadeias curtas, paralelamente ou em forma de “V”) visualizadas em microscópio óptico (BIOVAL).

Colônias típicas translúcidas com um pequeno halo de  $\alpha$ -hemólise e positivas para o teste de Gram foram transferidas para um tubo de caldo tripticase de soja com 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE) (DIFCO), para o teste de motilidade, sob incubação entre 18 e 25 °C, por 16 a 18 horas. Para as demais provas bioquímicas foi utilizado um tubo de ágar tripticase de soja com 0,6% de Extrato de Levedura (TSA-YE) (DIFCO), sob incubação a  $35 \pm 2$  °C por  $22 \pm 4$  horas.

### 2.2.5 Provas bioquímicas

A confirmação do gênero e a distinção entre as espécies foram realizadas através dos testes da produção de catalase, do teste de motilidade e da fermentação dos carboidratos manitol, maltose, xilose, e ramnose (Quadro 1).

Produção de catalase: sobre os cultivos crescidos em placas de ágar tripticase de soja com 0,6% de extrato de levedura, incubadas a 30 °C por 24 horas, foi adicionado, com o auxílio de uma pipeta, gotas de água oxigenada a 3% (NUCLEAR). O teste é positivo quando ocorre efervescência sobre o crescimento bacteriano. As cepas de *Listeria* são catalase positivas.

Teste de motilidade: a partir do TSB-YE, foi inoculada cada cultura suspeita em tubos de ágar Sulfeto Indol Motilidade (SIM) (DIFCO), por picada no centro do meio de cultura, até uma distância de 1 cm do fundo. Os tubos foram incubados a 25 °C por sete dias, observando-os diariamente.

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

Característica	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. welshmeri</i>
Catalase	+	+	+	+	+	+
β-hemólise	+	+	+	-	-	-
Ácido a partir de manitol	-	-	-	-	+	-
Ácido a partir de D-xilose	-	+	+	-	-	+
Ácido a partir de L-ramnose	+	-	-	+/-	-	+/-
Ácido a partir de α-metil-D-manosídeo	+	-	-	+	ND*	+

\* ND = não determinado.

Fonte: Ryser e Donnelly (2001) e Holt et al (1994).

Fermentação de carboidratos: utilizou-se como meio o caldo-base para carboidratos com púrpura de bromocresol (SILVA et al., 2007). As soluções dos carboidratos maltose (VETEC), manitol (SYNTH), xilose (VETEC), e ramnose (INLAB), esterilizadas por filtração em membrana de 0,45 μm (SARTORIUS), foram adicionadas ao meio-base estéril. As provas são consideradas positivas quando ocorre a viragem do indicador púrpura de bromocresol e a coloração do meio, originalmente púrpura, torna-se amarela devido à produção de ácido.

Durante todas as etapas de isolamento e confirmação bioquímica para o microrganismo foi utilizado como padrão positivo uma cepa de *L. monocytogenes* SCOTT A.

Para confirmação complementar das provas bioquímicas, foi utilizado o sistema comercial de identificação API *Listeria* (BioMerieux® S.A., Marcy L'Etoile, França), somente para as amostras previamente consideradas positivas para *Listeria monocytogenes*.

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

Para identificação sorológica das espécies de *Listeria* isoladas, as cepas foram enviadas ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro-RJ. Essa técnica baseou-se na aglutinação "O" e "H", conforme recomendações de Donker-Voet (1959) e Seeliger e Hohne (1979).

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Caracterização fenotípica e bioquímica dos isolados para identificação de *L. monocytogenes***

Foram coletadas 20 colônias típicas crescidas em meio MOX presentes em 80 amostras, totalizando 1.600 isolados. Após realização dos testes de Gram, catalase e  $\beta$ -hemólise, restaram 277 isolados para a realização dos testes de fermentação de carboidratos. Desses, 19 isolados foram identificados como *Listeria* spp., que foram posteriormente submetidos à caracterização antigênica, cujos resultados se encontram na Tabela 2.

Pode-se observar que todos os isolados foram Gram-positivo, catalase positivo e apresentaram arranjos na forma bacilar e cocobacilar. Os isolados 2, 3, 4, 5, 6, 12, 13 e 17 foram positivos no teste da  $\alpha$ -hemólise. Os demais apresentaram um halo de hemólise muito pequeno e pouco nítido, indicando um resultado fracamente positivo para o teste. Com relação ao perfil de fermentação dos

carboidratos, pode-se observar que todos os isolados foram negativos para a produção de ácido a partir do manitol e da xilose. No tocante à produção de ácido a partir da fermentação de maltose, todos os isolados foram positivos. Os isolados 2, 3, 4, 5, 6, 12, 13 e 17, fermentaram a ramnose, enquanto os demais isolados não fermentaram este carboidrato. A utilização do sistema comercial de identificação API *Listeria* possibilitou a confirmação de quatro cepas de *L. monocytogenes* e 15 de *L. innocua*; em duas amostras de linguiça foram encontradas as duas espécies de *Listeria*.

Assim, das 80 amostras analisadas, 12 (15%) apresentaram contaminação por *Listeria* spp., sendo três (3,75%) positivas para *L. monocytogenes* conforme é mostrado na Tabela 3.

Tabela 2 – Características fenotípicas e bioquímicas dos isolados.

Característica	Isolados	
	1, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 18, 19	2, 3, 4, 5, 6, 12, 13, 17
Gram	+	+
Arranjo	Bacilo e cocobacilo	Bacilo e cocobacilo
Catalase	+	+
$\beta$ -hemólise	+/-	+
Ácido a partir de Manitol	-	-
Ácido a partir de Xilose	-	-
Ácido a partir de Ramnose	-	+
Ácido a partir de Maltose	+	+

Tabela 3 – Presença de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* nas amostras de linguiça

Marcas	Amostras de linguiça suína		Amostras de linguiça de frango	
A	1- <i>Listeria</i> spp./ <i>L. monocytogenes</i>	6-	1-	6-
	2-	7- <i>Listeria</i> spp.	2-	7-
	3-	8-	3-	8- <i>Listeria</i> spp.
	4-	9-	4-	9-
	5- <i>Listeria</i> spp.	10-	5-	10-
B	1-	6-	1- <i>Listeria</i> spp.	6-
	2-	7-	2- <i>Listeria</i> spp.	7-
	3-	8-	3- <i>Listeria</i> spp.	8-
	4-	9-	4-	9-
	5-	10-	5-	10-
C	1-	6-	1- <i>Listeria</i> spp./ <i>L. monocytogenes</i>	6-
	2-	7-	2-	7-
	3-	8-	3-	8-
	4-	9-	4-	9-
	5-	10-	5-	10- <i>Listeria</i> spp./ <i>L. monocytogenes</i>
D	1-	6-	NA	
	2- <i>Listeria</i> spp.	7-		
	3- <i>Listeria</i> spp.	8-		
	4-	9-		
	5- <i>Listeria</i> spp.	10-		
E	NA		1-	6-
			2-	7-
			3-	8-
			4-	9-
			5-	10-

NA – não-aplicável.

Com relação ao tipo de produto, foi encontrada *Listeria* spp. em três marcas comerciais diferentes da linguiça de frango, marcas A, B e C, enquanto que para a linguiça suína a presença do microrganismo ocorreu em duas marcas distintas: A e D (Tabela 3). Apenas a marca E, a única com distribuição somente no estado da Bahia, não apresentou contaminação por *Listeria* spp.

Com relação ao lote, indentificado pela mesma data de fabricação na embalagem, observou-se que, entre as cinco amostras de linguiça suína da marca D, pertencentes ao mesmo lote de fabricação, (n=5), três estavam contaminadas por *Listeria* spp. O mesmo ocorreu com um lote das amostras de linguiça de frango da marca B. Já em um mesmo lote das amostras de linguiça suína da marca A, entre as cinco coletadas, apenas duas amostras apresentaram *Listeria* spp. Esses resultados demonstram que a presença do microrganismo em um lote de amostras não necessariamente implica que o lote inteiro esteja contaminado.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram níveis de isolamento de *L. monocytogenes* inferiores aos relatados por Silva (1996), que encontrou *L. monocytogenes* em 6,6% das amostras de linguiças do tipo frescal de carne suína e de frango, em Contagem-MG.

Em trabalho realizado por Lima et al. (2003), investigando 106 amostras de cinco tipos diferentes de linguiças (de carne suína, de carne de frango, tipo calabresa, mista e tipo toscana), também foi verificado valores superiores aos desta pesquisa, tendo sido a *Listeria* spp. isolada em 62 amostras (58,5%) e *L. monocytogenes* em 11 (10,4%). Segundo esses autores, a maior ocorrência de *L. monocytogenes* foi observada em linguiça de carne de frango (18,2%).

Entretanto, os resultados desta pesquisa são similares ao reportado por Samadpour et al. (2006), em que, de um total de 512 amostras de carne moída analisadas através da metodologia da Reação da Polimerase em Cadeia - PCR, seguida pela confirmação da cultura, 18 (3,5%) foram positivas para *L. monocytogenes*.

Mantilla et al. (2007) analisaram 30 amostras de carne bovina moída, das quais 15 (50%) apresentaram contaminação por *Listeria* spp., sendo duas (6,7%) positivas para *L. monocytogenes*.

