



UNICAMP

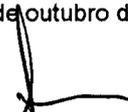
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Contagem de *Listeria spp* pelo método do Número Mais Provável (*NMP*), avaliação da sua ocorrência em carnes de frango e da eficiência de sanitizantes na redução da contaminação por *Listeria monocytogenes*

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por DIRCE YORIKA KABUKI e aprovada pela Comissão Julgadora em 31 de outubro de 1997.

Campinas, 31 de outubro de 1997.


Prof. Dr. ARNALDO Y. KUAYE
Presidente da Banca

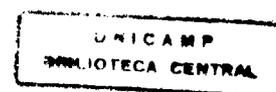
Dirce Yorika Kabuki
Bióloga

Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Orientador

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS para obtenção do Título
de Mestre em Tecnologia de Alimentos**

**Campinas, SP
1997**



UNIDADE	BC		
N.º CHAMADA:			
V.	Ex.		
TOMO B/	32376		
PROC.	28197		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00		
DATA	03/12/97		
N.º CPD			

CM-00103707-0

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

K113c

Kabuki, Dirce Yorika

Contagem de *Listeria* spp pelo método do número mais provável (NMP), avaliação da sua ocorrência em carnes de frango e da eficiência de sanitizantes na redução da contaminação por *Listeria monocytogenes* / Dirce Yorika Kabuki. -- Campinas, SP: [s.n.], 1997.

Orientador: Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Frangos. 2.*Listeria monocytogenes*. 3.Fosfato trissódico.
I.Kuaye, Arnaldo Yoshiteru. II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III.Título.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Presidente



Profa. Dra. Maria Teresa Destro
Membro



Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão
Membro

Profa. Dra. Mirtha Nelly Uboldi Eiroa
Membro

Campinas, ____ de _____ de 1997.

*Aos meus pais, Noritomo e Miyko
por eu existir e
algum dia poder fazer a diferença*

*Ao Arnaldo e a nossa tequinha Ana Paula pelo amor,
compreensão e incentivo...
me permitem realizar e sonhar...*

Agradecimentos

Ao Prof. Arnaldo Yoshiteru Kuaye pela orientação e incentivo;

Ao Prof. Antônio de Melo Serrano pelos ensinamentos, incentivo, sugestões e por acreditar em mim;

À Profa. Maria Teresa Destro pela amizade, pelos primeiros ensinamentos sobre *Listeria* e pelas sugestões e correções da tese;

Ao Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão e à Dra. Mirtha Nelly Uboldi Eiroa pelas sugestões e correções da tese;

À Maria Raquel Manhani e Jacinta R. O. Franco, minhas amigas e companheiras de todos os dias, pela amizade, incentivo e colaboração;

Aos amigos Valéria, Maria Helena, Daniela, Graziela, Ana Paola, Ana Maria, Ana Lourdes, Dora, Alice, Alaíse, Cida, Rosinha, Luciana, Magaly, Ernani, Silvana, Margarida, Afonso, Pedro e Daniel pela amizade e incentivo;

Aos professores, amigos e funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos da FEA - UNICAMP;

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas por possibilitar a realização deste trabalho;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela ajuda financeira na modalidade Auxílio a Projeto de Pesquisa (Proc. 95/6757-6);

Ao Dr. Ernesto Hoffer da Fundação Oswaldo Cruz pela sorotipagem das cepas de *L. monocytogenes* utilizadas nos ensaios de avaliação de sanitizantes;

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho;

Muito Obrigada!

ÍNDICE GERAL

<u>Assunto</u>	<u>Página</u>
ÍNDICE GERAL	<i>i</i>
ÍNDICE DE TABELAS	<i>iv</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>v</i>
ÍNDICE DE ANEXOS	<i>v</i>
<u>RESUMO</u>	<i>vi</i>
<u>SUMMARY</u>	<i>vii</i>
1. <u>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</u>	1
2. <u>OBJETIVOS</u>	3
3. <u>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	4
3.1. <u>TAXONOMIA DE LISTERIA</u>	4
3.2. <u>CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA</u>	5
3.3. <u>LISTERIOSE HUMANA</u>	6
3.3.1. <u>MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS</u>	6
3.3.2. <u>FORMAS DE TRANSMISSÃO</u>	8
3.3.2.1. <u>Transmissão de origem não alimentar</u>	8
3.3.2.2. <u>Transmissão de origem alimentar - Surtos e casos de infecções alimentares</u>	9
3.4. <u>OCORRÊNCIA NO MEIO AMBIENTE</u>	12
3.5. <u>OCORRÊNCIA NAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS</u>	13
3.6. <u>OCORRÊNCIA EM ALIMENTOS</u>	15
3.6.1. <u>ALIMENTOS À BASE DE CARNES DE AVES</u>	16
3.6.2. <u>OUTROS ALIMENTOS</u>	18
3.7. <u>MÉTODOS PARA ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO</u>	19
3.8. <u>TÉCNICA DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP) PARA CONTAGEM</u>	21
3.9. <u>O USO DO FOSFATO TRISSÓDICO NA DESCONTAMINAÇÃO DE CARCAÇAS DE FRANGO</u>	24

4. <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	28
4.1. <u>MATERIAL</u>	28
4.1.1. AMOSTRAS	28
4.1.2. MEIOS DE CULTURA	28
4.1.3. AGENTES QUÍMICOS SANITIZANTES	29
4.1.4. REAGENTES	30
4.1.5. CEPA BACTERIANA	30
4.1.6. EQUIPAMENTOS	30
4.2. <u>MÉTODOS</u>	31
4.2.1. ESTUDO DE METODOLOGIA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE <i>Listeria spp</i> E SUA OCORRÊNCIA EM PEITOS E CARÇAÇAS DE FRANGO	31
4.2.1.1. <u>Amostragem</u>	31
4.2.1.2. <u>Deteccção de <i>Listeria spp</i></u>	31
4.2.1.3. <u>Isolamento e Identificação</u>	32
4.2.1.4. <u>Proposta de Metodologia para Quantificação de <i>Listeria spp</i></u>	34
4.2.1.4.1. Avaliação do Crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em Diferentes Meios de Enriquecimento	34
4.2.1.4.2. Contagem de <i>Listeria spp</i> pela Técnica do NMP	34
4.2.2. AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR <i>L. monocytogenes</i> EM COXAS DE FRANGOS, PELA APLICAÇÃO DE AGENTES QUÍMICOS SANITIZANTES	37
4.2.2.1. <u>Preparo da Suspensão Bacteriana</u>	38
4.2.2.2. <u>Contaminação Artificial das Coxas de Frango</u>	38
4.2.2.3. <u>Preparo das Soluções Sanitizantes</u>	38
4.2.2.4. <u>Tratamento com Agentes Sanitizantes</u>	40
4.2.2.5. <u>Contagem de <i>L. monocytogenes</i></u>	40
4.2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	41

5. <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	42
5.1. <u>ESTUDO DA OCORRÊNCIA E QUANTIFICAÇÃO DE <i>Listeria</i> spp EM PEITOS E CARCAÇAS DE FRANGO</u>	42
5.1.1. CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS COLETADAS	42
5.1.2. OCORRÊNCIA EM PEITOS E CARCAÇAS RESFRIADA DE FRANGO	44
5.1.2.1. <u>Espécies identificadas</u>	48
5.1.2.2. <u>Avaliação da Eficiência dos Meios de Enriquecimento e Isolamento</u>	50
5.1.2.2.1. Meios de Enriquecimento	50
5.1.2.2.2. Meios de Isolamento	51
5.1.3. PROPOSTA DE METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE <i>Listeria</i>	54
5.1.3.1. <u>Avaliação do crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em diferentes meios de enriquecimento</u>	54
5.1.3.2. <u>Quantificação de <i>Listeria</i> spp pela técnica do NMP</u>	54
5.1.3.2.1. Amostras inoculadas com <i>L. monocytogenes</i> Scott-A	54
5.1.3.2.2. Amostras de peito e carcaça de frango	57
5.1.3.3. <u>Avaliação do desempenho dos métodos de NMP</u>	59
5.2. <u>AVALIAÇÃO DO EFEITO DE AGENTES QUÍMICOS NA REDUÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR <i>L. monocytogenes</i></u>	67
6. <u>CONCLUSÕES</u>	72
7. <u>SUGESTÕES</u>	73
8. <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	74
9. <u>ANEXOS</u>	89

ÍNDICE DE TABELAS

	<u>Página</u>
<u>Tabela 1.</u> Características de diferenciação das espécies do gênero <i>Listeria</i> .	6
<u>Tabela 2.</u> Ocorrência de gênero <i>Listeria</i> e <i>L. monocytogenes</i> em carnes de aves obtidas na comercialização e em abatedouros.	17
<u>Tabela 3.</u> Métodos oficiais para isolamento de <i>L. monocytogenes</i> em alimentos.	21
<u>Tabela 4.</u> Dados gerais sobre as amostras de peito resfriado de frango.	42
<u>Tabela 5.</u> Dados gerais sobre as amostras de carcaça resfriada de frango.	43
<u>Tabela 6.</u> Frequência de amostras positivas para o gênero <i>Listeria</i> e <i>L. monocytogenes</i> em amostras resfriadas de peito e carcaças de frango.	44
<u>Tabela 7.</u> Frequência de amostras positivas para o gênero <i>Listeria</i> e <i>L. monocytogenes</i> em LEB, LEB-MFB e em LEB combinado com LEB-MFB e plaqueamento em LPM e MOX.	50
<u>Tabela 8.</u> Frequência de amostras positivas para gênero <i>Listeria</i> e <i>L. monocytogenes</i> em ágar LPM e MOX a partir do enriquecimento em LEB e MFB.	52
<u>Tabela 9.</u> Frequência de amostras positivas para gênero <i>Listeria</i> e <i>L. monocytogenes</i> em LPM e MOX a partir do LEB e LEB-MFB.	53
<u>Tabela 10.</u> Estimativa da população de <i>L. monocytogenes</i> Scott A em suspensões preparadas com solução peptonada, utilizando 3 diferentes meios de enriquecimento e técnica do NMP.	56
<u>Tabela 11.</u> Estimativa da população de <i>L. monocytogenes</i> Scott A em suspensões preparadas com água de enxágüe de carcaça, utilizando 3 diferentes meios de enriquecimento e técnica do NMP.	57
<u>Tabela 12.</u> Número Mais Provável (NMP) do gênero <i>Listeria</i> em amostras de peito resfriado de frango.	60
<u>Tabela 13.</u> Número Mais Provável (NMP) de <i>L. monocytogenes</i> em amostras de peito resfriado de frango.	61
<u>Tabela 14.</u> Número Mais Provável (NMP) do gênero <i>Listeria</i> em amostras de carcaça resfriada de frango.	64
<u>Tabela 15.</u> Número Mais Provável (NMP) de <i>L. monocytogenes</i> em amostras de carcaça resfriada de frango.	65

