

Presença de *Listeria sp.* em queijos tipo colonial no Brasil: risco potencial para a saúde pública

Listeria sp. presence in Brazilian colonial cheese: potential risk to public health

Celso Pianta¹, Sérgio José de Oliveira¹, Luiz Cesar Bello Fallavena¹, Anamaria Telles Esmeraldino¹

Recebido em 12/09/2007; aprovado em 11/07/2008.

RESUMO

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de isolar microrganismos do gênero *Listeria*. Para tanto foram analisadas 161 amostras de queijos comercializados em diversos pontos de venda do Estado do Rio Grande do Sul, no período compreendido entre os anos 2003 e 2006. As análises microbiológicas para o isolamento do agente seguiram a metodologia oficial do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil. Em 12 amostras bacterianas inicialmente classificadas como pertencentes ao gênero *Listeria* foram observadas as características relativas à morfologia colonial em meios seletivos e Ágar-sangue, morfologia e coloração dos microrganismos, fermentação de açúcares e reação no CAMP teste. Os resultados obtidos mostraram que a espécie *Listeria innocua* foi a mais prevalente, tendo sido isolada de 10 amostras, seguida de *L. monocytogenes*, isolada em duas amostras.

PALAVRAS-CHAVE: queijos coloniais, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, saúde pública.

SUMMARY

This work was carried out aiming to isolate microorganisms belonging to the *Listeria* genus. For that purpose, 161 samples of commercial colonial cheese obtained in several geographic regions of Rio Grande do Sul, from 2003 to 2006, were bacteriologically examined according to the official protocol of Brazilian Ministry of Agriculture. Isolated

of *Listeria sp.* from 12 samples were examined regarding to phenotypic characteristics based on colonial morphology, elective culture media and blood agar, type of hemolysis, sugar fermentation and CAMP test. *Listeria innocua* was the most frequent isolate from 10 cheese samples, followed by *L. monocytogenes* which was isolated from 2 samples.

KEY WORDS: colonial cheese, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, public health.

INTRODUÇÃO

O gênero *Listeria* está amplamente distribuído na natureza e já foi isolado de diferentes locais como solo, água, vegetais, alimentos crus e processados, no leite cru, queijo, assim como de humanos e animais portadores sadios da bactéria que não apresentam nenhum sinal clínico da doença (KAMPELMACHER e JANSEN, 1972). A espécie *Listeria monocytogenes* foi isolada de 42 diferentes espécies de mamíferos e de varias espécies de aves, peixes e insetos (SWAMINATHAN et al. 1995).

A característica mais importante do ponto de vista da ecologia microbiana, é a capacidade deste agente em sobreviver na temperatura de 5°C ou ainda mais baixa (BARROW e FELTHAM, 1993), podendo sobreviver por até um ano no leite conservado a esta temperatura (BRASIL, 1992). Segundo a Comissão Internacional para Especificações Microbiológicas de Alimentos (ICMSF, 1996), o microrganismo pode ser isolado de materiais contaminados como a água destilada ou

¹ Universidade Luterana do Brasil-Curso de Medicina Veterinária-Av. Farroupilha, 8001- Bairro São José-Canoas- RS- Brasil; CEP92425-900; Fax: 55 51 3477 9284. E-mail: celsopianta@click21.com.br.

caldo nutritivo depois de um longo período de incubação (semanas ou meses) sob temperatura de refrigeração, onde possivelmente pode multiplicar-se.

Com relação à doença causada por estes agentes, esta ocorre em casos esporádicos ou em surtos epidêmicos e nas duas situações, os alimentos contaminados são os veículos responsáveis pela transmissão da doença ao homem (MURRAY et al. 1995). Poucos são os casos da doença em que os alimentos não estão envolvidos, como o que ocorreu entre crianças recém nascidas em uma maternidade dos Estados Unidos, onde a *L. monocytogenes* foi transmitida pelo óleo mineral utilizado para a higiene das crianças (SCHUCHAT et al, 1991). Estes autores também relatam que a patogenia deste agente nas infecções humanas pode resultar em meningite, encefalite ou septicemia com taxa de mortalidade variando de 20 a 50% e nas gestantes pode ser a causa de infecção do feto que poderá resultar em aborto, morte do neonato ou nascimento prematuro.

O primeiro surto de listeriose humana foi registrado na Alemanha entre os anos 1949-1957, no entanto foi em 1981 que houve a comprovação pela primeira vez da importância dos alimentos na

transmissão da doença, devido ao consumo de salada de repolho cru no Canadá (RYSER, 1999).

Em 18 casos relatados de listeriose humana, o leite e seus derivados foram identificados como possíveis fontes de infecção, com um variado número de pessoas envolvidas, como pode ser observado na Tabela 1.