Na investigação de salames fatiados embalados a vácuo, comercializados na cidade de São Paulo, Sakate et al. (2003) detectaram *L. monocytogenes* em 3 (6,7%) das 45 amostras analisadas.

Silva et al. (2004) estudaram a presença de *L. monocytogenes* em plantas de processamento de linguiças mistas do tipo frescal, nas matérias-primas e no produto final, na região de Pelotas, RS. *Listeria* spp. foi observada em 100% das amostras analisadas e 29,3% destas foram identificadas como *L. monocytogenes*; 16,6% das amostras positivas para o patógeno correspondiam ao produto final.

Destro et al. (1991) também evidenciaram uma maior ocorrência de *L. monocytogenes* (32%) em diferentes alimentos, como carne, linguiça, salsicha, leite *in natura* e queijo tipo “minas frescal”. Quanto às linguiças, 80% das amostras foram positivas para o microrganismo.

De 63 amostras de carcaças de frango analisadas em Portugal, todas apresentaram contaminação com *Listeria* spp., sendo 26 amostras (41%) positivas para *L. monocytogenes* (ANTUNES et al., 2002).

Bersot et al. (2001) analisaram 30 amostras de mortadela, das quais 11 (36,7%) foram positivas para *Listeria* spp. e oito (26,7%) para *L. monocytogenes*.

Outros resultados são relatados na literatura, como os de Yucel et al. (2004), que isolaram 8,25% de *L. monocytogenes* a partir de carne bovina, moída e inteira, e de carne de frango, e os apresentados por Fantelli e Stephan (2001), os quais encontraram o microrganismo em 10,75% de carnes moídas bovinas e suínas. No entanto, Sireli e Erol (1999) isolaram um maior número de *L. monocytogenes* de carnes bovinas moídas (28%). Kasnowski (2004) também encontrou alto percentual (30,1%) de cepas de *L. monocytogenes* em carnes bovinas, inteiras e moídas.

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

Foram isoladas 19 cepas de *Listeria* spp., sendo quatro pertencentes a *L. monocytogenes* e 15 a *L. innocua*. A relação do número de cepas dos diferentes sorotipos isolados está disposta na Tabela 4.

Tabela 4 – Sorotipos de *Listeria* spp. isolados das amostras de linguiças.

<b>Espécie</b>	<b>Sorotipos</b>	<b>Nº de cepas</b>	<b>(%)</b>
<i>L. innocua</i>	6a	14	(73,68)
	Não-tipável	1	(5,26)
<i>L. monocytogenes</i>	½a	4	(21,06)
<b>Total</b>		<b>19</b>	

De acordo com o apresentado na Tabela 4, observa-se que quatro isolados (21,06%) obtiveram caracterização antigênica como *L. monocytogenes* ½a; 14 (73,68%) foram caracterizados como *L. innocua* 6a e um (5,26%) não tipável.

O sorovar ½a isolado nesta pesquisa também foi encontrado por Silva (1996), que isolou das amostras de linguiça tipo frescal os sorotipos ½a, ½b e 4b. No estudo realizado por Sakate et al. (2003) com salames, todas as cepas isoladas pertenciam ao sorogrupo 1, sendo duas ½a e uma ½b. Esse dado é preocupante, pois, de acordo com Ryser e Marth (1999), a maioria (>95%) dos casos de listeriose humana é provocada por cepas de *L. monocytogenes* pertencentes aos sorotipos ½a, ½b ou 4b.

Com base na literatura científica, observa-se uma diferença de distribuição dos sorotipos de *L. monocytogenes* de acordo com o produto analisado. Fantelli e Stephan (2001), que isolaram 43 cepas de *L. monocytogenes* em carne moída, verificaram que 19 cepas pertenciam ao sorotipo 1/2a, duas ao sorotipo 1/2b, doze ao sorotipo 1/2c e dez ao sorotipo 4b.

Araújo et al. (2002) encontraram 52 cepas de *L. monocytogenes* em amostras de “blanquet” e presunto de peru, sendo 51,9, 34,6, 7,7 e 5,8% pertencentes aos sorotipos 4b, 1/2c, 1/2b e 1/2a, respectivamente.

A falta de atenção à saúde pública é um dos principais fatores que levam à dispersão bacteriana em diversos *habitat*. Neste sentido, cabe ressaltar que Hofer et al., em 1984, verificaram a predominância dos sorotipos 4b, 4a e 1/2a em processos infecciosos e portadores humanos e no mesmo ano, isolaram os sorotipos 1/2b (46,87%), 4b (25%) e 1/2a (18,75%) de amostras de solo (HOFER; PÓVOA, 1984). Portanto, o sorotipo 1/2a isolado nas amostras de linguiça frescal suína e de frango encontradas neste trabalho possui importância epidemiológica diante da possível presença em processos infecciosos humanos e contaminação do meio ambiente.

A maior ocorrência de *L. innocua*, comparando com a de *L. monocytogenes*, em produtos alimentícios vem sendo relatada por muitos pesquisadores. Neste trabalho, somente duas espécies do gênero *Listeria* foram detectadas, *L. innocua*, isolada em maior porcentagem (78,95%) e *L. monocytogenes* (21,05%). Yucel et al. (2004) obtiveram resultados similares isolando 90% de *L. innocua* em carnes bovinas (moídas e inteiras) e de frango. Sireli e Erol (1999) também encontraram elevada ocorrência de *L. innocua* (92%) em carne moída, seguida por *L. monocytogenes* (28%) e por outras espécies do gênero *Listeria* (24%).

Os resultados de Kasnowski (2004) também corroboram os resultados observados neste experimento, visto que o autor isolou 70% de *L. innocua* a partir de carnes bovinas inteiras e moídas. Em trabalho mais recente de Yucel et al. (2005) foi verificada a presença de *L. innocua* em maior número nas amostras (46,57%) comparando-se com *L. monocytogenes*, que foi isolada em apenas 6,16% das amostras de carne bovina e de frango analisadas.

Mantilla et al. (2007) isolaram 83 cepas de *Listeria* spp. em amostras de carne moída em Niterói-RJ. Destas, 77 eram *L. innocua*, sendo 66 do sorotipo 6a, sete do sorotipo 6b e quatro não-tipáveis. Os outros seis isolados eram *L. monocytogenes*, sendo três pertencentes ao sorotipo 4b e três ao sorotipo 1/2c. Kasnowski (2004)

isolou um total de 173 cepas de *Listeria* spp. de amostras de carne bovina (alcatra), das quais, 72 (41,62%) foram originadas da carne inteira e 101 (58,38%) da carne moída. A espécie mais isolada foi *Listeria innocua* 6a, totalizando 91 cepas, seguida de *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.

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 exibe a maioria das características da *L. monocytogenes*, com exceção da não-produção de hemolisina e da característica avirulenta. Essa proposição é confirmada por Guerra e Bernardo (1999), que sugerem a competição de *L. innocua* com *L. monocytogenes*; em que a primeira, multiplicando-se mais rapidamente, pode induzir a resultados falsos negativos na pesquisa de *L. monocytogenes*.

#### 4 CONCLUSÃO

Diante dos resultados alcançados neste estudo, pode-se concluir que:

- A presença de *L. monocytogenes* nas amostras investigadas é um dado preocupante, considerando a possibilidade de o microrganismo aderir a equipamentos e utensílios da indústria de alimentos e ser transferido para outros tipos de produtos prontos para o consumo.

- Algumas das amostras investigadas podem ser consideradas impróprias para o consumo, por veicularem um patógeno causador de enfermidades transmitidas por alimentos e levando em conta o risco de serem consumidas mal cozidas.

- *L. innocua* foi isolada em maior frequência das amostras, comprovando a maior facilidade dessa espécie em sobreviver às condições adversas do processamento de um produto cárneo.

- O sorotipo 1/2a de *L. monocytogenes* isolado é um dos mais comumente associados a surtos de listeriose de origem alimentar, confirmando, portanto, a veiculação do patógeno pelo alimento.

## REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA –ABIPECS. **Suinocultura brasileira**. São Paulo, 2006. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br/>>. Acesso em: 2 set. 2008.

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.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; CARVALHO, J. C. A. P. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em produtos de carne de peru comercializados na cidade de Niterói-RJ – Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 30, p. 19-25, 2002.

BENEZET, A.; De La OSA, J.M., BOTAS, M., OLMO, N., FLOREZ, F.P. Investigación de *Listeria monocytogenes* em productos carnicos. **Industria Alimentaria**, v. 247, p. 19-23, 1993.

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.

BORCH, E.; NESBAKKEN, T.; CHRISTENSEN, H. Hazard identification in swine slaughter with respect to food borne bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, n. 1/2, p. 9-25, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 7-E, 10 jan. 2001.

BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Portaria nº 1002, de 11 de Dezembro de 1998. Lista os produtos, comercializados no país, enquadrando-se na categoria carnes e produtos cárneos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov/>>. Acesso em: 3 out. 2008.

CHAVES, G. M. C. et al. Avaliação bacteriológica de linguiça frescal suína comercializada no município do Rio de Janeiro, RJ. **Revista Higiene Alimentar**, v. 14, n. 13, p. 48-52, 2000.