<u>Tabela 16.</u> Número Mais Provável (<i>NMP</i>) pelo uso do caldo MdFB e detecção de <i>Listeria</i> sp e <i>L. monocytogenes</i> em carcaça resfriada de frango.	66
<u>Tabela 17.</u> Contagem de <i>L. monocytogenes</i> em coxas de frango artificialmente contaminadas após imersão em soluções de fosfato trissódico a 25°C por 1 minuto.	70
<u>Tabela 18.</u> Contagem de <i>L. monocytogenes</i> em coxas de frango artificialmente contaminadas após imersão em soluções de hipoclorito de sódio a 4°C por 20 minutos.	70
<u>Tabela 19.</u> Efeito dos tratamentos com fosfato trissódico e hipoclorito de sódio sobre <i>L.monocytogenes</i> aderidos a pele de coxas de frangos.	71
<u>Tabela 20.</u> Análise de variância para os tratamentos com fosfato trissódico.	71
<u>Tabela 21.</u> Análise de variância para os tratamentos com hipoclorito de sódio.	71

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura 1.</u> Esquema da metodologia para detecção de <i>Listeria</i> spp em frangos (McCLAIN & LEE, 1989 - modificado).	33
<u>Figura 2.</u> Esquema da metodologia para quantificação de <i>Listeria</i> spp pela técnica do <i>NMP</i> .	36
<u>Figura 3.</u> Esquema para avaliar a eficiência de agentes sanitizantes na redução da contaminação de coxas de frango artificialmente inoculadas com <i>L. monocytogenes</i> .	39
<u>Figura 4.</u> Identificação de espécies de <i>Listeria</i> pelo sistema API.	49
<u>Figura 5.</u> Curvas de crescimento de <i>L. monocytogenes</i> Scott-A em diversos meios.	55

ÍNDICE DE ANEXOS

<u>Anexo 1.</u> Protocolo do sistema API para Identificação de <i>Listeria</i> .	89
<u>Anexo 2.</u> Tabela do Número Mais Provável para série de 3 tubos.	91

RESUMO

Atualmente a *L. monocytogenes* é considerada um patógeno de importância em alimentos, pois vários surtos e casos de listeriose associados ao consumo de alimentos têm sido relatados, incluindo os produtos de frango. O aumento da produção brasileira de carnes de aves, a redução de preço no mercado interno e conseqüente aumento do consumo e a falta de métodos oficiais para a quantificação de *L. monocytogenes* em alimentos, principalmente os *in natura*, levaram ao desenvolvimento deste projeto numa tentativa de quantificá-la para que limites máximos de tolerância possam ser propostos. Amostras resfriadas de peito e de frango inteiro obtidas no comércio varejista, foram submetidas a quantificação de *Listeria* spp pelo método do Número Mais Provável (NMP) utilizando-se: a) caldo Fraser modificado (MdFB) contendo 20 mg de acriflavina/L a 35°C/48h; b) caldo de enriquecimento para *Listeria* (LEB) (USDA) a 30°C/48h e c) caldo LEB a 30°C/24h seguido do caldo Fraser modificado (MFB) (USDA) a 35°C/24-48h. No isolamento foram utilizados os ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LPM) e Oxford modificado (MOX) e na identificação as provas bioquímicas padrão ou o kit API-*Listeria*. Os resultados revelaram: i) a viabilidade do emprego do meio MdFB na técnica do NMP; ii) valores de NMP para *Listeria* sp e *L. monocytogenes* entre <0,3 a 93/g para peitos e entre <9 a 2,8x10³/carcaça ou <0,005 a 1,943/g de frango; iii) predomínio de *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *L. welshimeri* e *L. seeligeri*. Em estudo paralelo com as mesmas amostras, verificou-se ocorrência elevada de *Listeria* sp e *L. monocytogenes*, com índices de 96,7% e 90,0% respectivamente e pequena diferença entre carcaças e peitos de frango. O ágar LPM apresentou desempenho melhor que o MOX no isolamento de *L. monocytogenes*. Em outro estudo, empregando-se a técnica do NMP proposta, verificou-se a ineficiência de hipoclorito de sódio e de fosfato trissódico na redução de *L. monocytogenes* em coxas de frango artificialmente contaminadas; os níveis de redução obtidos foram ≤ 0,42 ciclos log, os quais não foram considerados estatisticamente significantes.

SUMMARY

The use of the Most Probable Number (MPN) method to quantify *Listeria* spp, evaluation of its occurrence in chicken meat and the efficiency of sanitizing agents in the reduction of *L. monocytogenes* contamination.

L. monocytogenes is currently considered to be an important food pathogen, since various outbreaks and cases of listeriosis have been related to the consumption of foods, including some chicken products. The increase in the production of fowl meats in Brasil, the reduction of the price on the internal market and consequent increase in consumption by the population and the lack of official methods for the quantification of *L. monocytogenes* in foods, principally in raw foods, are the factors which led to the development of this project, aimed at quantifying the problem and subsequently proposing maximum tolerance limits. Thus refrigerated samples of chicken breast and whole chickens, all obtained on the retail market, were quantified for *Listeria* spp by the Most Probable Number (MPN) method, using a) modified Fraser broth (MdFB) containing 20 mg acriflavine/L at 35°C/48h; b) *Listeria* enrichment broth (LEB) (USDA) at 30°C/48h and c) LEB broth at 30°C/24h followed by modified Fraser broth (MFB) (USDA) at 35°C/24-48h. For the isolation procedure, lithium chloride phenylethanol moxalactam agar (LPM) and modified Oxford agar (MOX) were used, and the standard biochemical test or API-*Listeria* kit used for identification. The results showed the following: i) the viability of using the medium MdFB in the MPN technique; ii) MPN values for *Listeria* spp and *L. monocytogenes* between <0.3 and 93/g for breasts and between <9 and 2.8x10³/carcass or <0.005 to 1.943/g chicken and iii) predominance of *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *L. welshimeri* and *L. seeligeri*. In a parallel study with the same samples, an elevated occurrence of *Listeria* spp and *L. monocytogenes* was determined, with indices of 96.7% and 90.0% respectively, the difference between the carcasses and breasts being relatively small. LPM agar was shown to be a better isolation media for *L. monocytogenes* than MOX. In another study using the proposed MPN technique, the inefficiency of sodium hypochlorite and of trisodium phosphate in the reduction of *L. monocytogenes* in artificially contaminated chicken legs was shown, the reduction levels being ≤0.42 log cycles, and not therefore statistically significant.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Na atualidade, em vista da crescente exigência dos consumidores em relação à qualidade e segurança, as indústrias de alimentos vêm se preocupando com a implantação de sistemas de qualidade cada vez mais eficientes e capazes de proporcionar/garantir a qualidade de seus produtos. Nesta mesma direção, os órgãos oficiais de controle procuram estabelecer padrões e normas que possam orientar e regulamentar os parâmetros de qualidade e os pesquisadores tentam estudar tanto a otimização e automatização de processos quanto o desenvolvimento de métodos analíticos para monitorar ou avaliar as condições dos processos e a qualidade dos produtos.

Dentre os microrganismos patogênicos a *L. monocytogenes* é considerada atualmente importante na microbiologia de alimentos, por estar associada a vários surtos e casos de listeriose pelo consumo de alimentos, tendo sido os produtos de frango incriminados como veículo de transmissão em vários deles. O aumento da produção de carnes de aves no Brasil, com o conseqüente aumento do consumo interno e a falta de métodos para quantificação de *L. monocytogenes* em alimentos, principalmente nos *in natura*, destacam a necessidade de pesquisas nesta área.

Embora o primeiro isolamento de *Listeria monocytogenes* tenha sido realizado em 1926 por Murray e colaboradores e o primeiro caso de listeriose humana tenha sido descrito em 1929 por Nyfeldt, foi somente a partir da década de 80 que surtos de listeriose de origem alimentar foram relatados. A partir daí, houve um crescente aumento de pesquisas sobre *Listeria*.

Ao contrário das outras bactérias causadoras de toxinfecções alimentares que normalmente acarretam distúrbios gastrintestinais, a *L. monocytogenes* manifesta-se principalmente provocando meningite e meningoencefalite, acometendo preferencialmente gestantes, recém-nascidos, idosos e pessoas imunodeprimidas. Devido a gravidade da doença e a alta taxa de mortalidade em indivíduos suscetíveis, ela vem merecendo a atenção de microbiologistas de alimentos e profissionais da área da saúde, que têm se dedicado à elucidação dos

aspectos epidemiológicos envolvidos na doença, bem como ao controle e redução da listeriose de origem alimentar, diminuindo, assim, os riscos à saúde do consumidor.

As bactérias do gênero *Listeria* são amplamente distribuídas na natureza e apresentam a propriedade de se multiplicar em temperaturas de refrigeração, fato que dificulta a obtenção de alimentos *in natura* livres destas bactérias. Assim, torna-se relevante a quantificação de *L. monocytogenes* nestes alimentos para que limites máximos de tolerância possam ser propostos.

Atualmente os métodos oficiais baseiam-se na detecção do microrganismo, mas não a sua quantificação. Poucos trabalhos sobre quantificação de *Listeria* sp têm sido realizados e não havendo método padrão recomendado pelos órgãos oficiais, cada pesquisador tem preconizado um método diferente.

Quanto a ocorrência de *L. monocytogenes* em carnes de aves, trabalhos mostram que a incidência é bastante variável. No Brasil, alguns trabalhos sobre a incidência de *Listeria* spp. em alimentos de origem animal já foram realizados, inclusive em carnes de frango. No entanto, a quantificação deste patógeno nestes produtos não foi realizada.

