

# OCORRÊNCIA DE *Listeria monocytogenes* EM QUEIJO ARTESANAL TIPO COALHO COMERCIALIZADO NA CIDADE DE MANAUS-AM, BRASIL

Simone de Nazaré Melo RAMOS<sup>1</sup>, Cristóvão Alves da COSTA<sup>2\*</sup>

**RESUMO** - A ocorrência de *Listeria* sp. em queijo artesanal tipo coalho comercializado na cidade de Manaus foi estudada. No período de março a maio de 1998 foram coletadas 58 amostras do produto em feiras e mercados localizados em seis zonas da cidade de Manaus. Em duas amostras de queijo foram identificadas duas espécies de *Listeria*: *L. monocytogenes* e *L. innocua*. A primeira espécie é reconhecidamente patogênica para o ser humano. Os resultados apresentados demonstraram haver risco de transmissão de enfermidades pelo consumo de queijos processados sem os devidos cuidados de higiene.

**Palavras-chave:** queijo, *Listeria monocytogenes*, *Listeria* sp.

## Occurrence of *Listeria monocytogenes* in handmade type cheese coagulum marketed in the city of Manaus-Amazonas, Brazil

**ABSTRACT** - The occurrence of *Listeria* sp. in cheese craft type coagulum marketed in the city of Manaus was studied. In the period of March to May of 1998 58 samples of the product were collected at fairs and located markets in six areas of the city. In two cheese samples we identified two species of *Listeria*: *L. monocytogenes* and *L. innocua*. The first species was found fobe pathogenic for the human being. The results demonstrated there to be risk of transmission of illnesses from the consumption of cheeses processed without the due hygiene care.

**Key-words:** cheese, *Listeria monocytogenes*, *Listeria* sp.

## INTRODUÇÃO

Os leites e seus derivados são freqüentemente implicados em surtos de toxinfecções alimentares. Vários fatores podem contribuir para a presença de alguns tipos de microrganismos patogênicos nessas espécies de alimentos: sua origem, a maneira como foram processados, manipulação, transporte e armazenamento que, de maneira isolada ou em conjunto, favorecem o desenvolvimento de microrganismos causadores de doenças. Diversos trabalhos têm mostrado com freqüência a ocorrência de *Listeria* spp., em vários tipos de alimentos, principalmente leite e derivados, e suas implicações em alguns

surtos alimentares, podendo, em alguns casos, causar a listeriose (GARCIA-CRUZ, 1994; MOURA, 1993; SILVA, 1998).

Nas últimas décadas, a listeriose caracterizou-se como uma doença emergente de origem alimentar, apesar de não ser considerada nova, visto que já existiam relatos anteriores de sua ocorrência. É considerada uma doença atípica de origem alimentar, grave e com mortalidade, atingindo principalmente indivíduos imunodeprimidos, mulheres gestantes, transplantados e pessoas que fazem uso de drogas imunodepressoras (CZUPRYNSKI, 1994; ROCOURT & COSSART, 1997).

A listeriose tem como agente etiológico a *Listeria monocytogenes*, um coco-bacilo Gram-

<sup>1</sup>Universidade do Amazonas, Departamento de Ciências de Alimentos – Rua Alexandre Amorim, 330 – Aparecida - CEP 69010-300 - Manaus-AM.

<sup>2</sup>INPA/CPCS. Laboratório de Virologia Tropical, Av. André Araújo 2936. Aleixo, CEP: 69060-001, Manaus-AM, crvcosta@inpa.gov.br. \*Autor para correspondência.

positivo curto, não esporulado, microaerófilo e anaeróbico facultativo, catalase positivo, psicrotrópico, móvel à temperatura de 25°C e tolerante a NaCl (DEVER, 1993; DONELLY, 1992; ISOM, 1995; JAY, 1992; ROCOURT & COSSART, 1997). Esse microrganismo ocorre no solo, água de superfície, lago, detritos, silagem, fezes de indivíduos sadios, fezes de animais e ambientes saprofiticos vegetais (DONELLY, 1992; NOTERMANS, 1998; ROCOURT & COSSART, 1997). Alguns trabalhos relatam o isolamento da *Listeria* spp. em ambientes domésticos (utensílios de cozinha, banheiro), pescado defumado, camarão industrializado, carnes, frangos, vegetais, superfície de processamento de alimentos, plantas de processamento de laticínios em leite cru e pasteurizado e queijos (BEUMER, 1996b; BLACKMAN & FRANK, 1996; FENLON, 1996; HOFER & RIBEIRO, 1990; LONCAREVIC, 1998; MARGOLLES, 1997; MOURA, 1993; PRITCHARD, 1994; SILVA, 1998).