CHEVALLIER, I.; AMMOR, S.; LAGUET, A.; LABAYLE, S.; CASTANET, V.; DUFOUR, E.; TALON, R. Microbial ecology of a small-scale facility producing traditional dry sausage. **Food Control**, [S.l.], v. 17, n. 6, p. 446-453, 2006.

CORETTI, K. O desenvolvimento da indústria de tripas. **Revista Nacional da Carne**, n. 245, p. 49, 1997.

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

DESTRO, M. T.; KABUKI, D. Y.; SERRANO, A. M. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, v. 2, p. 110-112, 1991.

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.

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

GENIGEORGIS C. A.; DUTULESCU D.; GARAYZABAL J. F. Prevalence of *Listeria* spp. in poultry meat at the supermarket and slaughterhouse level. **Journal of Food Protection**, v. 52, p. 618-624, 1989.

GRAU F. H.; VANDERLINDE P. B. Ocurrência, Numbers, and Growth of *Listeria monocytogenes* on some Vacuum-Packaged Processed Meats. **Journal of Food Protection**, v. 55, p. 4-7, 1992.

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

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

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

HOLT, J.G. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams; Wilkins, 1994. 787p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS – ICMSF. **Microorganismos de los alimentos: su significado y metodos de emuneración.** 2.ed. Zaragoza: Acribia, 2000. 367 p.

JAY, J. M. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. **Food Control**, v. 7, n. 4/5, p. 209-214, 1996.

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

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.** 2004. 110 f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2004.

LIMA, A. T. F.; ROSSINI, E. M. M.; POMPERMAYER, D. M. C. Incidência de *Listeria* sp. e *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22., 2003, Florianópolis. **Resumos.** Florianópolis: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003.

LISERRE, A. M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* Strain in modified atmosphere-packaged Brazilian sausage. **Meat Science**, v. 61, p. 449-455, 2002.

MANTILLA, S. P. S.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; SANTOS, E. B.; GOUVÊA, R. Ocorrência de *Listeria* spp. em amostras de carne bovina moída comercializadas no município de Niterói, RJ, Brasil. **Ciências Agrotécnicas**, v. 31, n. 4, p. 1225-1230, 2007.

MARTINIS, E. C. P.; FRANCO, B. D. G. M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. **International Journal of Microbiology**, v. 42, p. 119-126, 1998.

MAURIELLO, G.; CASABURI, A.; BLAIOTTA, G.; VILLANI, F. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. **Meat Science**, v. 67, n. 1, p. 149-158, 2004.

MOROT-BIZOT, S. C.; LEROY, S.; TALON, R. Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, n. 2, p. 210-210, 2006.

NASCIMENTO M. G. F.; CULLOR J. S. Listeriose Humana - Epidemiologia e fontes de contaminação. **Higiene Alimentar**, v. 8, p. 13-17, 1994.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. Niterói, Goiânia: Editora da UFG, 1996. 109 p.

ROCOURT, J.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Eds.). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM, 1997. p. 337-352.

RYSER, E. T.; DONNELLY, C. W. *Listeria*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Eds.), **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 4.ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Chapter 36, p. 343-356.

RYSER E. T.; MARTH E. H. **Listeria, listeriosis and food safety**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1999.

SAKATE, R. I.; ARAGON, L. C.; RAGHIANTE, F.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M.; DESTRO, M. T. Quantificação de *Listeria monocytogenes* em salames fatiados embalados à vácuo. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN)**, v. 53, n. 2, p. 184-187, 2003.

SAMADPOUR, M.; BARBOUR, M. W.; NGUYEN, T.; CAO, T. M.; BUCK, F.; DEPAVIA, G. A.; MAZENGA, E.; YANG, P.; ALFI, D.; LOPES, M.; STOPFORTH, J. D. 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.; BEDIE, G. K.; SOFOS, J. N.; BELK, K. E.; SCANGA, J. A.; SMITH, G, C. Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4 °C in vacuum packages. **Lebensmittel Wissenschaft and Technologie (LWT)**, v. 38, p. 21-28, 2005.

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

SILVA, M. C. C. **Ocorrência de *Listeria* spp. em embutidos cárneos artesanais comercializados no mercado varejista da cidade de Contagem-MG**. 1996. 76 f.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1996.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3.ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 552 p.

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

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

STOCCO, L.; STOLBERG, J. Avaliação da qualidade de linguiças frescas mediante determinação de hidroxiprolina. **B. CEPPA**, v. 26, n. 1, p. 87-92, 2008.

TERRA, N. N. **Apontamentos de tecnologia de carnes**. São Leopoldo, RS: Unisinos, v. 1, 2000. 216 p.

TUTENEL, A. V.; PIERAD, D.; HOFF, J. V.; CORNELIS, M.; ZUTTER, L. Isolation and molecular characterization of *Escherichia coli* O157 isolated from cattle pigs and chickens at slaughter. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, n. 1, p. 63-69, 2003.

USDA/FSIS. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg and environmental samples. In: United States Department of Agriculture (USDA)/Food Safety and Inspection Service (FSIS), Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 8.04, revised September 2005. Disponível no site <[http://www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological\\_Lab\\_Guidebook/index.asp](http://www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological_Lab_Guidebook/index.asp)>. Acesso em: 14 out. 2008.

VAZ, S. K. **Elaboração e caracterização de linguiça fresca “tipo toscana” de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 2005. 111 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

VORSTER S. M.; GREEBE, R. P.; NORTJÉ, G. L. The incidence of *Listeria* in processed meats in South Africa. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 169-175, 1993.

WONG, H. C.; CHAO, W. L.; LEE, S. J. Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* in foods available in Taiwan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3101-3104, 1990.

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.

### CAPÍTULO 3

## EFICÁCIA DO BACTERIÓFAGO P100 NO CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO POR *Listeria monocytogenes* INOCULADA ARTIFICIALMENTE EM LINGUIÇA DO TIPO FRESCAL

### RESUMO

Apesar dos recentes avanços nas tecnologias de controle de patógenos em alimentos, os consumidores têm procurado alimentos “naturais”, isto é, submetidos a tratamentos menos agressivos e isentos de conservadores químicos. Os bacteriófagos são ubíquos na natureza, bastante específicos e inofensivos ao homem e aos animais. LISTEX™ P100 é uma cultura de microrganismos seguros, específicos para *Listeria*, que pode ser usada na produção de alimentos como um aditivo natural do processo. Em 2006, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) e a agência norte-americana “Food and Drug Administration” (FDA) aprovaram esse produto desenvolvido na Holanda como GRAS (“Generally Recognized as Safe”) para queijos. Um ano depois, essa aprovação se estendeu a todos os tipos de alimentos, com base nos extensivos dados sobre sua segurança e eficácia e nos testes organolépticos, que confirmaram que o P100 é seguro e não causa qualquer impacto no sabor, cheiro, cor e outras propriedades físicas dos produtos. Diante disso, deslumbra-se a possibilidade da aplicação do fago em diversos alimentos. O LISTEX™ P100, particularmente, é uma opção interessante, e sua aplicação pode ser integrada facilmente dentro da rotina diária do processo de produção. Diante do exposto, objetivou-se avaliar a eficácia do bacteriófago P100 sobre células de *Listeria monocytogenes* 1/2a inoculadas artificialmente em linguiças do tipo frescal e a influência do tempo de tratamento sob refrigeração. Pelos resultados encontrados pode-se verificar a eficácia da utilização do bacteriófago P100, levando à redução de três ciclos logarítmicos na população do microrganismo inoculado nas amostras de linguiça, com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), como também demonstrou que o patógeno não alcançou população elevada nas amostras armazenadas por 10 dias sob refrigeração a 4 °C.

**Palavras-chave:** Bacteriófago P100, *Listeria monocytogenes*, linguiças do tipo frescal.

## ABSTRACT

Despite the recent advancements in food pathogen control technologies, consumers have been searching for natural foods, i.e., foods submitted to less aggressive treatments, without chemical preservatives. Bacteriophages are ubiquitous in nature, quite specific and harmless to men and animals. LISTEX™ P100 is a *Listeria*-specific culture of safe microorganisms that can be used as a natural addition to the process. In 2006, the Department of Agriculture of the USA (USDA) and the American institution Food and Drug Administration (FDA) approved this product developed in the Netherlands as GRAS (“Generally Recognized as Safe”) for cheese. A year later, this approval was extended to all types of foods, based on extensive data on its safety and efficacy provided by organoleptic tests, which confirmed that P100 is safe and does not cause any impact on flavor, color, and other physical product properties. Thus, applying the phage in several foods seems to be possible. LISTEX™ P 100, particularly, is an interesting option and its application can be easily integrated into the daily routine of the production process. Thus, this work aimed to evaluate the efficacy of bacteriophage P100 on cells of *Listeria monocytogenes* ½a inoculated artificially in Brazilian fresh sausage (“linguiça do tipo frescal”), as well as the influence of time of treatment under refrigeration. The results showed the efficacy of using bacteriophage P100, leading to the reduction of three logarithm cycles in the microorganism population inoculated in the Brazilian fresh sausage samples, with statistically significant difference ( $p < 0.05$ ), also showing that the pathogen did not reach a high population in the samples stored for 10 days under refrigeration at 4 °C.