Os agentes químicos, como compostos clorados e ácidos orgânicos, são utilizados no processo de abate de animais para redução da microbiota contaminante, visando principalmente a eliminação de *Salmonella* sp. Em 1992, o uso de fosfato trissódico na redução da contaminação de carcaças de aves foi aprovado nos Estados Unidos. No Brasil, o Ministério da Agricultura autorizou, em 1995, o uso do produto em estabelecimentos com Serviço de Inspeção Federal. Alguns trabalhos realizados demonstram que o fosfato trissódico é eficiente na redução da contaminação de *Salmonella* e *Campylobacter* em aves, todavia, há poucos relatos da ação deste agente sobre *L. monocytogenes*.

Diante desta realidade, o presente trabalho foi proposto na tentativa de colaborar com a melhoria dos métodos de quantificação de *Listeria* sp em carnes de frango e contribuir na obtenção de carnes de frangos livres de *L. monocytogenes*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

1. Propor uma metodologia para quantificação de *Listeria* spp em carnes de frango, baseada na técnica do Número Mais Provável (NMP).
2. Verificar a ocorrência de *Listeria* spp em produtos de frango.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudar a técnica do NMP de 3 tubos utilizando meios de cultura empregados tradicionalmente nos métodos de detecção de *Listeria* sp.
2. Avaliar a ocorrência, e o nível de contaminação, de *L. monocytogenes* em cortes e carcaças de frango utilizando a técnica do NMP.
3. Avaliar a eficiência dos meios de cultura tradicionais na detecção de *L. monocytogenes*.
4. Avaliar a eficiência da aplicação de fosfato trissódico e de hipoclorito de sódio na redução da contaminação por *L. monocytogenes* em coxas de frango.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. TAXONOMIA DE LISTERIA

O primeiro isolamento de *Listeria monocytogenes* foi realizado em 1926 por Murray e colaboradores. Nesta ocasião, um bastonete Gram positivo foi isolado de sangue de coelhos que apresentavam uma doença caracterizada como monocitose típica, assim foi chamado de *Bacterium monocytogenes*. Três anos depois, Pirie isolou uma bactéria de fígado infectado de um camundongo africano e o denominou *Listerella hepatolytica*. Posteriormente, soube-se que *B. monocytogenes* e *L. hepatolytica* eram o mesmo microrganismo e o nome foi alterado para *Listerella monocytogenes*. Porém, em 1939 foi descoberto que desde 1906 o nome *Listerella* já era usado na designação de um grupo de bolores. Então, em 1940, Pirie propôs a mudança do nome *Listerella monocytogenes* para *Listeria monocytogenes*, que foi aceita e adotada na 6ª edição do "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". Em 1954 foi aprovado pela Comissão Judicial de Nomenclatura e Taxonomia Bacteriológica (RYSER & MARTH, 1991).

O gênero *Listeria*, inicialmente foi descrito contendo apenas *L. monocytogenes* (senso lato) e posteriormente, baseados em estudos de hibridização de DNA/DNA, foi redefinido para incluir cinco espécies, sendo apenas uma reconhecida como *L. monocytogenes* (senso estrito) (Mc LAUCHLIN, 1987).

Na 9ª edição do "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (SEELIGER & JONES, 1986), o gênero *Listeria* encontra-se classificado na seção 14, no grupo dos bastonetes regulares, Gram positivos e não esporogênicos. O gênero *Listeria* inclui cinco espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. ivanovii*. Inclui ainda três espécies com classificação incerta ("incertae sedis"): *L. grayi*, *L. murrayi* e *L. denitrificans*. Em 1987 (ROCOURT et alii, 1987), esta última foi redenominada como *Jonesia denitrificans* baseada nas características bioquímicas e através da análise do rRNA (ácido nucléico ribossômico 16S) que demonstrou estar filogeneticamente relacionado com membros da subdivisão dos actinomicetos.

Atualmente na 9ª edição do "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (HOLT et alii, 1994), *L. denitrificans* foi transferido para o gênero *Jonesia*, no grupo 20 dos bastonetes Gram positivos irregulares não esporogênicos. O gênero *Listeria* encontra-se no grupo 19 e passou a apresentar 7 espécies, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* e *L. murrayi*.

Em 1992, BOERLIN et alii estudaram várias cepas de *L. ivanovii* e constataram que dois grupos genômicos representam duas subespécies, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* e *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* subsp. nov.

3.2. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA

Morfologicamente os microrganismos do gênero *Listeria* apresentam a forma de pequenos bastonetes Gram positivos regulares, de 0,4-0,5 µm de diâmetro e 0,5-2,0 µm de comprimento, que podem aparecer isolados, em cadeias curtas ou arranjados em forma de V, ou ainda dispostos paralelamente. Não formam esporos nem cápsula. Apresentam poucos flagelos peritríquios e em meio semi-sólido a 20-25°C apresentam motilidade típica na forma de guarda-chuva. As colônias quando em meios de cultura claros e translúcidos e sob luz oblíqua transmitida, apresentam-se com coloração azul esverdeada. São aeróbios e anaeróbios facultativos (SEELIGER & JONES, 1986). Proliferam numa faixa de temperatura de -0,4 a 50°C (FARBER & PETERKIN, 1991) com crescimento ótimo a 30-37°C (SEELIGER & JONES, 1986). Crescem em pH variando entre 5,0 a 9,5 (LOVETT & TWEDT, 1988), atividade de água (a_w) mínima de 0,90 (FARBER et alii, 1992) e toleram altas concentrações de cloreto de sódio (FARBER & PETERKIN, 1991).

As características bioquímicas para identificação das bactérias do gênero *Listeria* são: produção de catalase, não produção de oxidase, fermentação de glicose com produção de ácido láctico sem produção de gás, não produção de indol, provas de Voges Proskauer e vermelho de metila positivas, hidrolizam a esculina e o hipurato de sódio, não hidrolizam a uréia, a gelatina e a caseína (SEELIGER & JONES, 1986).

Os testes bioquímicos para diferenciação das espécies estão apresentados

na **Tabela 1** e compreendem a prova de redução de nitrato, a produção de β -hemolisina em ágar sangue de cavalo, a utilização do manitol, ramnose e xilose, o Camp teste e a patogenicidade em camundongos.

Tabela 1. Características de diferenciação das espécies do gênero de *Listeria*.

<i>Listeria</i> sp	β -hemólise	redução de nitrato	CAMP teste		Utilização de			Pat. ^c
			<i>S. aureus</i> ^a	<i>R. equi</i> ^b	Manitol	Ramnose	Xilose	
<i>L. monocytogenes</i>	+ ^d	-	+	-	-	+	-	+
<i>L. ivanovii</i>	+	-	-	+	-	-	+	+
<i>L. innocua</i>	-	-	-	-	-	v ^e	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	-	-	v	+	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	+	-	-	-	+	-
<i>L. murrayi</i>	-	+	-	-	+	v	-	-
<i>L. grayi</i>	-	-	-	-	+	-	-	-

^a *Staphylococcus aureus* NCTC 1803.

^b *Rodococcus equi* NCTC 1621.

^c Pat. = patogenicidade em camundongo.

^d Poucas cepas negativas.

^e V = variável.

Fonte: SEELIGER & JONES, 1986.

3.3. LISTERIOSE HUMANA

3.3.1. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O primeiro caso de listeriose humana foi descrito em 1929 por Nyfeldt que isolou a bactéria de sangue de pessoas com doença semelhante à mononucleose (Mc LAUHLIN, 1987).

Entre as espécies de *Listeria* existentes, somente as produtoras de β -hemolisinas são consideradas patogênicas tanto para o homem como para os animais, a saber: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri*. *L. monocytogenes* é responsabilizada pelo maior número de casos de listerioses relatados no homem e animais (Mc LAUHLIN, 1987). No entanto, alguns relatos de infecções humanas

por *L. ivanovii* em pacientes aidéticos foram descritos (CUMMINS et alii, 1994; LESSING et alii, 1994).

Na população, as mulheres grávidas, recém-nascidos, crianças menores de 1 ano, idosos e pessoas imunologicamente deprimidas, compõem o grupo suscetível a adquirir uma infecção por *L. monocytogenes* (MARTH, 1988).

Em gestantes, a listeriose se manifesta com sintomas semelhantes aos de gripe. Os sintomas comumente observados são: febre, dor de cabeça, calafrios e dores nas costas, aparecendo às vezes faringite, diarréia e inflamação dos rins; ocasionalmente ocorre meningite. A bacteremia na gestante pode levar a infecção do feto via rota transplacentar, o que ocorre geralmente no terceiro trimestre de gestação. As vezes, logo após os sintomas de febre e calafrios, ocorre o aborto ou o nascimento de bebês prematuros. A bacteremia no feto conseqüentemente acarreta a disseminação da bactéria em vários órgãos (MARTH, 1988).

Em neonatos, as manifestações são variadas e incluem normalmente, falha cardíaca, dificuldade respiratória, pneumonia, conjuntivite, hiperexcitabilidade, vômitos, anormalidades hematológicas e hipo ou hipertermia. A doença predominante é a meningite (FARBER & PETERKIN 1991). Normalmente nos recém-nascidos a listeriose também envolve vários órgãos (MARTH, 1988).

Além dos recém-nascidos, a listeriose também pode ser observada em crianças entre 7 meses a 1 ano de idade. Já foi observado que pode ocorrer um atraso no desenvolvimento neural e paralisia do corpo em fetos ou neonatos que sobreviveram à doença (MARTH, 1988).

A listeriose envolvendo o sistema nervoso central se manifesta na forma de meningite e meningoencefalite que acomete principalmente os idosos, freqüentemente homens com idade acima de 60 anos e pacientes imunodeprimidos. Outras manifestações esporádicas são: endocardites, peritonites, pneumonia, osteomielite, artrites e abscesso de fígado (FARBER & PETERKIN 1991). O curso da doença normalmente é fulminante com mortalidade em 70% dos pacientes não tratados ou tratados tardiamente (MARTH, 1988).

A morte em adultos sadios é rara, contudo, pode atingir taxas de 30% em pessoas imunodeprimidas, recém-nascidos e crianças muito jovens (LOVETT & TWEDT, 1988).

O período de incubação estimado da doença é de uma a várias semanas (apud KERR et alii, 1988b). No entanto, já foram descritos casos de listeriose humana com período de incubação entre 3 a 5 dias (KERR et alii, 1988b e KACZMARSKI & JONES, 1989).