O gênero *Listeria* pertence à subdivisão *Clostridium* e sete espécies são conhecidas: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii* (subespécie *ivanovii* e *londoniensis*), *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi* e *L. murrayi*. Apenas a *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são consideradas virulentas, sendo que a *L. monocytogenes* pode causar doença para o ser humano e a *L. ivanovii* para os animais. As outras espécies são consideradas não patogênicas. A *L. monocytogenes* possui treze padrões antígenos O, que compreendem os sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4ab e 7. Os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b são os mais frequentemente isolados em casos humanos (BHUNIA, 1997; ROCOURT & COSSART, 1997).

A *L. monocytogenes* é considerado um microrganismo tolerante, pois é capaz de se desenvolver sob uma larga faixa de temperatura, crescendo em uma faixa que varia de 3 a 45 °C (BOURGEOIS, 1994).

O consumo de alimentos contaminados com *Listeria monocytogenes* constitui-se no veículo primário de transmissão da doença (ROCOURT & COSSART, 1997). Após a ingestão, e por mecanismos ainda pouco conhecidos, o microrganismo coloniza o trato

gastrointestinal e invade os tecidos (JAY, 1992). A *L. monocytogenes* possui uma proteína de superfície celular, a internalina, que facilita sua invasão em células não fagocitárias. No interior das células a bactéria é envolvida por uma membrana vesicular. No interior da vesícula, este microrganismo, produz uma hemolisina, a listeriolisina O (LLO) que, junto com uma fosfolipase, promove a degradação da membrana da vesícula liberando o microrganismo para o citoplasma celular, onde ocorre o processo da multiplicação da *L. monocytogenes*. A seguir, ocorre a formação de filamentos de actina que permitem o microrganismo se movimentar no interior da célula, de onde é impulsionado para outras células periféricas, infectando-as. Através de células macrofágicas, a *L. monocytogenes* alcança os vasos linfáticos, linfonodos mesentéricos e corrente sanguínea, sendo então, disseminada para outros tecidos e órgãos caracterizando um quadro de listeriose clínica (BHUNIA, 1997; CZUPRYNSKI, 1994).

Em mulheres grávidas, os sintomas mais frequentes da doença assemelham-se a uma gripe acompanhada de febre, mialgia ou cefaléia. As conseqüências mais graves podem ser observadas nos fetos, caracterizadas por morte fetal, septicemia grave, neonatal, meningite e aborto. Em adultas não grávidas, pode ocorrer frequentemente meningite ou meningoencefalite (ROCOURT & COSSART, 1997).

No Estado do Amazonas – Brasil, alguns municípios produtores de leite fabricam queijo coalho de forma artesanal. A forma de preparo dos queijos não apresenta critérios padronizados de produção. Alguns fatores tais como a forma de produção, locais de processamento e venda, contribuem para a contaminação dos queijos por bactérias indicadoras de contaminação fecal e outras potencialmente patogênicas, como a *Listeria monocytogenes*. Assim, considerando-se o sistema artesanal e a comercialização de queijo tipo coalho em feiras e mercados da cidade de Manaus, pesquisou-se a ocorrência de *Listeria* sp neste alimento, buscando-se identificar a presença de *Listeria monocytogenes*, e, então apontar possíveis fatores que possam estar implicados na contaminação do queijo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram obtidas 58 amostras de queijo artesanal tipo coalho, com peso aproximado de 250 g cada, em feiras e mercados registrados na Prefeitura Municipal de Manaus situados em seis diferentes zonas da cidade (Tabela 1), no período de março a maio de 1998. As amostras coletadas foram embaladas em saco plástico de primeiro uso, identificadas e transportadas em caixa isotérmica com gelo para o laboratório, com início imediato das análises.