De acordo com o Programa de Informação de Doenças Transmitidas por Alimentos dos EEUU em 1977, houve a notificação de 77 casos na população humana em cinco diferentes Estados, que resultaram em 36 mortes, sendo 15 devidas à *L. monocytogenes* (WALLACE et al., 2000).

No Brasil, *L. monocytogenes* foi isolada de amostras de diferentes tipos de queijos elaborados em diversas regiões geográficas do País.

No Município do Rio de Janeiro, o agente foi isolado em 10,7% (11/103) dos queijos analisados, sendo que o tipo Minas Frescal (Queijo fresco artesanal, elaborado a partir de leite cru) mostrou a mais alta prevalência, 41% de 47 amostras; também houve isolamento deste agente em amostras de queijos maturados adquiridos no comércio local (SILVA et al., 1998).

Tabela 1 - Casos de listeriose mais importantes descritos nos quais o leite e produtos derivados foram os veículos da transmissão (RYSER, 1999).

LOCALIZAÇÃO	ANO	NÚMERO DE CASOS	POSSÍVEL VEÍCULO DE INFECÇÃO
Alemanha	1949-57	Aprox. 100	Leite cru, queijo <i>Cottage</i> e outros lácteos
Massachusetts (EEUU)	1979	20	Leite cru e outros alimentos
East Cambria (RU)	1981	11	Nata
Massachusetts (EEUU)	1983	49	Leite pasteurizado
Vaud (Suíça)	1983-87	122	Queijo <i>Vacherin Mont D'Or</i>
Los Angeles (EEUU)	1985	142-300	Queijo fresco estilo mexicano
Linz (Austria)	1986	20	Leite cru
Los Angeles (EEUU)	1987	11	Manteiga
Dinamarca	1989-90	26	Queijo azul ou duro
Illinois (EEUU)	1994	66	Leite achocolatado
França	1995	33	Queijo <i>Brie de Meaux</i>
França	1997	14	Queijo <i>Pont l'Eveque</i>

No Rio Grande do Sul (RS), as espécies *L. monocytogenes* e *L. innocua* foram isoladas em amostras de queijo Colonial comercializadas na cidade de Porto Alegre (SCHWAB, 1996). Em um estudo realizado na região noroeste deste Estado, foi isolada *L. innocua* em apenas uma das 75 amostras analisadas e não houve o isolamento de *L. monocytogenes* (SCHITTLER, 2002). A espécie *Listeria innocua* foi a única espécie isolada em 6 de 100 amostras de queijo Colonial elaborado na região serrana do RS (PIANTA, 2003), enquanto na região sul, *L. innocua* em todas as três amostras de queijo artesanal adquiridas na cidade de Pelotas (JANTZEN, 2004). Em outro estudo realizado na região Centro-Serra do RS, *L. innocua* foi isolada em 4 amostras de queijo artesanal tipo Colonial e *L. monocytogenes* em 2 amostras de queijo industrializado (BERNARDY et al., 2006).

Na região do Nordeste (NE) 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* sp. e 5,5% positivas para *Listeria monocytogenes* (DUARTE et al., 2005). Nesta mesma região do País, amostras de queijo de coalho (11 amostras) e de queijo de manteiga (13 amostras), produzidas no Estado do Rio Grande do Norte, revelaram a presença de *Listeria* sp. em 9% e 15% das amostras de queijos tipo coalho e tipo manteiga, respectivamente (FEITOSA et al., 2003). No estado do Ceará (NE), 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* (SOUZA et al., 2006). Ainda na cidade de Fortaleza, outro estudo analisou 84 amostras de queijo de coalho industrializado, sendo que 16 (19%) estavam contaminadas com *Listeria monocytogenes*, 5 (5,9%) com *Listeria innocua* e 1 (1,2%) com *Listeria grayi* (BRANCO et al., 2003).

Na cidade de Salvador, Bahia (NE), de 17 amostras analisadas de queijo tipo coalho, a presença de *L. monocytogenes* foi evidenciada em apenas uma delas (LEITE et al., 2002).

Embora todas as espécies do gênero possam contaminar os alimentos, apenas *L. monocytogenes*

é considerada patogênica para o homem representado, portanto, um fator de risco para a saúde pública. A presença de qualquer espécie de *Listeria* sp. pode ser indicadora da presença de *L. monocytogenes*, ainda que esta não tenha sido isolada, pois esta espécie é menos competitiva que as outras em qualquer meio de cultura, especialmente frente a alguns agentes seletivos como os rotineiramente utilizados nos meios laboratoriais (WALDROUP, 1996).

O objetivo do presente artigo foi avaliar o risco potencial à saúde pública pela ingestão de queijos contaminados com *Listeria*, tanto os adquiridos em pontos comerciais no Estado do Rio Grande do Sul como os analisados em outras regiões do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 161 amostras de queijo tipo colonial, sendo 158 elaboradas de forma artesanal e três industrializadas. Deste total, 55 foram produzidas e comercializadas na região do Litoral Norte do RS, 45 na região da Serra e as restantes 61 na região Central do Estado.