A dose infecciosa necessária para causar a doença ainda não está bem definida. Acredita-se que a dose seja variável e dependente do estado de saúde do indivíduo e da pré-disposição das pessoas. Para pessoas suscetíveis, sugere-se uma dose estimada entre 10^3 a 10^5 organismos por grama, sendo provavelmente mais alta para adultos saudáveis (ENGEL et alii, 1990).

Entre 5 a 10% da população geral pode ser portadora do microrganismo (FARBER & PETERKIN 1991).

3.3.2. FORMAS DE TRANSMISSÃO

A princípio, além da via alimentar, existem várias formas de transmissão da infecção por *L. monocytogenes*, ou seja, por contato direto com material infectado, infecção cruzada durante o período neonatal e infecção via rota transplacentar em fetos (McLAUHLIN, 1996).

3.3.2.1. Transmissão de origem não alimentar

A transmissão de listeriose por rota não alimentar, ocorre principalmente pelo contato direto com animais infectados, contaminação de fetos e neonatos através da mãe e através da contaminação cruzada de bebês em hospitais.

A listeriose transmitida pelo contato direto com material de animal infectado não é comum. Em 1994, McLAUHLIN & LOW revisando os casos de listeriose cutânea em adultos, verificaram que este tipo de infecção era uma doença ocupacional que atingia médicos veterinários e fazendeiros. As lesões cutâneas normalmente ocorreram nos braços e mãos cuja pele havia sofrido irritação. A

contaminação era originária de material proveniente do aborto de bovinos infectados. Nestes casos, o período de incubação era de 1 a 2 dias e a dose infecciosa provavelmente era alta.

SEELIGER (1961) e MOUTON & KAMPELMACHER (1966) (citado por McLAUCHLIN & LOW, 1994) observaram casos de meningite em fazendeiros que assistiram abortos de bovinos.

Um surto de listeriose em recém nascidos ocorreu em 1989, em um hospital da Costa Rica. As investigações realizadas revelaram que os 10 recém nascidos doentes foram contaminados pelo óleo mineral utilizado no banho. *L. monocytogenes* do sorovar 4b com o mesmo padrão de eletroforese isoenzimática foi isolado do sangue dos bebês e do óleo mineral (SCHUCHAT et alii, 1991).

A infecção de recém nascidos também pode ocorrer durante o parto, ocasião em que a criança presumivelmente pode aspirar material fecal ou vaginal infectado (SCHLECH, 1996).

Casos de listeriose com histórico semelhante à gripe ocorridos em gestantes, resultaram em abortos espontâneos, devido a contaminação do feto via rota transplacentar (CAIRD, 1989).

3.3.2.2. Transmissão de origem alimentar - Surto e casos de infecções alimentares

O consumo de alimentos contaminados é a principal rota de transmissão de *L. monocytogenes*. Diversos alimentos já foram associados a casos esporádicos e a surtos de listeriose em vários países. No Brasil no entanto, não há relatos da ocorrência de tal infecção.

Na década de 80, ocorreu um crescente aumento no número de casos de listeriose nos países do Hemisfério Norte. O número de casos notificados na Grã Bretanha no período de 1967 a 1977 era inferior a 50 casos/ano, no entanto, em 1985 atingiu 142 casos e em 1987, 214 (McLAUCHILIN et alii, 1988). Na década de 90 houve um declínio na incidência da doença, com aproximadamente 120 casos em 1994 (McLAUCHILIN, 1996).

Uma redução no número de casos de listeriose humana também ocorreu nos Estados Unidos no período de 1989 a 1993 (TAPPERO et alii, 1995).

Em 1979, houve um surto de listeriose em oito hospitais de Boston, onde 23 pacientes imunodeprimidos foram acometidos pela doença, sendo que em 87% dos casos, isolou-se *L. monocytogenes* do sorotipo 4b. Segundo as investigações realizadas, foi sugerido a possibilidade de que alguns pratos, como salada de frango, atum e queijo, servidos com vegetais crus (aipo e alface) contaminados com *Listeria* terem sido o veículo de transmissão (HO et alii, 1986).

Na Nova Zelândia, em 1980 ocorreu um surto envolvendo 29 pessoas sendo 23 perinatais, com 9 mortes, onde o alimento implicado foi peixe cru e ou marisco (citado por FARBER & PETERKIN, 1991).

Nas Províncias Marítimas do Canadá, em 1981, ocorreu um surto de listeriose com 34 casos perinatais e 7 em adultos. O provável veículo de transmissão foi a salada de repolho cru (“coleslaw”) contaminada com *L. monocytogenes* sorotipo 4b. A investigação demonstrou que no cultivo dos repolhos, esterco de ovelhas foi utilizado como fertilizante, sendo que algumas das ovelhas apresentaram infecção por *L. monocytogenes* (SCHLECH et alii, 1983).

Outro surto associado ao sorotipo 4b ocorreu em Massachusetts, em 1983. Nesta ocasião, 49 pessoas, gestantes, bebês e adultos imunodeprimidos adoeceram, com 29% de casos fatais. O surto, foi associado ao consumo de leite pasteurizado integral e leite pasteurizado com 3% de gordura, submetidos a tratamento térmico inadequado. Vários sorotipos de *L. monocytogenes* foram isolados de leite cru e casos de listeriose foram observados nas vacas produtoras do leite (FLEMING et alii, 1985).

Em 1985, uma epidemia de listeriose ocorreu em Los Angeles, Califórnia, com 142 casos, sendo 65,5% em gestantes e 34,5% em adultos com fatores predisponentes. *L. monocytogenes* sorotipo 4b foi isolado de pacientes e de queijo macio tipo Mexicano. As investigações realizadas na indústria produtora do queijo revelaram que a origem da contaminação foi provavelmente a utilização de 10% a mais de leite que a capacidade de pasteurização, ocasionando desta forma um

tratamento térmico insuficiente ou ainda a introdução de leite cru no leite após a pasteurização inicial (LINNAN et alii, 1988).

Outro surto devido ao consumo de queijo mole ocorreu na Suíça, entre 1983 a 1987. Neste período, ocorreram 122 casos de listeriose, com 31 mortes, sendo que a maioria dos isolados de *L. monocytogenes* era do sorotipo 4b. As pesquisas revelaram que as cepas isoladas do queijo tipo "Vacherin Mont d'Or" eram indiscutivelmente do mesmo sorotipo e fagotipo da maioria das culturas humanas do período epidêmico (BILLE, 1990).

O mais recente surto de listeriose ocorreu na França, em 1992, envolvendo 279 casos com 63 mortes e 22 abortos e a causa foi a ingestão de alimento a base de língua de porco cozido (citado por DEVER et alii, 1993).

Alimentos como: camarão, patê e salame também já foram associados a surtos de listeriose (citado por FARBER & PETERKIN, 1991).

Em pesquisas realizadas pelo "Center for Diseases Control" (CDC) entre 1986 e 1987, sobre infecções por *L. monocytogenes* em 6 regiões dos Estados Unidos da America (EUA), salsicha não cozida ("hot dog") e frango mal cozido, foram associados aos casos esporádicos ocorridos neste período (SCHWARTZ et alii, 1988).

KERR et alii (1988b), relataram um caso em que uma gestante apresentou sintomas de gripe com aborto espontâneo. O alimento incriminado foi um frango cozido resfriado cujo consumo ocorreu após 3 dias sob refrigeração em uma salada. Neste caso, foi isolado *L. monocytogenes* do sorotipo 4.

Alimentos a base de carnes de aves também têm sido incriminados como veículos de transmissão de listeriose. KACZMARSKI & JONES, 1989 descreveram um caso onde uma mãe imunodeprimida adquiriu listeriose e seu filho apresentou a doença de forma suave, com mal estar, diarreia e vômitos. Neste caso, "nuggets" de frango foram a provável fonte de contaminação dos doentes.

Outro caso aconteceu com uma paciente com câncer e o alimento implicado foi salsicha de peru, que a paciente consumia diariamente, aquecida no microondas (BARNER et alii, 1989).

Um caso de listeriose foi descrito por AZADIAN & FINNERTY (1989), onde *L. monocytogenes* do sorotipo 4b foi isolada do doente e do alimento. O alimento incriminado foi queijo com 10^7 UFC/g de *L. monocytogenes*.

JUNTTILA & BRANDER (1989), relataram um caso associado ao consumo de cogumelos salgados. *L. monocytogenes* sorotipo 4b foi isolada do sangue do doente e do alimento ($3,8 \times 10^6$ UFC/g).

Também já ocorreram casos de listeriose associados a ingestão de ovos crus (SCHWARTZ et alii, 1988), vegetais em conserva (KERR et alii, 1988b) e tabletes de alfafa (FARBER et alii, 1990).

3.4. OCORRÊNCIA NO MEIO AMBIENTE

A *L. monocytogenes* é um microrganismo amplamente encontrado na natureza, tanto em ambientes terrestre como aquático.

Este microrganismo já foi isolado de solo cultivado e não cultivado (HOFER, 1984; BRACKETT, 1988), milho, soja e grama (BRACKETT, 1988), silagem, forragem (BRACKETT, 1988; SKOVGAARD & MORGEN, 1988), palha, esterco e fezes de animais (SKOVGAARD & MORGEN, 1988; IIDA et alii, 1991).

A silagem pode albergar *L. monocytogenes* em números superiores a 12.000 células por grama. As aves são consideradas vetores na inoculação desta bactéria na silagem, e esta, a origem de listeriose dos animais (BRACKETT, 1988).

A *L. monocytogenes* também foi isolada em águas de rios, lagos, canais, esgotos tratado e não tratado e efluentes de abatedouros (BRACKETT, 1988).

Em animais, *L. monocytogenes* está associada ao trato intestinal ou a infecções subclínicas.

Inúmeros animais apresentam *L. monocytogenes*, entre eles podemos citar: bovinos, suínos (BRACKETT, 1988; IIDA et alii, 1991), ovinos, equinos, caprinos,

cães, gatos, coelhos, veados, gambás, chinchilas, anfíbios como sapos e rãs, peixes, crustáceos, carrapatos, insetos, aves como frango, peru, pato, ganso, faisão, canário, pombo, garça, papagaio, perdiz, galo silvestre (BRACKETT, 1988) e rato (IIDA et alii, 1991).