Na pesquisa de *Listeria* sp foi utilizada a metodologia tradicional da FDA (Food and Drug Administration), descrita por HITCHINS, (1992), com pequenas modificações. Incluíram-se na técnica meios e reagentes, como o caldo Fraser, o ágar PALCAM e o API *Listeria* utilizados na Metodologia Qualitativa proposta por FABER *et al.* (1994) do Governo do Canadá, a fim de aumentar as chances de isolamento dos microrganismos.

De cada amostra foram pesados asepticamente 25 g, colocados em saco plástico estéril contendo 225 ml de caldo para pré-enriquecimento de *Listeria* (LEB) e, após homogeneização, a amostra foi incubada por 24 a 48 horas. Decorrido o tempo de incubação, procedeu-se ao enriquecimento, transferindo-se 0,1 ml de caldo LEB para tubo de ensaio contendo 9 ml de caldo Fraser modificado. Em seguida, o tubo foi incubado a 35°C por 24 a

48 horas. Os tubos que apresentaram os meios escurecidos foram semeados em placas por estriamento, nos meios de ágar PALCAM suplementado com sulfato de polimixina B, ceftazidima e acriflavina e ágar cloreto de lítio-feniletanol-moxalactam (LPM). As placas de ágar PALCAM foram incubadas a 35°C por 24 a 48 horas e as que continham o meio LPM foram incubadas a 30°C por 24 a 48 horas. As colônias que se desenvolveram no ágar LPM foram observadas na própria placa de crescimento posicionada sobre um tripé com um espelho à frente, sobre o qual incidia uma luz emitida por uma fonte luminosa em ângulo de 45°. As colônias típicas de *Listeria* spp, quando observadas desta forma, apresentam coloração azul-esverdeada (HITCHINS, 1992). Colônias suspeitas foram isoladas de cada meio e purificadas em ágar tripton de soja em tubo inclinado adicionado de 0,6% de extrato de levedura e, posteriormente, incubadas a 35°C por 24 horas. Deste material foi preparada uma suspensão em lâmina para submetê-la à coloração de Gram para observação da morfologia bacteriana e, em seguida, foram realizados testes bioquímicos com fins confirmatórios, de acordo com os procedimentos sugeridos pelo Bacteriological Analytical Manual - BAM (HITCHINS, 1992). O API-*Listeria*, foi realizado de acordo com a metodologia descrita (BEUMER, 1996a; DEVER, 1993).

**Tabela 1-** Zoneamento da cidade de Manaus com seus respectivos bairros.

ZONA	BAIRRO
Centro-oeste	Alvorada, Redenção, Bairro da Paz, Planalto, D. Pedro
Centro-sul	Parque 10, Adrianópolis, Aleixo, Chapada, Flores, Nossa Senhora das Graças.
Leste	Jorge Teixeira, Tancredo Neves, Zumbi, Armando Mendes, Colônia Antônio Aleixo, Coroado, Mauzinho, Distrito Industrial, São José
Norte	Cidade Nova, Santa Etelvina, Terra Nova, Novo Israel, Monte das Oliveiras, Colônia Santo Antônio
Oeste	Compensa, Nova Esperança, São Raimundo, São Jorge, Santo Antônio, Ponta Negra, Lírio do Vale, Glória, Santo Agostinho
Sul	Petrópolis, Japiim, Educandos, Crespo, São Lázaro, Santa Luzia, Colônia Oliveira Machado, Vila Buriti, São Francisco

Fonte: Prefeitura Municipal de Manaus-PMM

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo detectou-se a *Listeria* sp, em duas amostras de queijo. Em uma amostra do produto coletada na zona Centro-Sul da cidade detectou-se a presença de *L. monocytogenes* e em outra amostra, coletada na zona Oeste, foi detectada a presença de *L. innocua*. As duas amostras positivas para essas espécies de *Listeria* representaram 3,4% do total de amostras analisadas. As análises sorológicas revelaram que as sorovarietades de *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* eram 1/2b e 6a, respectivamente. Apenas a *L. monocytogenes* é considerada patogênica para o homem e a sorovarietade 1/2b deste microrganismo encontrada no presente trabalho está também entre aquelas mais isoladas de infecções humanas: 1/2a e 4b (ROCCOURT & COSSART, 1997).