**Keywords:** bacteriophage P100, *Listeria monocytogenes*, Brazilian fresh sausage.

## 1 INTRODUÇÃO

As atuais tecnologias utilizadas para inativação de patógenos nos alimentos não são infalíveis, deixando margem a novas abordagens para melhorar a segurança alimentar. Além disso, os consumidores estão buscando cada vez mais os alimentos naturais, isto é, isentos de conservantes químicos. Uma abordagem que tem sido objeto de interesse crescente é a utilização de bacteriófagos, que são vírus que infectam e matam as bactérias. Os bacteriófagos ou fagos são os microrganismos naturais mais abundantes em nosso meio e estão presentes em número elevado na água e nos alimentos das mais diversas origens (HAGENS; OFFERHAUS, 2008); contagens diretas no solo revelaram uma média de  $1,5 \times 10^7$  UFP/g (ASHELFORD et al., 2003). Os seres humanos estão provavelmente em contato com fagos ao longo da vida, a partir do alimento ingerido, de fagos endógenos no trato gastrintestinal, na pele e no sistema respiratório superior (MERRIL et al., 2003; SULAKVELIDZE et al., 2001). Em certos alimentos, 100 milhões de fagos/g podem ser encontrados e nos ecossistemas aquáticos, esse número pode chegar até 1 bilhão de fagos/mL (HAGENS; OFFERHAUS, 2008).

Os bacteriófagos contribuem para a homeostase bacteriana na natureza, mantendo as mesmas sob controle. Não afetam as bactérias desejadas dos alimentos (por exemplo, culturas “starter” ou iniciadoras), comensais do trato gastrintestinal e a microbiota do ambiente. Também não alteram as características organolépticas (sabor, cor, odor) dos alimentos, não deixam uma marca ecológica, decompondo-se em aminoácidos e ácidos nucleicos, e são comensais normais dos seres humanos e animais. Tudo isso os torna agentes lógicos para controle de algumas bactérias patogênicas, como a *Listeria monocytogenes* em alimentos.

Fagos que infectam *Propionibacterium freudenreichii* foram isolados a partir de queijo tipo suíço em níveis de até  $7 \times 10^5$  UFP/g (GAUTIER et al., 1995). Fagos de bactérias lácticas termofílicas foram isolados de laticínios na Argentina em níveis de até  $10^9$  UFP/mL (SUAREZ et al., 2002) e fagos de *E. coli* foram isolados de um grande número de produtos, incluindo carne de frango e porco, carne moída,

cogumelos, alface, vegetais crus, torta de frango e produtos de “delicatessen”, com números de fagos tão elevados quanto  $10^4$ /g (ALLWOOD et al., 2004).

Pesquisas específicas relacionadas com a segurança também têm sido realizadas para uso de bacteriófagos. Um estudo de toxicidade oral com ratos que receberam doses elevadas do fago de *Listeria*, LISTEX P100, não revelou efeitos colaterais (CARLTON et al., 2005) e um estudo em humanos, com fagos específicos de *Escherichia coli* capazes de infectar as estirpes comensais de *E. coli*, bem como as patogênicas, não conseguiu demonstrar quaisquer efeitos adversos (BRUTTIN; BRÜSSOW, 2005). Duas regras simples de segurança devem ser mantidas: fagos temperados, facilmente discerníveis através de análises do genoma, devem ser evitados; e fagos capazes de realizar transdução generalizada não devem ser utilizados, a menos que o hospedeiro não seja patogênico (HAGENS; OFFERHAUS, 2008).

A indústria de alimentos está preocupada com os patógenos de origem alimentar, com destaque para *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Campylobacter* e *E. coli* patogênica. Destes, apenas *Listeria* coloniza regularmente instalações de produção e, assim, é capaz de contaminar os alimentos ao longo do processo de produção (HAGENS; OFFERHAUS, 2008). Uma série de estudos sobre o sucesso do tratamento com fagos em diversos gêneros alimentícios contaminados com *Listeria* foram publicados (LEVERENTZ et al., 2003, 2004).

Objetivou-se avaliar a eficácia do bacteriófago P100 sobre células de *Listeria monocytogenes* 1/2a inoculadas artificialmente em linguiças do tipo frescal e a influência do tempo de tratamento sob refrigeração a 4 °C.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Microrganismos de referência**

*L. ivanovii* WSLC3009 (sorovar 5) (SLCC 4769),  
*Listeria monocytogenes* 1/2a isolada de linguiça suína tipo frescal,  
Bacteriófago P100 (LISTEX™).

### 2.1.2 Alimento

Linguiça tipo frescal preparada com carne suína.

## 2.2 Metodologia

### 2.2.1 Desenho e local do estudo

Trata-se de um estudo transversal de caráter experimental que foi desenvolvido no Laboratório de Controle de Qualidade dos Alimentos da Escola de Nutrição da Universidade Federal da Bahia.

### 2.2.2 Amostragem

Amostras de linguiça suína do tipo frescal congeladas e acondicionadas em bandejas de isopor foram adquiridas em um estabelecimento comercial de Salvador-BA, para realização do experimento.

As amostras foram transportadas para o Laboratório de Controle de Qualidade dos Alimentos da Escola de Nutrição da Universidade Federal da Bahia, em recipiente isotérmico com gelo reciclável, e mantidas sob temperatura de congelamento (-18 °C) em congelador doméstico. No dia anterior à realização das análises, as amostras foram colocadas em geladeira (ESMALTEC) para descongelamento.

O envoltório dos embutidos cárneos foi retirado assepticamente em capela de fluxo laminar tipo II (LABCONCO); e a massa do produto foi transferida, com auxílio de garfos e facas estéreis, para placas de Petri estéreis, ocupando uma área aproximada de 65 cm<sup>2</sup>, para serem posteriormente pesadas.

### 2.2.3 Preparo da suspensão bacteriana de *L. monocytogenes* 1/2a

A cepa de *L. monocytogenes* 1/2a isolada de uma amostra de linguiça suína do tipo frescal, na primeira etapa deste estudo, mantida em ágar BHI semissólido (0,5% de ágar) (DIFCO), sob refrigeração, foi ativada em caldo tripticase de soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE) (DIFCO) e incubadas a

35 °C por 24 horas, sob agitação, em uma incubadora do tipo “shaker” (CIEN TEC) a 150 rpm. Após a ativação, 1,0 mL da cultura ativa foi inoculado na superfície de duas placas com ágar BHI-YE (1,5%) (0,5 mL em cada placa) (DIFCO), espalhando-se o inóculo com auxílio de alça de Drigaslyk estéril e incubando-se as placas a 35 °C por  $22 \pm 2$  horas. Posteriormente, as células foram suspensas em 2 mL de tampão lambda (1 mL para cada placa), também com o auxílio de alça de Drigaslyk, transferindo-se em seguida a suspensão obtida para tubos do tipo eppendorf estéreis (VALADARES, 2000). A partir dessa suspensão foram realizadas diluições em tampão lambda (até  $10^{-7}$ ), sendo em seguida inoculadas em duplicata na superfície de placas contendo ágar MOX (DIFCO) (CARLTON et al., 2005). Após incubação a 35 °C/  $22 \pm 2$  horas, placas contendo entre 30 e 300 colônias foram selecionadas para contagem do microrganismo em contador eletrônico de colônias (PHOENIX). Este experimento foi repetido por três vezes, e a média das contagens foi expressa como UFC/mL.

#### **2.2.4 Obtenção do título do bacteriófago P100**

Para realização desta etapa, utilizou-se o Protocolo para determinação do título do P100 da empresa fabricante do produto, EBI FOOD SAFETY, recomendado por Hagens e Offerhaus (2008) e Stewart et al. (1989).

Foi utilizada uma cultura de *Listeria ivanovii* (bactéria hospedeira) ativada em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) (DIFCO) em meia concentração, sendo ajustada a concentração de NaCl para 5 g/L, como no meio original, seguido de incubação “overnight” (18h a 24h) a 30 °C em incubadora do tipo B.O.D. (BIOPAR). Foram realizadas diluições decimais em duplicata do fago em tampão lambda (STEWART et al., 1989) a partir de 100  $\mu$ L do fago + 900  $\mu$ L do tampão, agitando-se levemente durante dois segundos, no máximo, em agitador de tubos do tipo “vortex” (ALENMAR).

Para a etapa de infecção foram misturados 150  $\mu$ L da bactéria hospedeira e 100  $\mu$ L de cada diluição do fago, que foram adicionados a 3,5 mL de ágar “soft” BHI (0,4% de ágar) acrescido de glicina (0,75%) (VETEC), resfriado em banho-maria (NOVA ÉTICA) a  $\pm 45$  °C e homogeneizado em agitador de tubos tipo “vortex”. Essa mistura foi vertida em placas de Petri estéreis contendo em média 16 mL de ágar

BHI (1,2% de ágar) e incubadas a 30 °C por 20 - 24h, para determinação das Unidades Formadoras de Placas (UFP).

O princípio do método é baseado no fato de que, após a etapa de infecção, as células infectadas da bactéria são lisadas e liberam partículas fágicas, que são adsorvidas pela célula adjacente, e uma nova progênie fágica é obtida. A formação do halo ou placas de lise determinará a sensibilidade da bactéria ao fago, e o número de halos determinará o título deste.

Para determinação do título, foram contadas placas contendo entre 30 e 300 Unidades Formadoras de Placas (UFP), e a média das contagens foi expressa como UFP/mL.