No meio ambiente a *Listeria* apresenta grande resistência a dessecação, sobrevivendo 3 meses em forragem seca, mais de 6 meses em palha seca, mais de 2 anos em fezes secas e 295 dias em solo (LOVETT & TWEDT, 1988).

Em ambientes domésticos, COX et alii (1989) encontraram *L. monocytogenes* em panos de prato e refrigeradores.

3.5. OCORRÊNCIA NAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS

A *L. monocytogenes* está presente em vários ambientes das indústrias de alimentos. A disseminação de *L. monocytogenes* ao longo da linha de processamento de aves, tem sido estudada por vários pesquisadores, afim de avaliar o papel das diversas etapas de processamento, do ambiente e dos equipamentos na contaminação do produto final.

Em 1988, SKOVGAARD & MORGEN investigando 2 abatedouros, com produção anual de 4 e 11 milhões de frangos, isolaram no primeiro *L. monocytogenes* de pele de pescoço após o processo de escalda a 50,6°C/2 min e resfriamento ao ar e em tanque e, após escalda a 58,6°C/1 min e resfriamento em tanque. No segundo, foi isolado em pele de pescoço após o processo de resfriamento ao ar e em gaiolas de transporte de aves.

HUDSON & MEAD (1989) encontraram *L. monocytogenes* em abridor automático de carcaça, cortador de pele de pescoço, esteira transportadora para o setor de embalagem, dreno da linha de evisceração, e em pele de pescoço de frangos antes do recebimento da embalagem.

Num estudo realizado em abatedouro de frango, GENIGEORGIS et alii (1989), avaliaram a potencial contribuição das práticas de abate na prevalência de *Listeria* spp no produto final. *L. monocytogenes* foi isolada de água de resfriamento,

água reciclada para limpeza de moelas e de carne mecanicamente separada. Em água de gotejamento de depenadeira, *L. innocua* foi isolada. *L. monocytogenes* também foi encontrada em mãos e luvas de manipuladores daquele estabelecimento.

VARABIOFF (1990) avaliou abatedouros de frango: de grande porte, com sistemas automáticos e de pequeno porte, com sistemas manuais. *L. monocytogenes* foi encontrada em água de resfriamento de abatedouro de pequeno porte onde a temperatura da água estava entre 3 a 9°C, no entanto não foi encontrado em água de escalda. Analisando frangos após algumas etapas do processamento, *L. monocytogenes* foi isolado após o resfriamento, porém somente *L. innocua* foi encontrado após escalda e evisceração.

DYKES et alii (1994), detectaram *L. monocytogenes* em dedos de borrachas de depenadeira, em tubo da máquina de embalagem e em pele de pescoço de frangos após resfriamento e após o recebimento da embalagem.

LONCAREVIC et alii (1994) investigaram a ocorrência de espécies de *Listeria* em frangos de 2 abatedouros após pré-resfriamento e após o resfriamento em água clorada. *L. monocytogenes* foi isolada apenas após a passagem pelo resfriamento em água ≤ 10 ppm de cloro disponível livre.

Em recente trabalho, OJENIYI et alii (1996) investigaram 7 abatedouros na Dinamarca. O estudo compreendeu desde a análise de matrizes, frangos na criação, gaiolas de transporte e vários pontos na linha de processamento. Os resultados revelaram a presença de *L. monocytogenes* em amostras de ceco de matrizes, em gaiolas de transporte sujas ou limpas, em água de escalda, em equipamentos de evisceração, depenagem, separador de penas, resfriador giratório, em pisos e paredes e na seção de cortes. Em frangos, foi detectado em pele de pescoço antes e após o resfriamento e em produtos prontos.

LAWRENCE & GILMOR (1994) reportaram a incidência de *Listeria* spp, em particular *L. monocytogenes* em ambientes processadores de frangos, sendo o patógeno encontrado em superfícies de aço inoxidável de equipamentos, esteiras transportadoras, maçanetas de portas, pisos e drenos.

Em abatedouro de peru, GENIGEORGIS et alii (1990), isolaram *L. monocytogenes* de água de gotejamento de depenadeira, água reciclada para limpeza de moelas, em carne mecanicamente separada e em mãos e luvas de manipuladores.

WENGER et alii (1990) avaliaram uma indústria produtora de salsicha de peru e encontraram *L. monocytogenes* na linha de produção em emulsão crua, emulsão cozida e após resfriamento e após descascamento da salsicha. Este agente também foi isolado de piso do local de resfriamento e de correia transportadora para despeladeira de salsicha.

Em indústria processadora de leite, espécies de *Listeria* foram encontradas mais freqüentemente em equipamentos de embalagem, transportadeiras, palet, dreno, piso e paredes de planta processadora de leite fluído (NELSON, 1990). COX et alii (1989), também encontraram *L. monocytogenes* em dreno, piso, resíduos e equipamentos de processamento de indústria de queijo tipo italiano e em equipamentos de processamento de sorvete. O patógeno também já foi isolado de águas residuais de indústrias de laticínios (SERAFINI et alii, 1996).

Em usina de processamento de salmão defumado RORVIK et alii, 1995 isolaram *L. monocytogenes* da água do mar, ambiente de processamento da sala de defumação, de peixes antes e após filetagem, de peixes após salga e em salmão defumado embalado a vácuo. No Brasil, pesquisa realizada por DESTRO (1995), em indústria processadora de camarão, revelou a presença de *L. monocytogenes* em utensílios, ambiente, mãos de manipuladores, água de diferentes pontos da linha de processamento, além do carmarão.

3.6. OCORRÊNCIA EM ALIMENTOS

Certamente os animais, o homem e o meio ambiente representam o reservatório de *L. monocytogenes* e a origem da contaminação de alimentos, que por sua vez oferecem uma ameaça à saúde, principalmente das pessoas suscetíveis.

Este patógeno é encontrado tanto em alimentos de origem animal como vegetal e tem sido isolado em alimentos in natura, processados e preparados e prontos para o consumo.

3.6.1. ALIMENTOS À BASE DE CARNES DE AVES

A ocorrência de *Listeria* sp e *L. monocytogenes* em carnes de aves no mundo é bastante, conforme mostra os dados da **Tabela 2**. Nos E.U.A. a frequência varia de 10,0 a 42,0% das amostras analisadas (BAILEY & FLETCHER, 1987; McCLAIN & LEE, 1988; BAILEY et alii, 1989; GENIGEORGIS et alii, 1989; GENIGEORGIS et alii, 1990). Na Noruega (RORVIK & YNDESTAND, 1991), Inglaterra (PINI & GILBERT, 1988; HUDSON & MEAD, 1989), Canadá (FARBER et alii, 1989), Irlanda do Norte (LAWRENCE & GILMOR, 1994) e Japão (RYU et alii, 1992) a ocorrência ultrapassa 50,0%. Em outros países, como a Dinamarca (SKOVGAARD & MORGEN, 1988), Suíça (BREER & SCHOPPER, 1988), Austrália (VARABIOF, 1990), Itália (IANIERI, et alii, 1990), Taiwan (WONG et alii, 1990), China (WANG et alii, 1992), Irlanda (SHERIDAN et alii, 1994) e Emirados Arabes (GOHIL et alii, 1995a) é variável, no entanto, a ocorrência não ultrapassa 50,0%.

No Brasil, trabalhos realizados por LAGE (1993) e NUNES (1994), revelam uma grande variação na ocorrência de *L. monocytogenes* em carcaças e cortes de frango, sendo observado positividade de 3,3 a 50,0%, dependendo do tipo de amostra.

GENIGEORGIS et alii (1989), também encontraram estas bactérias em fígados de frango. *Listeria* sp foi isolada em 28% e *L. monocytogenes* em 14% de 50 amostras comerciais analisadas. PINI & GILBERT, 1988 também encontraram *L. monocytogenes* em 22% das amostras de miúdos analisadas.

HAYES et alii (1991) e HAYES et alii (1992) analisaram alimentos de refrigeradores de pacientes com listeriose e verificaram um nível de ocorrência em produtos a base de aves, da ordem de 90 e 91% respectivamente.

WONG et alii (1990) isolaram *L. monocytogenes* em frango e também em produtos importados como partes de peru.

Tabela 2. Ocorrência de gênero *Listeria* e *L. monocytogenes* em carnes de aves obtidas na comercialização e em abatedouros.

País	Produto	n ^a	<i>L.m.</i> ^b (%)	<i>List. sp</i> ^c (%)	Referência
EUA	frango	40	42,5	67,5	BAILEY & FLETCHER, 1987
Dinamarca	frango ^d	17	47,0	94,0	SKOVGAARD & MORGEN, 1988
Inglaterra	frango	50	66,0	26,0	PINI & GILBERT, 1988
Inglaterra	frango ^e	50	5,0	30,0	PINI & GILBERT, 1988
EUA	aves ^e	22	31,8	-	McCLAIN & LEE, 1988
Suíça	aves	56	25,0	-	BREER & SCHOPFER, 1988
Inglaterra	frango ^d	30	50,0	-	HUDSON & MEAD, 1989
EUA	frango	90	23,0	38,0	BAILEY et alii, 1989
EUA	asa de frango	50	10,0	36,0	GENIGEORGIS et alii, 1989
EUA	coxa de frango	60	15,0	46,6	GENIGEORGIS et alii, 1989
Canadá	coxa de frango	16	56,3	-	FARBER et alii, 1989
Itália	aves ^e	98	3,0	-	CASERIO et alii, 1989
EUA	asa de peru	60	20,0	45,0	GENIGEORGIS et alii, 1990
EUA	coxa de peru	60	13,3	28,3	GENIGEORGIS et alii, 1990
Austrália	frango ^e	80	15,1	32,5	VARABIOF, 1990
Itália	frango	23	21,7	82,6	IANIERI et alii, 1990
Taiwan	frango	16	50,0	-	WONG et alii, 1990
Noruega	frango ^d	90	61,0	-	RORVIK & YNDESTAD, 1991
Japão	frango	12	25,0	50,0	RYU et alii, 1992
Japão	filé de frango	04	75,0	-	RYU et alii, 1992
Japão	frango picado	06	66,7	-	RYU et alii, 1992
Itália	frango	50	36,0	-	GALLI, et alii, 1992
China	frango	21	4,7	52	WANG et alii, 1992
Brasil	frango	30	3,3	100,0	LAGE, 1993
Brasil	coxa e sobrecoxa de frango	30	3,3	100,0	LAGE, 1993
Brasil	peito de frango	30	6,7	96,7	LAGE, 1993
Brasil	frango	20	15,0	100,0	NUNES, 1994
Brasil	frango ^e	20	50,0	95,0	NUNES, 1994
Brasil	coxa e sobrecoxa de frango	20	25,0	95,0	NUNES, 1994
Brasil	peito de frango	20	50,0	70,0	NUNES, 1994
Irlanda	pedaços de frango	30	30,0	50,0	SHERIDAN et alii, 1994
Irlanda do Norte	filé de frango ^d	12	83,3	100,0	LAWRENCE & GILMOR, 1994
Irlanda do Norte	frango	12	16,7	33,3	LAWRENCE & GILMOR, 1994
Emirados Árabes	frango	30	3,3	33,3	GOHIL et alii, 1995a
EUA	frango	45	-	73,0	RYSER et alii, 1996

^a n = n° de amostra analisada.