A presença de *Listeria* sp. em amostras de leite e derivados e nos locais de processamento vem sendo confirmada por vários estudos (FARBER, 1994; BEUMER, 1996; SILVA, 1998). No Brasil, MOURA *et al.* (1993) investigaram a ocorrência de espécies de *Listeria* em amostras de leite cru e pasteurizado produzidos na cidade de São Paulo. Do total de 220 amostras de leite cru analisadas 12,7% foram positivas para *Listeria* spp. e destas, 25% eram positivas para *L. monocytogenes*, 21,4% positivas para *L. innocua* e 53,6% positivas para outras espécies. Das 220 amostras de leite pasteurizado apenas duas (0,9%) foram positivas para *Listeria* spp e ambas eram *L. innocua*. Os resultados do estudo confirmam que a pasteurização pode minimizar a presença daqueles microrganismos em laticínios.

O leite de origem bovina foi obtido pelo processo de ordenha manual, com as implicações naturais do método. A produção do queijo tipo coalho segue igualmente o modelo artesanal em todas as suas etapas. Após a sua produção, o produto é transportado das pequenas fazendas até as feiras-livres da cidade de Manaus, durante esse percurso que tem em média 100 km, os queijos permanecem em temperatura ambiente que fica em torno dos 30°C, durante todo o ano. Na fase da comercialização, o queijo é exposto do mesmo

modo que os produtos comercializados em feiras-livres.

Embora a ocorrência de *L. monocytogenes* em alimentos possa ser minimizada pelas boas práticas de produção aliada a higienização de equipamentos, é importante ressaltar que o uso de tratamentos físicos (aplicação de calor) ou químicos, é fundamental para assegurar a ausência daquele patógeno nos produtos, como recomenda a Legislação Brasileira (BRASIL, 1996).

A aplicação de tratamento térmico (pasteurização) ao leite destinado à produção de queijo, é uma medida obrigatória exigida pela Legislação Brasileira do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1980). Apesar da pasteurização apresentar como desvantagens o aumento no custo de processamento e diminuição das características organolépticas do queijo (aroma e sabor), a sua adoção pode eliminar bactérias patogênicas e produtoras de gás, garantir uniformidade ao produto e aumentar o seu rendimento (WILSTER & TORREZAN, 1998).

Recentemente, a obrigatoriedade da identificação de *Listeria* sp em leite e seus derivados foi incluída em uma nova Resolução que estabelece Critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos e substitui a Portaria anterior e torna inaceitável a presença de qualquer espécie deste microrganismo em 25 gramas ou mililitros do produto analisado (BRASIL, 1998; BRASIL, 2001).

## CONCLUSÕES

Detectou-se a presença, de *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua*, em duas amostras dentre as 58 analisadas, sendo que a primeira espécie é um microrganismo potencialmente patogênico para a espécie humana. Constata-se ainda que a presença da *Listeria* no queijo coalho artesanal está em desacordo com a legislação Legal vigente que não tolera a presença de quaisquer espécies de microrganismos patogênico, no item alimentar. Os resultados deste estudo, aliados as informações colhidas a partir das observações nos locais de produção, transporte e venda do queijo fornecem fortes evidências de condições que favorecem a contaminação do produto com microrganismos indicadores e patogênicos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório Central de Saúde Pública, pela utilização de suas instalações físicas e equipamentos para a realização das análises; à Universidade do Amazonas pelo suporte financeiro.