## **2.2.5 Ensaio para verificar a eficácia do fago P100**

### **2.2.5.1 Preparo das amostras de linguiça para os experimentos**

Pedaços de linguiça sem envoltório, obtidos assepticamente, foram distribuídos em seis placas de Petri estéreis, em área aproximada de 65 cm<sup>2</sup> em cada placa (CARLTON et al., 2005). Dessas seis placas, três foram identificadas como tempo (dia) zero do experimento, ou seja, o dia inicial a contar a vida de prateleira desse embutido cárneo sob refrigeração. As outras três placas foram identificadas como tempo (dia) 10, que foi o valor médio encontrado para a data de validade, sob refrigeração, transcrita nos rótulos das amostras de linguiça obtidas nos estabelecimentos comerciais. Essas amostras foram expostas à luz UV (30 W, distância da irradiação de 50 cm) em uma cabine de fluxo laminar tipo II, por 30 min (15 min de cada lado), com o objetivo de reduzir a microbiota endógena do produto (SEGUN; KARAPINAR, 2004).

### **2.2.5.2 Preparo das amostras controle para o fago P100**

Amostras de linguiça correspondentes a duas placas de Petri submetidas à luz UV, foram pesadas (30 g cada) e transferidas para sacos plásticos estéreis, sendo uma delas destinada ao controle do fago no produto no tempo zero e outra para o tempo 10, sob refrigeração a 4 °C. Em seguida foram adicionados 10 mL do bacteriófago P100 em cada uma das amostras (título inicial aproximado de 9,0 x

$10^7$ UFP/mL), com posterior massagem com as mãos, para permitir uma distribuição uniforme do fago no alimento. A amostra do tempo 10 foi estocada em geladeira a 4 °C, para continuação do experimento no décimo dia. À amostra do tempo zero foram adicionados 270 mL de tampão lambda com 0,01% de tween 80 (SYNTH), homogeneizada por 2 min em homogeneizador do tipo “Bag Mixer” (ITR), obtendo-se a primeira diluição. Foram feitas diluições decimais subseqüentes até  $10^{-7}$ , em duplicata, usando 100  $\mu$ L da amostra e 900 $\mu$ L do tampão lambda. Determinou-se o título do fago usando 200  $\mu$ L de *Listeria ivanovii* ativada “overnight” a 30 °C e 100  $\mu$ L do fago nas diluições  $10^{-2}$  a  $10^{-7}$ , misturados em 3,5 mL de “soft” BHI (0,4% de ágar, acrescido de 0,75% de glicina) e inoculados na superfície de placas contendo ágar BHI (1,2% de ágar), como no item 2.2.3. A contagem das placas de lise foi feita em placas contendo entre 30 e 300 UFP, e a média das contagens foi expressa como UFP/g (CARLTON et al., 2005).

### **2.2.5.3 Preparo das amostras controle para *Listeria monocytogenes* 1/2a**

Amostras de linguiça contidas em duas placas de Petri, que foram submetidas à luz UV (uma para o tempo zero e outra para o tempo 10), foram pesadas (30 g cada) e transferidas para sacos plásticos estéreis. Em seguida, foi adicionado 1 mL do inóculo de *Listeria monocytogenes* 1/2a pré-preparado (item 2.2.2), utilizando-se uma população aproximada de  $6,3 \times 10^5$  UFC/mL em cada porção. As amostras inoculadas foram massageadas com as mãos, para permitir uma distribuição uniforme da bactéria e a seguir deixadas por uma hora em capela de fluxo laminar, para permitir a adesão bacteriana. Após esta etapa, a amostra identificada como tempo 10 foi armazenada sob refrigeração a 4 °C, para continuação do experimento no décimo dia. À amostra do tempo zero foram adicionados 270 mL de tampão lambda com 0,01% de tween 80, e a mistura foi homogeneizada por 2 min em homogeneizador do tipo “Bag Mixer”, obtendo-se a diluição  $10^{-1}$  (CARLTON et al., 2005). Foram feitas diluições decimais subseqüentes até  $10^{-4}$ , usando-se 100  $\mu$ L do homogeneizado e 900  $\mu$ L do tampão lambda. Em seguida, inocularam-se, em duplicata, as quatro diluições preparadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ) em ágar MOX, e as placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas. As contagens foram realizadas em placas contendo entre 30 e 300 UFC, e a média dos resultados expressa como UFC/g (CARLTON et al., 2005).

#### 2.2.5.4 Tratamento das amostras

Amostras provenientes de outras duas placas de Petri, uma para o tempo zero e outra para o tempo 10, após submissão à luz UV, foram pesadas (30 g cada) e transferidas para sacos plásticos estéreis. Em seguida, foi adicionado 1 mL de *Listeria monocytogenes* 1/2a (inóculo com população aproximada de  $6,3 \times 10^5$  UFC/mL). As amostras inoculadas foram massageadas com as mãos, para permitir uma distribuição uniforme da bactéria, e a seguir deixadas por uma hora em capela de fluxo laminar, para permitir a adesão bacteriana. Após esta etapa, foram adicionados 10 mL do bacteriófago P100 em cada amostra (título inicial aproximado de  $9,0 \times 10^7$  UFP/mL), que foram a seguir massageadas com as mãos, para permitir uma distribuição uniforme do fago. Deixou-se agir por 15 a 20 minutos para permitir a etapa da infecção (STEWART et al., 1989), e, em seguida, a amostra do tempo 10 foi colocada sob refrigeração a 4 °C, para continuação do experimento no décimo dia. À amostra do tempo zero foram adicionados 270 mL de tampão lambda com 0,01% de tween 80 e a mistura foi homogeneizada por 2 min em homogeneizador do tipo “Bag Mixer”, obtendo-se a diluição  $10^{-1}$  (CARLTON et al., 2005). Foram então feitas diluições decimais subsequentes até  $10^{-4}$ , usando 100  $\mu$ L da amostra e 900  $\mu$ L do tampão lambda. Em seguida, inocularam-se, em duplicata, as quatro diluições ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ) em ágar MOX e incubou-se a 37 °C por 48 horas. As contagens foram realizadas em placas contendo entre 30 e 300 UFC, e a média dos resultados foi expressa como UFC/g (CARLTON et al., 2005).

#### 2.2.6 Análise estatística

Os tratamentos, com os respectivos controles, foram realizados por três vezes, sendo as contagens das UFP ou UFC obtidas sempre em duplicata e expressas como valor médio das contagens. Todas as contagens obtidas foram convertidas em logaritmos, e o número de reduções decimais (RD) foi calculado por meio da diferença entre a contagem inicial das células (controle *Listeria*) e a contagem obtida após o tratamento, no tempo zero e no tempo dez, sob refrigeração a 4 °C.

O experimento foi conduzido em esquema de parcelas subdivididas, tendo nas parcelas os dois tratamentos (amostras de linguiça inoculadas artificialmente com *L. monocytogenes* e amostras inoculadas com o patógeno e posteriormente adicionadas do bacteriófago P100) e, nas subparcelas, dois períodos (tempos zero e 10). Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de média. A comparação de médias foi feita usando-se o teste de Duncan a 5% de probabilidade. Para execução das análises estatísticas, utilizou-se o programa estatístico SAEG 9.0 (2005), desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa. Independentemente de a interação entre os fatores ser ou não significativa, optou-se pelo seu desdobramento, devido ao interesse em estudo.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Obtenção do inóculo de *L. monocytogenes* 1/2a e determinação do título do bacteriófago P100

O valor médio das contagens obtidas no preparo da suspensão de *Listeria monocytogenes* 1/2a e o obtido na determinação do título do bacteriófago P100 podem ser observados na Tabela 1. A população do inóculo bacteriano obtida,  $6,3 \times 10^9$  UFC/mL, foi diluída até  $6,3 \times 10^5$  UFC/mL, para realização dos experimentos. A escolha dessa diluição do inóculo foi baseada nas recomendações de Carlton et al. (2005), visando a obtenção de uma população final de *L. monocytogenes* na amostra (após a adesão) de aproximadamente  $10^3$  UFC/g.

Tabela 1 – População de *L. monocytogenes* 1/2a (UFC/mL) obtida no preparo da suspensão bacteriana e título (UFP/mL) do fago P100.

Repetição	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a		Bacteriófago P100	
	UFC/mL	Log UFC/mL	UFP/mL	Log UFP/mL
1 <sup>a</sup>	$1,5 \times 10^{10}$	10,2	$7,6 \times 10^7$	7,9
2 <sup>a</sup>	$1,6 \times 10^9$	9,2	$10,0 \times 10^7$	8,0
3 <sup>a</sup>	$1,9 \times 10^9$	9,3	$9,4 \times 10^7$	7,9
<b>Média</b>	<b><math>6,3 \times 10^9 \pm 7,9</math></b>	<b><math>9,6 \pm 0,5</math></b>	<b><math>9,0 \times 10^7 \pm 1,2</math></b>	<b><math>7,9 \pm 0,06</math></b>

± desvio-padrão.