^b *L.m.* = *L. monocytogenes*.

^c *List. sp* = gênero *Listeria*.

^d amostras coletadas em abatedouro.

^e congelado.

Em alimentos processados ou preparados à base de carne de aves, *L. monocytogenes* já foi encontrada em aves pré cozidas pronta para o consumo (GILBERT et alii, 1989 e KERR et alii, 1990), alimentos cozidos resfriados à base de carne de aves (KERR et alii, 1988a), produtos frescos e congelados preparados com frango e peru (CASERIO et alii, 1991) salsicha de peru (WENGER et alii, 1990; CASERIO et alii, 1991), enrolado de frango (LACHICA, 1990), produtos de frango (HUDSON et alii, 1992) e patê de peru (FARBER & DALEY, 1994).

3.6.2. OUTROS ALIMENTOS

L. monocytogenes foi isolada de carcaça bovina, suína e ovina (RORVIK & YNDESTAD, 1991). As carnes bovina (BREER & SCHOPFER, 1988; RYU et alii, 1992; SHERIDAN et alii, 1994), suína (BREER & SCHOPFER, 1988; RYU et alii, 1992; SHERIDAN et alii, 1994) e de cordeiro (SHERIDAN et alii, 1994), carnes moídas bovina (McCLAIN & LEE, 1988; FARBER et alii, 1989; DESTRO et alii, 1991), suína (FARBER et alii, 1989) e de vitela (FARBER et alii, 1989) também apresentaram esta bactéria, assim como carne seca (BREER & SCHOPFER, 1988) e lingüiças (McCLAIN & LEE, 1988; FARBER et alii, 1989; DESTRO et alii, 1991; FURLANETTO et alii, 1996).

Em pescados como camarão (HOFER & RIBEIRO, 1990; RORVIK & YNDESTAD, 1991; RYU et alii, 1992; DESTRO, 1995), peixes(RORVIK & YNDESTAD, 1991; RYU et alii, 1992), moluscos bivalves (SIMON et alii, 1992), e outros produtos marinhos crus (RYU et alii, 1992) já foi isolado este patógeno.

Em leite cru (SLADE & THOMPSON, 1988; MOURA et alii, 1993) e vegetais (WONG et alii, 1990; SIMON, et alii, 1992) este microorganismo também tem sido encontrado.

Em alimentos prontos para o consumo *L. monocytogenes* foi encontrada em: salame (BREER & SCHOPFER, 1988; KEER et alii, 1988a e VARABIOFF, 1990), patê (KERR et alii, 1988a; MORRIS & RIBEIRO, 1989; VARABIOFF, 1990; FARBER & DALEY, 1994), refeições resfriadas, alimentos à base de carne suína e marisco (HUDSON et alii, 1992), salmão defumado (RORVIK & YNDESTAD, 1991 e HARVEY& GILMOUR, 1993), presunto (SHERIDAN et alii, 1994), queijos (PINI &

GILBERT, 1988; RORVIK & YNDESTAD, 1991; DESTRO et alii, 1991; OLIVEIRA, 1993; FURLANETTO et alii, 1996), salada de vegetais, saladas preparadas (HARVEY & GILMOUR, 1993) e sorvete (FARBER, et alii, 1989).

3.7. MÉTODOS PARA ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

Os primeiros métodos de isolamento de *L. monocytogenes* foram desenvolvidos para uso médico e veterinário. Na microbiologia clínica, as amostras normalmente apresentam grande número de microrganismos, que freqüentemente crescem quase como cultura pura em condições ideais. Já na microbiologia de alimentos, a rotina envolve detectar pequenas quantidades do patógeno que, estão freqüentemente na presença de milhões de outras bactérias, ou ainda estão subletalmente injuriadas devido ao processamento do alimento (BUCHANAN, 1990).

Para isolar *L. monocytogenes* de alimentos e ambiente, é necessário que a amostra seja colocada em meios de enriquecimento na tentativa de recuperar as poucas células existentes ou células injuriadas. O método de enriquecimento a frio de GRAY et alii (1948) foi o primeiro para isolar *Listeria* de alimentos, e era realizado em caldo não seletivo incubado a 4°C por vários meses. A princípio, este método foi adotado como padrão para detectar *L. monocytogenes* pelo alto grau de sensibilidade com maior número de isolamentos do que o plaqueamento direto, mas tornou-se impraticável pelas indústrias de alimentos devido ao longo tempo de incubação (DENVER et alii, 1993).

Embora o crescimento de *L. monocytogenes* seja favorecido a 4°C, outros microrganismos incluindo *Proteus*, *Hafnia*, *Pseudomonas* e enterococos também se multiplicam a essa temperatura (RYSER & MARTH, 1991). Este fato conduziu a novas pesquisas e a utilização de agentes inibidores nos meios de cultura para prevenir o crescimento da microbiota acompanhante. Os trabalhos também proporcionaram métodos mais rápidos com a diminuição do tempo de incubação do caldo de enriquecimento a 30-37°C para 24 a 48 horas.

Os métodos de detecção e isolamento de *L. monocytogenes* em alimentos basicamente envolvem etapas de enriquecimento e posterior semeadura em meio

sólidos seletivos para a posterior identificação. Nestas etapas básicas, o meio de cultura pode variar dependendo do alimento e das metodologias utilizadas.

Inúmeros meios de cultura foram desenvolvidos e sua eficiência avaliada desde a descoberta da *L. monocytogenes* como agente de infecção alimentar (RYSER & MARTH, 1991; DENVER et alii, 1993).

Atualmente existem métodos oficiais para o isolamento de *L. monocytogenes* adotados por: a) U.S. Food and Drug Administration- FDA (HITCHINS, 1992); b) U.S. Department of Agriculture - USDA (Mc CLAIN & LEE, 1989); c) Health Protection Branch, do Canadá - HPB (WARBURTON, et alii, 1991a); d) Netherlands Government Food Inspection Service - NGFIS (VAN NETTEN et alii, 1989); e) International Dairy Federation - IDF (TWEDT et alii, 1994), semelhante ao da FDA; f) COBAC recomendado na França pelo Laboratório Central de Higiene de Alimentos (RYSER & MARTH, 1991). Na **Tabela 3** são apresentados resumidamente alguns destes métodos com os seus respectivos meios.

O método preconizado pelo USDA é recomendado para produtos cárneos, o da IDF para produtos lácteos, os da FDA, NGFIS e COBAC tanto para produtos cárneos como lácteos e amostras ambientais e o HPB para todos os tipos de alimentos e amostras ambientais.

Recentes avanços tecnológicos ocorridos desde a descoberta de *L. monocytogenes* como causador de infecção alimentar, tem contribuído na rapidez do isolamento e identificação deste microorganismo em alimentos. Atualmente existem inúmeras técnicas rápidas de detecção como o teste ELISA (“enzyme - linked immunosorbent assay”), comercialmente apresentados como “Organon Teknika” (reconhecido pelo FDA - HITCHINS, 1992) e “Listeria-Tek Assay”, além de outras técnicas como o PCR (“Polimerase Chain Reaction”), “Gene-Trak Systems” e os sistemas de identificação através de Kits bioquímicos tais como o API ZYM, MAST ID, API Listeria e MICRO-ID Listeria (DENVER et alii, 1993).

Segundo estudo realizado por BILLE et alii (1992), 97,7% das estirpes de *L. monocytogenes* testadas com o sistema API Listeria, tiveram identificação correta e diferenciada dos 99,4% de *L. innocua* também avaliadas. Este sistema de

identificação foi recomendado por FUJISAWA & MORI (1994), que sugeriram o uso concomitante com o ágar sangue Columbia com 5% de sangue de cavalo fresco, para uma correta, fácil e rápida detecção e identificação de *L. monocytogenes*.

Tabela 3. Métodos oficiais para isolamento de *L. monocytogenes* em alimentos

Método	Enriquecimento	Incubação temperat./ tempo	Ágar	Incubação temperat./ tempo	Referência
FDA (cél. não injuriadas)	EB	30°C / 24, 48 h	OXA LPM	35°C / 24, 48 h 30°C / 24, 48 h	HITCHINS, 1992
FDA (cél. injuriadas)	EB + 0,1% de piruvato de sódio adicionar agentes seletivos	30°C / 6h 30°C / 48h	OXA LPM	35°C / 24, 48 h 30°C / 24, 48 h	
USDA	LEB MFB	30°C / 24 h 35°C / 24, 48h	MOX		McCLAIN & LEE, 1989
HPB ^a	LEB MFB	30°C / 24, 48h 35°C / 24, 48h	OXA LPM MOX PAL	35°C / 24, 48 h 30°C / 24, 48 h 35°C / 24, 48 h 35°C / 24, 48 h	WARBURTON et alii, 1991a

EB = Caldo de enriquecimento (HITCHINS, 1992).

LEB = Caldo de enriquecimento para *Listeria* (McCLAIN & LEE, 1989).

MFB = Caldo Fraser modificado (McCLAIN & LEE, 1989).

OXA = Ágar Oxford (CURTIS et alii, 1989).

LPM = Ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LEE & McCLAIN, 1986).

MOX = Ágar Oxford modificado (McCLAIN & LEE, 1989).