As amostras foram conservadas no máximo por 24h em caixas isotérmicas antes de serem enviadas para análise no laboratório de microbiologia da Faculdade de Medicina Veterinária da ULBRA- RS. A maioria destes queijos encontrava-se à temperatura ambiente nos pontos de venda, independente da época do ano em que foram adquiridas. As temperaturas variaram de mais de 30°C no verão até 5°C no inverno. Estes queijos adquiridos não possuíam uniformidade de maturação, sendo alguns maturados por três dias (sem a formação da casca) e outros com maturação aproximada de 20 dias.

As 161 amostras analisadas de queijo colonial foram adquiridas no comércio local ou diretamente dos produtores nas regiões pesquisadas. Estas amostras constituíram-se de formas inteiras ou porções de no mínimo 250g cada, devidamente identificadas armazenadas e transportadas ao laboratório em caixas isotérmicas.

A metodologia empregada para o isolamento deste agente nos alimentos foi a recomendada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (BRASIL, 2003).

Alíquotas de 25g de cada amostra de queijo foram diluídas em 225 mL caldo de enriquecimento seletivo (LEB), homogeneizadas durante 60 segundos em “Stomacher” e incubadas a 30°C por 24h. Após este período, 0,1 mL do caldo LEB foi transferido para tubos contendo caldo Frasier suplementado com citrato de amônio e ferro III e novamente incubados por 24-48h a 30°C.

Dos tubos que apresentaram enegrecimento do caldo Frasier (hidrólise da esculina), foi semeado o volume de uma alça de platina em placas contendo os meios Ágar Oxford (AO) e Ágar Palcam (AP) e novamente incubada nas condições anteriormente descritas.

As colônias com características presuntivas de pertencer ao gênero *Listeria* foram selecionadas e após a coloração de Gram, prova da catalase e motilidade a 25°C, foram submetidas ao teste de CAMP (frente ao *Staphylococcus aureus*), verificação de β -hemólise e fermentação dos carboidratos manitol, xilose e ramnose.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 161 amostras analisadas de queijo colonial, 12 apresentaram contaminação por microrganismos de gênero *Listeria*, segundo os resultados das provas morfológicas, tintoriais e bioquímicas realizadas, o que permitiu a classificação das espécies *L. monocytogenes* e *L. innocua* (Tabela 2).

Das 161 amostras analisadas de queijo tipo colonial, 12 mostraram contaminação por

microrganismos do gênero *Listeria*. A evidência da presença deste agente foi obtida após a realização das provas morfológicas e tintoriais, reações enzimáticas e bioquímicas, bem como pela observação da fermentação de carboidratos. Foram identificadas as espécies *Listeria innocua* e *L. monocytogenes* em 10 e em 2 amostras de queijo, respectivamente.

Das amostras de queijos artesanais, elaboradas a partir do leite sem tratamento, foi isolada apenas *L. innocua*, enquanto *L. monocytogenes* foi obtida a partir de duas amostras de queijo industrializado.

Os resultados encontrados estão de acordo com os obtidos por Schwab (1996), Schittler (2002), Pianta (2003), Jantzen (2004) e Bernardy (2006), que trabalharam com o mesmo tipo de queijo no Estado do RS. Os resultados aqui encontrados também são semelhantes aos obtidos nas análises bacteriológicas realizadas por Duarte et al. (2005), Feitosa et al. (2003), Souza et al. (2006) e Branco et al. (2003) que analisaram amostras de queijo tipo coalho tradicionalmente produzido e comercializado na região Nordeste do Brasil. Resultados semelhantes também foram encontrados nos exames bacteriológicos realizados em amostras de queijo Minas Frescal comercializado na Região Sudeste por Silva et al. (1998).

As características intrínsecas do queijo tipo colonial tais como o pouco tempo de maturação, alta umidade e baixo teor de sal, oferecem condições para o desenvolvimento de microrganismos do gênero *Listeria*. Mesmo que entre as espécies classificadas, apenas *L. monocytogenes* seja considerada a única

Tabela 2 - Resultados das provas realizadas para a identificação das espécies *L. monocytogenes* e *L. innocua* em 161 amostras de queijo analisadas.