## BIBLIOGRAFIA CITADA

- Beumer, R.R. *et al.* 1996. Confirmation and identification of *Listeria* spp. *Letters in Applied Microbiology*, 22:448-452.
- Bhunia, A. (1997). Antibodies to *Listeria monocytogenes*. *Critical Reviews in Microbiology*, 23(2): 77-107.
- Blackman, I.C.; Frank, J.F. (1996). Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. *Journal of Food Protection*, 59(8): 827-831.
- Bourgeois, C.M.; Mescle, J.F.; Zucca, J. 1994. *Microbiología Alimentaria. Aspectos Microbiológicos de La Seguridad y Calidad Alimentaria*. Zaragoza: Editorial Acribia. 437 p.
- Brasil. Ministério da Agricultura 1980. Regulamentação da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília: Ministério da Agricultura, 166p.
- Brasil. Portaria Nº 146, de 7 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília. n.48, 11 mar. 1996. Seção 1.
- Brasil. Portaria Nº 451, de 19 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico Princípios Gerais para o estabelecimento de Critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos e seus Anexos I, II e III. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília. 2 jul. 1998. Seção 1.
- Brasil. Resolução-RDC Nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico Princípios Gerais para o estabelecimento de Critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos e seus Anexos. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília. 10 jan. 2001. Seção 1.
- Czuprynski, C.J. 1994. Host defense against *Listeria monocytogenes*: implications for food safety. *Food Microbiology*, 11: 131-147.
- Dever, F.P.; Schaffner, D.W.; Slade, P.J. 1993. Methods for the detection of foodborne *Listeria monocytogenes* in the United States. *Journal of Food Safety*, 13: 263-292.
- Donnelly, C.W. *et al.* (1992). *Listeria*. In: Compendium of Methods for the Examination of Foods. American Public Health Association 3. ed. 637-363.
- Farber, J.M.; Warburton, D.W.; Babiuk, T. (1994). Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. Government of Canadá. Health Protection Branch. 1-16.
- Fenlon, D.R.; Wilson, J.; Donachie, W. 1996. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. *Journal of Applied Bacteriology*, 81: 641-650.
- Garcia-Cruz, C.H.; Hoffman, F.H.; Vinturim, T.M. 1994. Estudo microbiológico de queijo tipo Minas-frescal de produção artesanal, comercializado na cidade de São José do Rio Preto-SP. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 54(2): 78-82.
- Hitchins, A.D. (1992). *Listeria monocytogenes*. In: *Bacteriological Analytical Manual*. 7 ed. Arlington: AOAC International, 141-151.
- Hofer, E.; Ribeiro, R. (1990). Ocorrência de espécies de *Listeria* em camarão industrializado. *Revista de Microbiologia*, 21(2): 207-208.
- Isom, L.L. *et al.* (1995). Filament formation in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 58: 1031-1033.
- Jay, J.M. 1992. Listeriosis transmitida por alimentos. In: *Microbiologia Moderna de los Alimentos*. 3.ed. Zaragoza: Editorial Acribia. p. 601-639.
- Loncarevic, S. *et al.* 1998. Potential sources of human listerioses in Sweden. *Food Microbiology*, 15: 65-69.

- Margolles, A.; Rodríguez, A.; Reyes-Gavilán, C.G. Delos. 1996. Some chemical and bacteriological characteristics of regional cheeses from Asturias, Spain. *Journal of Food Protection*, 59(5): 509-515.
- Moura, S.M.; Destro, M.T.; Franco, B.D.G.M. (1993). Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 19: 229-237.
- Notermans, S. et al.(1998). Studies on the Risk Assessment of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 61(2): 244-248.
- Pritchard, T.J. et al. 1994. Increased incidence of *Listeria* species in dairy processing plants having adjacent farm facilities. *Journal of Food Protection*, 57(9): 770-775.
- Rocourt, J.; Cossart, P. 1997. *Listeria monocytogenes*. In: Doyle, M.P.; Beuchat, L.R.; Montville, T.J. Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. 337-352.
- Silva, M.C.D.; Hofer, E.; Tibana, A. 1998. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Food Protection*, 61 (3):354-356.
- Wilster, G.H.; Torrezan, R. 1998. Influência do tratamento térmico do leite destinado à fabricação de queijo. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, 16, (2): 149-170.

**Recebido: 19/02/2002**

**Aceito: 11/02/2003**