PAL = Ágar Palcam (VAN NETTEN et alii, 1989).

^a O HPB recomenda que se use pelo menos 2 meios sólidos seletivos.

3.8. TÉCNICA DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP) PARA CONTAGEM

Os métodos apresentados anteriormente avaliam a presença de *Listeria* spp nas amostras, mas não podem determinar a sua quantidade.

A técnica do NMP é usada para estimar o número de microrganismos em uma amostra. Embora não seja uma determinação precisa, ela consegue estimar baixas concentrações de bactérias que são dificilmente detectáveis pelos métodos diretos

de contagem. Esta técnica é comumente utilizada para a determinação de coliformes em alimentos (PEELER et alii, 1992).

O emprego do protocolo do NMP aumenta a complexidade da análise em pelo menos 9 vezes (para um NMP de 3 tubos); mas é a única forma efetiva para obter dados quantitativos quando o nível de *L. monocytogenes* é inferior a 20-50 unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) (BUCHANAN, 1990).

A FDA prevê a quantificação pela técnica do NMP de 5 tubos em casos de amostras implicadas diretamente com listeriose de origem alimentar (HITCHINS, 1992).

A técnica de contagem pelo NMP já tem sido usada por alguns pesquisadores para avaliar a quantidade de *Listeria* sp. em produtos cárneos comercializados (BUCHANAN et alii, 1989; WENGER et alii, 1990; BUYSER et alii, 1990; COMI et alii, 1990; VALLAVANTI, 1994; WANG & MURIANA, 1994), em leite cru (SLADE & COLLINS-THOMPSON, 1988), em queijos (COMI et alii, 1990) e em patês (FARBER & DALEY, 1994).

BUCHANAN et alii (1989), WENGER et alii (1990) e BUYSER et alii (1990) avaliaram produtos cárneos utilizando a técnica do NMP de 3 tubos com uma etapa de enriquecimento.

O caldo da Universidade de Vermont (UVM), seguido da sementeira em ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LPM) e Vogel Johnson modificado (MVJ) foram usados por BUCHANAN et alii (1989) na avaliação de carnes de aves e produtos marinhos.

BUYSER et alii (1990), compararam a técnica de contagem de *Listeria* sp em produtos cárneos pelo NMP, utilizando-se o caldo de enriquecimento para *Listeria* (LEB) seguido pelo isolamento em ágar Oxford modificado (MOX) com a contagem direta em ágar Oxford modificado e verificaram que mais de 90% do total (102) de amostras apresentavam um nível de contaminação menor que 100 listerias/g. Nas amostras em que foi possível realizar a contagem pelo método direto, os resultados foram similares ao NMP.

WENGER et alii (1990) determinaram o nível de contaminação de *Listeria* sp, em salsicha de peru, através da técnica do NMP usando o LEB seguido da semeadura em LPM.

COMI et alii (1990) avaliaram queijos e produtos cárneos, mas usaram a técnica do NMP com 5 tubos. O LEB foi utilizado para o enriquecimento e o ágar Palcam para o isolamento.

Em estudo de VALLAVANTI et alii (1994) amostras de carnes bovina, suína e de aves foram avaliadas quanto a contaminação por *Listeria* spp através da técnica do NMP segundo a metodologia preconizada pelo Decreto Ministerial da Itália.

BUNCIC et alii (1991), utilizaram esta técnica para avaliar o comportamento de *L. monocytogenes* durante o processo de produção de lingüiça fermentada. O procedimento envolveu o NMP de 3 tubos com o uso de duas etapas de enriquecimento em caldo de enriquecimento para *Listeria* (LEB) e caldo secundário de enriquecimento para *Listeria* (LEB2) e então isolamento em ágar LPM.

Para verificar o nível de contaminação de patés, FARBER & DALEY (1994) também utilizaram o NMP de 3 tubos com duas etapas de enriquecimento, porém com os meios UVM e Caldo Fraser (FB) seguido do plaqueamento em LPM e ágar Oxford (OXA). WANG & MURIAMA (1994), usaram o método com os meios UVM seguido do FB e plaqueamento em MOX para quantificar *L. monocytogenes* em exudato de salsichas.

GUYEY & JEMMI (1991) e JEMMI & KEUSCH (1992) estudaram o comportamento de *L. monocytogenes* durante a fabricação e estocagem de salmão defumado e truta defumada respectivamente, usando a técnica de 3 tubos com uma etapa de enriquecimento em LEB e posterior isolamento em ágar Palcam.

SWAMINATHAN et alii (1988) compararam a contagem direta em placa, em Ágar McBride, com NMP utilizando-se o caldo de enriquecimento (EB) e LEB em queijos altamente contaminados e provaram que o NMP poderia estimar altos níveis de *L. monocytogenes*.

BLYSICK-MCKENNAL & SCHAFFNER (1994) modificaram o método de isolamento da FDA e usaram-no para quantificar *L. monocytogenes* em produtos

lácteos com baixo teor de gordura. Com o NMP de 3 tubos foi possível enumerar baixos níveis de *L. monocytogenes* em leite mesmo na presença de altos níveis de *Pseudomonas aeruginosa* e *Lactobacillus casei*.

GOHIL et alii (1995b), inocularam *L. monocytogenes* em iogurte concentrado fermentado ("labneh") e compararam a contagem pelo NMP de 3 tubos em LEB por 48 horas com o UVM seguido do FB. Para o isolamento usaram o ágar OXA. Nas amostras inoculadas em quantidade maior que 100 UFC/g, o NMP também foi comparado com espalhamento direto em placas com ágar Palcam e ágar OXA. A níveis inferiores a 10 UFC/g, os resultados variaram dentro do limite de confiança de 95% descrito na tabela do NMP. Porém para valores acima de 10 UFC/g houve uma grande variabilidade entre as replicatas

Recentemente, YU & FUNG (1993) criaram um procedimento para contar *L. monocytogenes* usando a técnica do NMP de 5 tubos. Nos ensaios são utilizados tubos especiais em forma de "J" onde o caldo tripticase soja contendo esculina, citrato férrico e Oxyrase fica no compartimento A (parte longa do tubo) e o caldo Fraser no compartimento B (parte curta do tubo), comunicadas por um ágar MOX semi-sólido. A *L. monocytogenes* presente na unidade A inoculada se moverá através do ágar semi-sólido para o compartimento B, que então será isolada em ágar seletivo para Listeria. Esta técnica foi efetiva na contagem de baixos e altos níveis do agente em produto cárneo reestruturado.

3.9. O USO DO FOSFATO TRISSÓDICO NA DESCONTAMINAÇÃO DE CARCAÇAS DE FRANGO

As aplicações de fosfato trissódico (TSP) em grau não alimentício inclui a limpeza industrial, pintura, solda e fluídos de freio, enquanto em grau alimentício, já tem sido introduzido como preservante e agente emulsificante (ANÔNIMO, 1994b).

Em 1992, o Ministério da Agricultura dos Estados Unidos (USDA) aprovou o uso do TSP no processamento de aves. O emprego de soluções TSP de 8 a 12% foi autorizado em processos de imersão ou pulverização de carcaças por 15 s a

temperatura de 45 a 55°F (7 - 13°C) após resfriamento ou a 65 a 85°F (18 - 30°C) antes do resfriamento (ANÔNIMO, 1994e).

Segundo o "Food Safety and Inspection Service" (FSIS) do USDA, o uso do TSP apresenta os seguintes benefícios (ANÔNIMO, 1994d): o tratamento com TSP reduz significativamente os níveis bacterianos em carcaças de aves, incluindo os patogênicos ao homem; o TSP é seguro; o uso de TSP em concentrações e períodos de tempo aprovados não deixa resíduos nocivos ao consumidor; testes mostraram a aceitação pelo consumidor das aves tratadas com TSP; teste da FSIS não indicaram problemas com umidade ou retenção de água em carcaças tratadas com TSP.

A avaliação da qualidade sensorial quanto aos parâmetros sabor, textura e aparência de frangos tratados com TSP revelaram uma boa aceitação pelo consumidor. HATHCOX et alii (1995) verificaram que tratamento de frangos com solução a 12% de TSP durante 15 segundos não afetava a qualidade sensorial de frangos crus e fritos. As amostras de frango tratadas com solução a 8% de TSP por 15 minutos, após 8 dias, tiveram a preferência do consumidor (HOLLENDER et alii, 1993).

Quanto aos efeitos negativos, o TSP pode destruir a córnea, pode causar dermatite após repetido contato e pode provocar uma reação cáustica que pode corroer o aço inoxidável e o latão (ANÔNIMO, 1994c).

A instalação de equipamentos especiais para o tratamento de aves com TSP não afeta a velocidade da operação de resfriamento. Os equipamentos consistem de um tanque de mergulho, sistema de filtração, tanque de mistura, equipamento de "spray" e uma bomba (GIESE, 1992). De acordo com o FSIS, o custo do equipamento por linha de processamento é de U\$ 45.000 e 0,5 centavos por ave para o TSP (ANÔNIMO, 1994a)

O TSP causa a morte de bactérias Gram negativas através do rompimento da membrana celular externa (fosfolipídica) pela ação do alto pH da solução, interferência no metabolismo pela ação do fosfato e pelo bloqueio de transferências iônicas ($PO_4 \leftrightarrow Na^+, K^+$). Além disso promove a dissolução da gordura, permitindo a penetração do produto dentro dos poros de inserção das penas, local de

contaminação elevada (RHODIA, s.d.). Contudo, KIM et alii (1994b) sugerem que um dos principais mecanismos do TSP é a remoção bacteriana da superfície da pele.

No Brasil, em 1995, a Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde concedeu, através da Portaria nº 72 de 24 de agosto de 1995, o registro do produto “Rhodigard” ou “Avgard” da Rhodia S/A.

O Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária autorizou o uso do fosfato trissódico dodecahidratado, comercialmente conhecido como “Rhodigard” ou “Avgard”, para ser utilizado como coadjuvante de tecnologia na lavagem de ovos, carcaça das diferentes espécies de animais e açougue, peixes e crustáceos com o objetivo de reduzir a carga bacteriana, em estabelecimentos com Inspeção Federal. Esta autorização foi concedida pela Divisão de Operações Industriais através do ofício DOI/DIPOA nº 305/95 de 28 de novembro de 1995.