Nos ensaios utilizados para determinação do título do bacteriófago P100, obteve-se o valor médio de três repetições, que foi inferior ao indicado no rótulo do produto:  $10^{11}$  UFP/mL. Para tentar otimizar os experimentos e atender ao recomendado por Carlton et al. (2005), que seria o uso de 1 mL do fago P100 com título de  $10^9$  UFP/mL para 30-40 g ( $65 \text{ cm}^2$ ) da amostra, utilizaram-se neste estudo 10 mL do produto. A recomendação da FDA (2006) é de que se use no máximo 1 mL do fago P100 com título  $10^{11}$  UFP/mL para  $500 \text{ cm}^2$  do produto pronto para o consumo.

### 3.2 Avaliação da eficácia do P100 sobre células de *L. monocytogenes* 1/2a inoculadas em amostras de linguiça suína do tipo frescal

#### 3.2.1 Amostras de linguiça controle para o bacteriófago P100

Os valores médios encontrados nas três repetições do experimento com as amostras de linguiça adicionadas somente do bacteriófago P100, nos tempos zero e 10, encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Título do fago P100 obtido após a inoculação das amostras de linguiça para os tempos zero e 10

Fago P100*	Tempo			
	0 (zero)		10	
	UFP/g	Log UFP/g	UFP/g	Log UFP/g
1 <sup>a</sup>	$4,8 \times 10^3 \pm 3,2$	$3,6 \pm 0,3$	$2,9 \times 10^4 \pm 0,07$	$4,5 \pm 0,01$
2 <sup>a</sup>	$4,3 \times 10^3 \pm 2,8$	$3,6 \pm 0,3$	$2,2 \times 10^4 \pm 0,3$	$4,3 \pm 0,06$
3 <sup>a</sup>	$3,4 \times 10^3 \pm 1,2$	$3,5 \pm 0,2$	$3,1 \times 10^3 \pm 2,2$	$3,4 \pm 0,3$
Média	$1,4 \times 10^3 \pm 0,7$	$3,6 \pm 0,06$	$1,8 \times 10^4 \pm 1,4$	$4,1 \pm 0,6$

± desvio-padrão.

\* Título do fago inoculado:  $3,0 \times 10^7$  UFP/g.

Observa-se que houve declínio no título do bacteriófago, pois no momento da aplicação do fago nas amostras de linguiça o título era de  $9,0 \times 10^7$  UFP/mL. Considerando o uso de 10 mL do fago para cada 30 g da amostra, tem-se um inóculo inicial de  $3,0 \times 10^7$  UFP/g. Esse declínio era esperado, considerando que parte do reagente pode não ter aderido ao alimento, como também acontece com a célula bacteriana. Essa queda de quatro ciclos logarítmicos no tempo zero e três ciclos log no tempo 10 na concentração do P100 demonstra que a refrigeração não

levou à diminuição do título, fato esse já relatado por alguns autores em relação a outros fagos (LEVERENTZ et al., 2001; ATTERBURY et al., 2003).

Há de se considerar que a presença de gordura (toucinho) na formulação da linguiça suína pode ter dificultado o encontro do fago com as células hospedeiras de *L. ivanovii*, servindo de “esconderijo” para o patógeno, dificultando assim o mecanismo da infecção e a liberação da progênie fágica, que é revelada pela formação das placas de lise. Na tentativa de resolver esse problema, foi adicionado o reagente tween 80 na formulação do tampão lambda e glicina no “soft” ágar, para aumentar as placas de lise e melhorar a visualização delas.

Pela análise detalhada da Tabela 2, nota-se que o título do fago variou aproximadamente de 1 ciclo log entre os tempos zero e 10 dos tratamentos. Na primeira repetição, observou-se ligeiro aumento do título entre o tempo zero e o tempo 10 ( $4,8 \times 10^3$  para  $2,9 \times 10^4$  UFC/g), e o mesmo ocorreu na segunda repetição do experimento. Esses dados corroboram a afirmação de que o fago, mesmo em temperatura de refrigeração, manteve-se em atividade, gerando uma nova progênie fágica e promovendo a lise das células de *L. ivanovii* adicionada como bactéria hospedeira.

### 3.2.2 Amostras de linguiça controle para células de *Listeria monocytogenes* 1/2a

Os valores médios da população de *Listeria monocytogenes* 1/2a inoculada artificialmente em 30 g das amostras (três repetições) encontrados nos experimentos, nos tempos zero e 10, encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – População de *L. monocytogenes* 1/2a após a inoculação das amostras de linguiça, nos tempos zero e 10.

Repetição	<i>L. monocytogenes</i> *			
	Tempo		Tempo	
	0 (zero)		10	
	UFC/g	Log UFC/g	UFC/g	Log UFC/g
1 <sup>a</sup>	$1,1 \times 10^4 \pm 1,3$	$4,0 \pm 0,06$	$7,7 \times 10^4 \pm 3,1$	$4,9 \pm 0,2$
2 <sup>a</sup>	$2,8 \times 10^4 \pm 0,2$	$4,4 \pm 0,03$	$1,4 \times 10^5 \pm 0,1$	$5,1 \pm 0,04$
3 <sup>a</sup>	$1,4 \times 10^4 \pm 9,2$	$4,1 \pm 0,3$	$5,0 \times 10^5 \pm 1,3$	$5,7 \pm 0,1$
<b>Média</b>	<b><math>1,8 \times 10^4 \pm 0,9</math></b>	<b><math>4,2 \pm 0,2</math></b>	<b><math>2,4 \times 10^5 \pm 2,3</math></b>	<b><math>5,2 \pm 0,4</math></b>

± desvio-padrão.

\* População do inóculo:  $4,3 \log$  UFC/g.

Os valores da população do microrganismo encontrados nas amostras de linguiça foram superiores aos esperados, visto que no momento da inoculação de *L. monocytogenes* no alimento a concentração do inóculo era de aproximadamente  $6,3 \times 10^5$  UFC/mL, ou seja, 5,8 log UFC/mL, correspondendo a 4,3 log UFC/g. Dessa forma, pela análise da média encontrada, visualiza-se que a adesão da bactéria ao produto, permitida por uma hora em cabine de fluxo laminar, foi praticamente completa. Entretanto, como era de se esperar, dado o caráter psicrotrófico da bactéria, a população desta aumentou de 1 ciclo log (valor médio) após 10 dias sob refrigeração do alimento.

### 3.2.3 Tratamento das amostras de linguiça inoculadas artificialmente com *L. monocytogenes* 1/2a e submetidas ao fago P100

Analisando os resultados apresentados na Figura 1, verifica-se o efeito do fago P100 no controle da contaminação por *L. monocytogenes* em linguiça suína tipo frescal nas três repetições do experimento, nos tempos zero e 10.

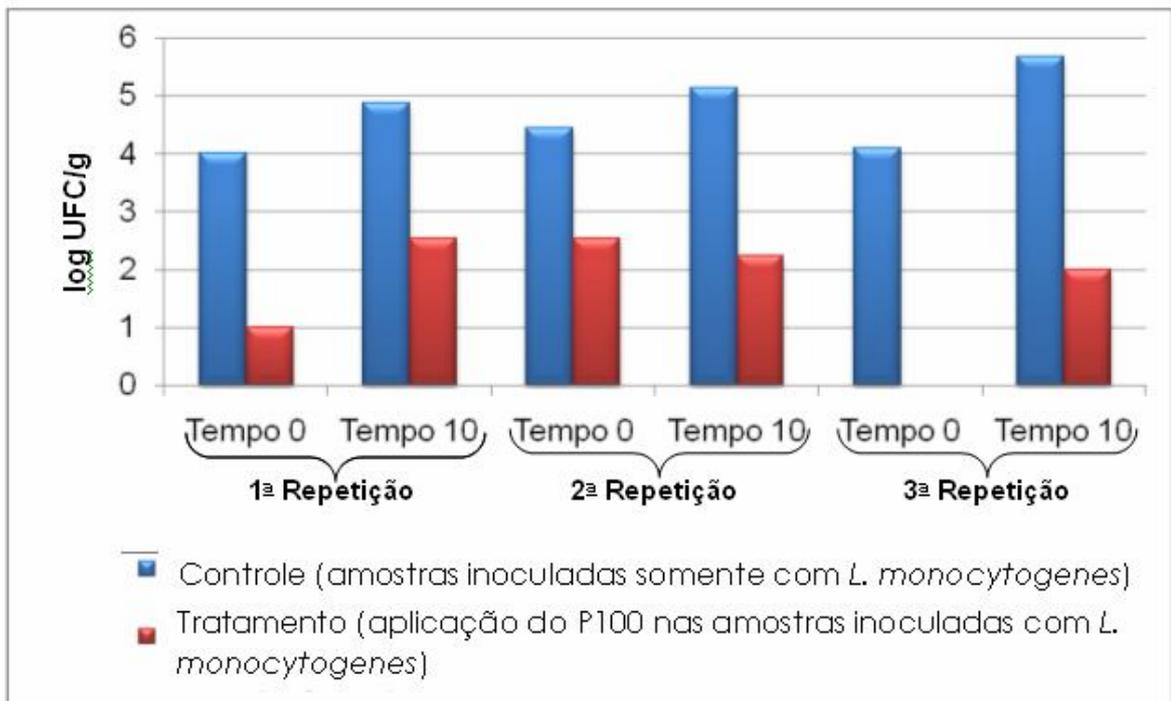


Figura 1 – Efeito do fago P100 no controle da contaminação por *L. monocytogenes* 1/2a em linguiça suína tipo frescal, nos tempos zero e 10.