Prova ou teste	<i>L. monocytogenes</i> (2)	<i>L. innocua</i> (10)
Gram	+	+
Catalase	+	+
Motilidade	+	+
β -hemólise	+	-
CAMP (<i>S. aureus</i>)	+	-
Fermentação do Manitol	-	-
Fermentação da Xilose	-	-
Fermentação da Ramnose	+	+

() O número entre parênteses representa o total de amostras isoladas e classificadas.

espécie francamente patogênica do gênero, a presença de *L. innocua* no alimento pode servir de alerta sobre a possibilidade da presença concomitante de *L. monocytogenes*, pois esta espécie é menos competitiva que as outras espécies do gênero quando cultivada sobre os meios de cultivo especialmente na presença de agentes seletivos como os utilizados no presente trabalho. Deve ser destacado como ponto comum entre estes resultados que os três tipos de queijos analisados são tradicionalmente elaborados de forma artesanal, com período de maturação muito curto (poucos dias), com baixo teor de cloretos, o que permite a manutenção de alta umidade neste alimento e a conseqüente manutenção de um ambiente físico propício para o desenvolvimento bacteriano.

CONCLUSÕES

A presença deste agente no alimento destinado ao consumo humano constitui-se num risco potencial de infecção principalmente quando consideramos a severidade da listeriose em mulheres grávidas e pessoas idosas.

A presença deste microrganismo foi detectada em alguns tipos de queijos elaborados e comercializados em diferentes regiões do Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROW, G. I.; FELTHAM, R. K. A. **Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria**. 3.ed. Cambridge University Press, Londres, Reino Unido. 1993.331p.
- BERNARDY, R.; TOCHETTO, L.G.; FONSECA, S.H.; PIANTA, C. Isolamento e classificação de espécies de *Listeria* em queijos tipo colonial da região Centro-Serra do Estado do rio Grande do Sul. **Veterinária em Foco**, Canoas, v.4, n.1, jul/dez., p. 45-52, 2006.
- BRANCO, M.A.A.C. et al. **Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente**. Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, Curitiba: CPPCA, 2003. 408p. Boletim Técnico, 2.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Abastecimento e Reforma Agrária. **Métodos de análise microbiológica para alimentos**. Secretaria Geral de Defesa Agropecuária, Brasil. 1992.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa Nº62**, de 26 de agosto de 2003. Publicado no D.O.U. Brasília, DF, 18 de setembro de 2003- Seção I.
- DUARTE, D.A.M. et al. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**; São Paulo, v.72, n.3, jul./set., p.297-302, 2005.
- FEITOSA, T. et al. Pesquisa de *Salmonella sp.*, *Listeria sp.* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, Campinas, vol.23, supl. dez. 2003.
- I.C.M.S.F. Vol 5, **Microorganisms in Foods. Microbial Specifications of Food Pathogens**. Blackie Academic & Professional, Londres, Reino Unido. 1996.431p.
- JANTZEN, M.M. Bactérias potencialmente enteropatogênicas em queijo e carne moída comercializados em Pelotas - RS. In: SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR, 1, Gramado, RS, **Anais digitais**, 2004.
- KAMPELMACHER, E.H.; VAN NOORLE JANSEN, L.J.. Further studies on the isolation of *Listeria monocytogenes* in clinically healthy individuals. **Zentralblatt Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene. Abstrakt Originale** v.221, p.70-77, 1972.
- 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**, Novembro, Nº 02, p. 38-41, 2002.
- MURRAY, P.R. et al. (eds.) **Manual of Clinical Microbiology**. 6.ed. American Society for Microbiology Press, Washington D.C. , Estados Unidos. 1995. 1482p.
- PIANTA, C. **Calidad Higiênico-Sanitaria del Queso Colonial**. 2003, 168p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade de León, Espanha.

- RYSER, E.T. Foodborne listeriosis. In: Ryser, E.T.; Marth, E.H. **Listeria, Listeriosis and food safety**. New York : Marcel and Dekker, 1999. 280p.
- SCHITTLER, L. et al. Avaliação da incidência de *Listeria monocytogenes* em queijos coloniais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 18., Porto Alegre, 2002. **Anais...** Porto Alegre . 2002.
- SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C.V. Epidemiology of human listeriosis. **Clinical Microbiology Review**, v.4, p.169,1991.
- SCHWAB, J.P.; BECHTEL, M.A.B.; SCHUCH, D.M.T. *Listeria monocytogenes* em queijo colonial artesanal comercializado em Porto Alegre. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v.24, n.1, p.95-106, 1996.
- SILVA, M.C.D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, v.61, n.3, p.354-356. 1998.
- SOUSA, R. A. et al. 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., jan./ fev. 2006.
- SWAMINATHAN, B.; ROCOURT, J.; BILLE, J. *Listeria*. In: MURRAY ;E.J. et al. **Manual of Clinical Microbiology** , 6.ed. Washington: American Society for Microbiology (ASM), 1995.1482p.
- WALDROUP, A.L. Contamination of raw poultry with pathogens. **World Poultry Science Journal**, v.52, p.7-25. 1996.
- WALLACE, D.J. et al. Incidence of foodborne illness reported by the foodborne diseases active surveillance network. **Journal of Food Protection**, v.63, n.6, p.807-809, 2000.