Analisando a primeira repetição do experimento, nota-se que no tempo zero o fago reduziu em três ciclos logarítmicos o número de células viáveis de *Listeria monocytogenes* 1/2a inoculadas nas amostras de linguiça, ficando a população inicial de 4,0 log UFC/g reduzida para 1,0 log UFC/g. Já no tempo 10, para essa mesma amostra observa-se redução na população de *Listeria* de 4,9 log UFC/g para 2,5 log UFC/g, redução decimal de pouco mais de dois ciclos logarítmicos. Essa redução menor observada no tempo 10 do tratamento se deve à característica psicrotrófica que *L. monocytogenes* possui, ou seja, durante os 10 dias sob refrigeração, a baixa temperatura contribuiu para a multiplicação desse patógeno na amostra e o título do fago não apresentou aumento significativo ( $4,8 \times 10^3$  UFP/mL no tempo zero e  $2,9 \times 10^4$  UFP/mL no tempo 10) para infectar todas as células presentes e sua consequente eliminação.

Na segunda repetição do experimento, observa-se comportamento semelhante ao da repetição anterior quando se compara a redução de células de *L. monocytogenes* causada pela aplicação do bacteriófago P100, nos tempos zero e 10. No tempo zero, a redução foi de quase dois ciclos logarítmicos (4,4 log UFC/g para 2,5 log UFC/g), ao passo que no tempo 10 a redução foi de quase três ciclos (5,1 log UFC/g para 2,2 log UFC/g). Entretanto, assim como na primeira repetição, ficou evidenciada a multiplicação do patógeno após 10 dias de tratamento.

Na terceira repetição do experimento, observaram-se reduções mais significativas na população bacteriana. No tempo zero, o bacteriófago foi 100% eficaz, eliminando completamente as células de *L. monocytogenes* da amostra de linguiça, evidenciando uma redução de mais de quatro ciclos logarítmicos. No décimo dia sob refrigeração, a redução decimal foi menos expressiva, alcançando, entretanto, o valor aproximado de 3,5 ciclos log, superior ao dos experimentos anteriores. O título do bacteriófago utilizado nos tratamentos, como já mencionado anteriormente, encontrava-se abaixo do recomendado pela FDA (2006) que é de no máximo 1 mL do fago/500 cm<sup>2</sup> de área do alimento, para um título de  $10^{11}$  UFP/mL; e por Carlton et al. (2005) de  $10^9$  UFP/mL para 65 cm<sup>2</sup> ou 30-40g do produto. Visualiza-se assim que a concentração do fago utilizada neste experimento pode ter comprometido a total eliminação do patógeno, principalmente após a etapa de refrigeração. É importante mencionar que os autores recomendaram essas concentrações do fago P100 para produtos prontos para o consumo, o que não é o caso da linguiça tipo frescal usada no presente estudo – produto que deverá sofrer

coção antes de ser consumido. Acrescenta-se que a opção de adição do bacteriófago no produto cru antes de ser embutido, neste estudo, se justifica, considerando que o envoltório utilizado na elaboração do produto funciona como uma barreira que impede a entrada e adesão do fago no alimento pronto para o consumo.

Os valores encontrados para a redução da população bacteriana no presente trabalho são inferiores aos apresentados por Carlton et al. (2005), que utilizaram o bacteriófago P100 para controle de *L. monocytogenes* em queijos e conseguiram eliminar o patógeno quando utilizaram uma dose elevada do fago ( $3,0 \times 10^9$  UFP/mL). Contudo, quando esses autores utilizaram uma concentração menor de bacteriófago ( $1,5 \times 10^8$  UFP/mL), semelhante à utilizada neste estudo, a redução encontrada foi de apenas 2-3 ciclos logarítmicos, ou seja, inferior às encontradas neste estudo. Dessa forma, o efeito inibitório do P100 mostra-se claramente dose-dependente.

Em estudo realizado por Leverentz et al. (2003), uma mistura de diferentes fagos para *Listeria* foi empregada para reduzir os níveis do patógeno na superfície de melões e fatias de maçãs artificialmente contaminadas. Segundo esses autores, a mistura de fagos reduziu a contagem de células viáveis de *Listeria* entre 2,0 e 4,6 ciclos log em melões, enquanto o efeito em maçãs foi de apenas 0,4 ciclo logaritmo. Na continuação desse estudo, Leverentz et al. (2004) otimizaram a aplicação e a concentração do fago, o que permitiu redução em melões de até 6,8 ciclos log depois de sete dias de armazenamento a 10 °C. Esses autores observaram que, quanto mais elevadas forem as concentrações dos fagos, mais eficazes são estes na redução da contaminação por patógenos, corroborando a afirmativa mencionada, de que a ação de bacteriófagos é dose-dependente.

Estudos envolvendo outros alimentos e bacteriófagos têm sido relatados. Fagos isolados a partir de fontes ambientais e o fago Felix 01, que possui ampla escala de hospedeiros, levaram à redução de dois ciclos log na população de *Salmonella Typhimurium* DT104 inoculada em coxas de frango (KOSTRZYNSKA et al., 2002) e em linguiça de frangos (“frankfurters”) (WHICHARD et al., 2003).

### 3.3 Análise estatística

De acordo com os dados encontrados, relacionados à sobrevivência de *L. monocytogenes* em função da adição ou não do fago P100, englobando os dois períodos (tempos zero e 10), apresentados na Tabela 4, pode-se observar que houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos.

Tabela 4 – Valores médios das contagens de *L. monocytogenes* 1/2a (log de UFC/g) nas amostras de linguiça em função da adição ou não do bacteriófago P100, nos tempos zero e 10.

Tratamento	Sem adição do P100	Com adição do P100
Log de UFC/g	4,7 a*	1,7 b

\* Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

Observa-se que houve redução de três ciclos log entre as amostras de linguiça contaminadas artificialmente somente com *L. monocytogenes* 1/2a e as amostras contaminadas e posteriormente adicionadas do bacteriófago P100 (Tabela 4), ficando demonstrado que o bacteriófago foi eficaz no controle da contaminação por *L. monocytogenes*.

Considerando o tipo de produto empregado nesta pesquisa e na desenvolvida por Carlton et al. (2005), vale lembrar que a linguiça utilizada neste experimento deverá passar por tratamento térmico antes de ser consumida, diferentemente das amostras de queijo estudadas pelos autores, oriundas de um produto pronto para consumo.

De maneira geral, verifica-se que a aplicação do bacteriófago P100 nas amostras de linguiça foi eficaz, e esse aditivo se torna uma opção viável no controle da contaminação por *L. monocytogenes* nesse produto cárneo. Entretanto, novos experimentos, utilizando o bacteriófago com um título mais elevado devem ser realizados, buscando a completa erradicação de *L. monocytogenes* em linguiças, principalmente devido à multiplicação do patógeno sob refrigeração.

Na comparação entre os dados obtidos nos tempos zero e 10 do tratamento (Tabela 5), verificou-se que houve diferença estatística nas contagens observadas para as células de *L. monocytogenes*.

Tabela 5 – Valores médios das contagens de *L. monocytogenes* ½a (log de UFC/g) nas amostras de linguiça tratadas com o bacteriófago P100, nos tempos zero e 10.

Tempo	Zero	10
Amostras com adição do P100 (log UFC/g)	1,2 b*	2,3 a

\* Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

A análise dos valores encontrados para a população de *L. monocytogenes* no tempo zero indica que, após o tratamento das amostras de linguiça com o bacteriófago P100, a contagem final de células viáveis de *L. monocytogenes* atingiu pouco mais que um ciclo log. Comparando esse resultado com o valor médio encontrado nas amostras de linguiça controle para a bactéria (4,2 log UFC/g), também no tempo zero, observa-se redução significativa de três ciclos log. Resultado semelhante foi observado nas amostras tratadas com o P100 no tempo 10.

A diferença estatística observada entre as amostras tratadas com o P100 nos tempos zero e 10 (Tabela 5) evidencia mais uma vez o caráter psicrotrófico de *L. monocytogenes*. Contudo, o baixo valor encontrado (2,3 log UFC/g) no tempo 10, quando comparado com o das amostras armazenadas por 10 dias sob refrigeração sem a adição do P100 (5,2 log UFC/g), indica a continuidade da ação do bacteriófago no controle da contaminação por *L. monocytogenes* mesmo em temperaturas de refrigeração.

## 4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados alcançados neste estudo, conclui-se que:

- O bacteriófago P100 é eficaz no controle da contaminação por *L. monocytogenes* 1/2a inoculada em linguiça suína do tipo frescal.
- A refrigeração das amostras que passaram por tratamento durante 10 dias contribuiu para o aumento da população de *L. monocytogenes* 1/2a, demonstrando o caráter psicrótrófico do patógeno e a necessidade de utilizar um fago com título mais elevado.

## REFERÊNCIAS

- ALLWOOD, P. B.; MALIK, Y.S., MAHERCHANDANI, S., VOUGHT, K., JOHNSON, L.A., BRAYMEN, C., HEDBERG, C.W., GOYAL, S.M. Occurrence of *Escherichia coli*, noroviruses, and F-specific coliphages in fresh market-ready produce. **J. Food. Prot.**, v. 67, p. 2387, 2004.
- ASHELFORD, K. E.; DAY, M. J.; FRY, J. C. Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 285-289, 2003.
- ATTERBURY, R. J.; CONNERTON, P. L., DODD, C.E., REES, C. E., CONNERTON, I. F. Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 6302-6306, 2003.
- BRUTTIN, A.; BRÜSSOW, H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 49, p. 2874, 2005.
- CARLTON, R. M.; NOORDMAN, W. H.; BISWAS, B.; MEESTER, E. D.; LOESSNER, M. J. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 43, p. 301-312, 2005.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. FDA approval of *Listeria*-specific bacteriophage preparation on ready-to-eat (RTE) meat and poultry products. August 2006. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/FDACenter>>. Acesso em: 10 out. 2008.

GAUTIER, M. A.; ROUAULT, A., SOMMER, P., BRIANDET, R. Occurrence of *Propionibacterium freudenreichii* bacteriophages in Swiss cheese. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 2572, 1995.

HAGENS, S.; OFFERHAUS, M. L. Bacteriophages – New weapons for foods safety. **Food Technology**, v. 62, n. 4, p. 46-54, 2008.

HUDSON, J. A.; BILLINGTON, C., CAREY-SMITH, G., GREENING, G. Bacteriophages as biocontrol agents in food. **J. Food Prot.**, v. 68, p. 426-437, 2005.

KOSTRZYNSKA, M.; CAMPOS, M. C., GLIFFITHS, M., LEPP, D. Biocontrol of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 on poultry products using bacteriophages. In: AGRICULTURE AND AGRI-FOOD CANADA FOOD NETWORK MEETING, Lacombe, Alberta, Canada. 2002. **Proceedings...** Lacombe, 2002. p. 35.

KRUGER, M. F. **Controle de *Listeria monocytogenes* em linguiça frescal refrigerada através do uso de óleo essencial de orégano e nisina.** 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

LEVERENTZ, B.; CONWAY, W. S., ALAVIDZE, Z., JANISIEWICZ, W. J., FUCHS, Y., CAMP, M. J., CHIGHLADZE, E., SULAKVELIDZE, A. Examination of bacteriophage as a biocontrol method for salmonella on fresh-cut fruit: a model study. **J. Food Prot.**, v. 64, p. 1116-1121, 2001.

LEVERENTZ, B.; CONWAY, W. S., CAMP, M. J., JANISIEWICZ, W., ABULADZE, T., YANG, M., SAFTNER, R., SULAKVELIDZE, A. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 4519-4526, 2003.

LEVERENTZ, B.; CONWAY, W. S., JANISIEWICZ, W., CAMP, M. J. Optimizing concentration and timing of a phage spray application to reduce *Listeria monocytogenes* on honeydew melon tissue. **J. Food Prot.**, v. 67, p. 1682-1686, 2004.

MERRIL, C. R.; SCHOLL, D.; ADBYA, S. The prospect for bacteriophage therapy in western medicine. **Nat. Rev. Drug Disc.**, v. 2, p. 489-497, 2003.

SISTEMA PARA ANÁLISE ESTATÍSTICA E GENÉTICA – SAEG (versão 9.0). Viçosa: Fundação Arthur Bernardes, 2005.

SEGUN, I. Y.; KARAPINAR, M. Effectiveness of lemon juice, vinegar and their mixture in the elimination of *Salmonella* Typhimurium on carrots (*Daucus carota* L.). **J. Food Microbiol.**, v. 96, p. 301-305, 2004.

SEGUN, I. Y.; KARAPINAR, M. Effectiveness of household natural sanitizers in the elimination of *Salmonella* Typhimurium on rocket (*Eruca sativa* Miller) and spring onion (*Allium cepa* L.). **J. Food Microbiol.**, v. 98, n. 3, p. 319-323, 2005.

STEWART, G. S. A. B.; JASSMIN, A. A.; DENYERS, P.; NEWBY, P.; LINLEY, K.; DHIR, V. K. The specific and sensitive detection of bacterial pathogens within 4h using bacteriophage amplification. **Journal Applied Microbiology**, v. 84, p. 777-783, 1989.

SUAREZ, V. B.; QUIBERONI, A., BINETTI, A.G., REINHEINER, J.A. Thermophilic lactic acid bacteria phages isolated from Argentinean dairy industries. **J. Food. Prot.**, v. 65, p. 1597, 2002.

SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, J. G. J. Bacteriophage therapy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, p. 649-659, 2001.

VALADARES, G. F. **Detecção do fator de colonização CS31A em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarreia e sua associação com fatores de virulência.** 2000. 81f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – UNICAMP, Campinas, SP, 2000.

WHICHARD, J. M.; SRIRANGANATHAN, N.; PIERSON, F. W. Suppression of *Salmonella* growth by wild-type and large-plaque variants of bacteriophage Felix O1 in liquid culture and on chicken frankfurters. **J. Food Prot.**, v. 66, p. 220-225, 2003.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O desenvolvimento deste estudo traz uma contribuição sobre o conhecimento da ocorrência de *Listeria monocytogenes* em embutidos cárneos crus, linguiça, vendidos a varejo no município de Salvador-BA.

- A presença de *L. monocytogenes* nas amostras de linguiça representa um perigo em potencial para a saúde coletiva, devendo-se intensificar a fiscalização dos mais diversos produtos quanto à inocuidade alimentar.

- Das diferentes marcas de linguiças analisadas, todas as quatro inspeccionadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) apresentaram contaminação por *Listeria spp.*, indicando que o patógeno pode estar presente nesses produtos não só no município de Salvador, como também em todo o território nacional.

- A partir dos resultados encontrados, espera-se contribuir com as ações da Vigilância Sanitária e Epidemiológica de Alimentos do município de Salvador e com as indústrias de alimentos na implantação e/ou intensificação de programas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e de sistemas como APPCC, que permitem atuar nas diversas etapas da produção e distribuição.

- O uso de tecnologias alternativas para o controle de patógenos em alimentos, em especial de *L. monocytogenes*, deve ser mais bem estudado, e a utilização de substâncias GRAS, como o bacteriófago P100, deve ser incentivada junto às indústrias de alimentos.

- Embora trabalhos da literatura relatem a ação de bacteriófagos mesmo sob temperaturas de refrigeração, inibitória para muitos patógenos, a conservação das amostras submetidas ao P100 por 10 dias a 4 °C resultou no aumento da população de *L. monocytogenes* 1/2a, demonstrando o caráter psicrófilo do patógeno e a necessidade de utilizar um fago com título mais elevado.

- Os resultados deste estudo trazem uma contribuição valiosa e pioneira, ao utilizar o bacteriófago P100 em alimentos produzidos e comercializados no Brasil, uma vez que não há relatos na literatura científica nacional sobre a eficácia desse aditivo em quaisquer produtos.

- Estudos posteriores são necessários, utilizando o fago P100 com título mais elevado, para a completa erradicação do patógeno no alimento.

- A carência na literatura científica mundial de trabalhos que utilizam fagos em produtos alimentícios sugere a continuação de pesquisas com esse aditivo, como forma de garantir alimentos seguros para a população.

## ANEXO



EBI FOOD SAFETY

## Phage P100 Enumeration Protocol

### Materials required

- BHI-agar plates, ~85 mm diameter, ~16ml medium (1.2% agar)
- BHI-soft-agar (0.4% agar) 3.5ml aliquots in glass test tubes
- 1/2 –strength BHI-broth (NaCl adjusted to 5g/l)
- SM-buffer (autoclaved):
  - 100 mM NaCl
  - 10 mM MgSO<sub>4</sub>
  - 50 mM Tris-HCl pH 7.5
- Eppendorf caps
- Pipettes
- Incubation stove 30°C
- Thermal block/water bath at 42°C
- Overnight culture of indicator strain
- Vortexer

### Procedure

#### 1. Prepare serial dilutions in duplicate:

- 1.1. Add of 900 µl SM-buffer to Eppendorf caps.
- 1.2. Add 100 µl of P100 sample to the prepared cap.
- 1.3. Mix gently by vortexing for 2s at lowest speed, followed by slowly inverting cap.  
Repeat twice.
- 1.4. Transfer 100 µl from this cap to the next cap and repeat mixing procedure.
- 1.5 Repeat until the two dilution series are complete.

#### 2. Preparation of plates:

- 2.1 If stored cold, ensure plates are at room temperature.
- 2.2 Melt soft-agar test tubes and place at 42°C, triplicate tubes for each dilution to be tested.
- 2.3 Add 150 µl of indicator bacteria to the soft agar.
- 2.4 Add 100 µl of the phage dilution, mix gently and pour onto a plate, evenly distributing the soft agar, by gently rocking the plate.
- 2.5 Let the soft-agar harden for 5 min.
- 2.6 Proceed with next tube.
- 2.7 Place plates at 30°C for 20-24 h.
- 2.8 Enumerate plaques on plates containing between 30-300 plaques to determine initial PFUs in the sample, assuming Poisson distribution for determining standard deviations.

For more information please contact

EBI FOOD SAFETY B.V.

NIEUWE KANAAL 7P  
6709 PA WAGENINGEN  
THE NETHERLANDS  
TEL +31 (0)317 421 414  
FAX +31 (0)317 410 055  
WWW.EBIFOODSAFETY.COM