As pesquisas sobre o efeito do tratamento de carcaças de frango com soluções de TSP revelam uma redução da contaminação por *Campylobacter*, *Escherichia coli* e *Salmonella*.

SLAVIK et alii (1994), determinaram o efeito da imersão de carcaças de frango em solução de TSP a 10 %, a temperaturas de 10 e 50°C por 15 segundos e verificaram que a 50°C ocorria uma redução de 1,2 a 1,5 log na contagem de *Campylobacter* das carcaças e uma redução de 0,16 log nas carcaças tratadas a 10 °C. FEDERIGHI et alii (1995) porém, constataram uma redução de 1,3 ciclos log de *Campylobacter* termotolerante após imersão a temperatura ambiente por 15 s em solução a 10%.

KIM et alii (1994a) constataram que as carcaças de frango tratadas com solução de 10% de TSP a 10 e 50°C por 15 segundos apresentavam uma redução de incidência de *Salmonella* de 12-24% (grupo controle) para 0-8%. As amostras contaminados com *Salmonella* tiveram uma redução de 1,6 a 1,8 log quando tratadas com TSP.

Salmonella typhimurium aderidas a pele de coxa de frango tiveram uma redução de 2,2 log a 10°C e 1,7 a 50°C quando tratadas com solução a 10% de TSP por 15 segundos (KIM et alii, 1994b). O tratamento a 10°C por tempo maior (15 minutos) no entanto, não aumentou a redução desta bactéria em pele de frango que foi de 2 ciclos (LILLARD, 1994).

Em carne bovina, redução da contaminação de *Salmonella*, *E. coli* e *L. monocytogenes* tratadas com TSP também foram divulgadas por KIM & SLAVIK (1994), DICKSON et alii (1994) e GORMAN et alii (1995). O efeito sobre *L. monocytogenes* foi mínimo, com redução de apenas 0,3 log (DICKSON et alii, 1994).

Uma redução da ordem de 1,3 log de *L. monocytogenes* foi observado por HWANG & BEUCHAT (1995) em pele de frango inoculado após tratamento com solução a 1% de TSP durante 30 minutos a 25 °C.

SOMERS et alii (1994) determinaram o efeito de TSP sobre biofilmes de *L. monocytogenes* em superfícies de aço inoxidável e de borracha e sobre células em suspensão e observaram que *L. monocytogenes* é mais resistente ao efeito do TSP do que a *E. coli* O157:H7, *C. jejuni* e *S. typhimurium*, necessitando de uma exposição de 10 minutos em solução a 8% sob temperatura ambiente ou 20 minutos a 10°C para uma redução de apenas um ciclo log no biofilme, sendo as células em suspensão menos resistentes que o biofilme.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. AMOSTRAS

As amostras analisadas foram adquiridas no comércio varejista do município de Campinas - SP, sendo constituídas de:

- 10 peitos resfriados de frango,
- 20 carcaças resfriadas de frango
- 54 coxas de frango.

4.1.2. MEIOS DE CULTURA

- Caldo de Enriquecimento para *Listeria* (Oxoid - formulação UVM), suplementado com 20 mg/l de ácido nalidíxico (Harmless Chemical) e 12 mg/l de acriflavina (Sigma) segundo McCLAIN & LEE, 1989 - LEB;
- Caldo Fraser (Caldo de Enriquecimento para *Listeria* da Oxoid - formulação UVM), suplementado com 3g/l de cloreto de lítio (Merck), 20 mg/l de ácido nalidíxico (Harmless Chemical), 12 mg/l de acriflavina (Sigma) e 0,5 g/l de citrato férrico amoniacal (Riedel-de Haën) segundo FRASER & SPERBER, 1988 - FB;
- Caldo Fraser Modificado (Caldo de Enriquecimento para *Listeria* da Oxoid - formulação UVM), suplementado com 3 g/l de cloreto de lítio (Merck), 20 mg/l de ácido nalidíxico (HarmlessChemical), 25 mg/l de acriflavina (Sigma) e 0,5 g/l de citrato férrico amoniacal (Riedel-de Haën) segundo McCLAIN & LEE, 1989 - MFB;
- Caldo Fraser Modificado nesta pesquisa (Caldo de Enriquecimento para *Listeria* da Oxoid - formulação UVM), suplementado com 3 g/l de cloreto de lítio (Merck), 20 mg/l de ácido nalidíxico (HarmlessChemical), 20 mg/l de acriflavina (Sigma) e 0,5 g/l de citrato férrico amoniacal (Riedel-de Haën) - MdFB;
- Ágar Cloreto de Lítio Feniletanol Moxalactam (Difco) suplementado com 20 mg/l de moxalactam (Sigma) segundo LEE & Mc CLAIN, 1986 - LPM;

- Ágar Oxford Modificado (Ágar Oxford da Oxoid) suplementado com 10 mg/l de colistina (Sigma) e 20 mg/l de moxalactam (Sigma) segundo McCLAIN & LEE, 1989 - MOX;
- Caldo Triptona e Soja (Difco) suplementado com 6 g/l de extrato de levedura (Difco) - TSBYE;
- Ágar Triptona e Soja (Oxoid) suplementado com 6g/l de extrato de levedura (Difco) - TSAYE;
- Ágar Tríplice Açúcar e Ferro (Difco) - TSI;
- Meio SIM (Merck);
- Caldo MR-VP (Difco);
- Caldo Base de Púrpura de Bromocresol (Difco) acrescido de manitol (Difco), ramnose (Difco), dextrose (Difco) ou xilose (Merck);
- Caldo Nitrato preparado no laboratório, segundo FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), 1984;
- Agar Sangue Columbia (Difco) com 5% de sangue desfibrinado de cavalo (Biotério Boa Vista);
- TSAYE com 5% de sangue desfibrinado de carneiro (Biotério Boa Vista);
- Solução peptonada a 0,1% (peptona da Difco);
- Tampão fosfato de Butterfield (Fosfato de potássio monobásico p.a., Nuclear), segundo FDA, 1984;
- API *Listeria* (BioMérieux).

4.1.3. AGENTES QUÍMICOS SANITIZANTES

- Fosfato trissódico ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) - Rhodgard (Rhodia):
 - Solução aquosa a 8%;
 - Solução aquosa a 12%.
- Hipoclorito de sódio (NaOCl) (Alkchimia):
 - Solução a 5ppm (fator = 0,97) de cloro total;
 - Solução a 20ppm (fator = 1,18) de cloro total

4.1.4. REAGENTES

- Ácido acético glacial p.a., Merck;
- Amido solúvel para iodometria p.a., Ecibra;
- Dicromato de potássio p.a., Ecibra;
- Iodeto de potássio p.a., Merck;
- Fosfato de potássio monobásico p.a., Nuclear;
- Fosfato de sódio dibásico p.a., Synth;
- N, N dietil fenilenodiamina, Sigma;
- Sulfato ferroso amoniacal p.a., Baker;
- Tiosulfato de sódio pentahidratado p.a., Merck.

4.1.5. CEPA BACTERIANA

- *Listeria monocytogenes* Scott A (originária de material clínico de um surto de toxinfecção alimentar; sorotipo 4b) fornecido pelo FDA.

4.1.6. EQUIPAMENTOS

- Balança semi-analítica, Sartorius, modelo U 3600;
- Balança analítica, Mettler Toledo, modelo AB 204;
- Balança semi-analítica, Micronal, modelo B 400;
- Capela de fluxo laminar vertical, Veco, modelo VLFS-12;
- Centrífuga refrigerada, Beckman, modelo J2-21;
- Contador de colônias, Phoenix, modelo CP 600;
- Estufa Incubadora para BOD, Fanem , modelo 347 CD;
- Estufa Incubadora para BOD, Fanem, modelo 347 F;
- Homogeneizador de pistões ("Stomacher"), Seward Medical, mod. Lab Blender 400;
- Incubadora com agitação orbital, Lab Line Instruments, modelo 3527;
- Microscópio estereoscópico, Carl Zeiss, modelo 4752, com iluminador, Scott, modelo KL 1500;
- Microscópio biológico triocular, Carl Zeiss, modelo Jenaval;
- Potenciômetro, Micronal, modelo B 374;
- Outros equipamentos de uso comum em laboratório de microbiologia.

4.2. MÉTODOS

Este trabalho desenvolveu-se em 2 fases distintas:

- 1) Estudo de metodologia para a quantificação de *Listeria* sp. e sua ocorrência em peitos e carcaças de frango;
- 2) Avaliação da redução da contaminação por *L. monocytogenes* em frangos pela aplicação de agentes químicos.

4.2.1. METODOLOGIA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE *Listeria* spp. E SUA OCORRÊNCIA EM PEITOS E CARÇAÇAS DE FRANGO

Nesta primeira fase foram analisadas 10 amostras de peito resfriado de frango e 20 amostras de carcaça resfriada de frango, num total de 30 amostras. As amostras foram adquiridas no comércio varejista do município de Campinas - São Paulo e transportadas ao laboratório em caixas isotérmicas contendo gelo e mantidas sob refrigeração até o momento da análise.

4.2.1.1. Amostragem

Inicialmente, foram coletados os dados sobre a procedência, marca, data de embalagem e validade de cada produto. As carcaças foram retiradas de suas embalagens originais e pesadas (sem cabeça, pescoço, miúdos e pés) em condições assépticas, em capela de fluxo laminar vertical. A amostragem da carcaça foi realizada pelo método de enxágüe (SURKIEWICZ et alii, 1969) utilizando-se 300 ml de LEB e homogeneização manual por 2 minutos.

Para as amostras de peito, uma unidade analítica de 25 g, incluindo pele e músculo, foi retirada assepticamente e homogeneizada com 225 ml de LEB em homogeneizador de pistões ("Stomacher") por 2 minutos.

4.2.1.2. Detecção de *Listeria* spp

O método utilizado foi o da USDA (Mc CLAIN & LEE, 1989) modificado e as etapas são apresentadas no esquema da **Figura 1**.



A amostra homogeneizada em LEB foi incubada a 30°C e após 24 horas, 0,1 ml foi inoculado em 10 ml de MFB e após mais 24 horas de incubação (perfazendo 48 h) foi plaqueado por estrias em placas com ágar LPM e MOX. O caldo MFB foi incubado a 35°C por 24-48 horas e tanto os tubos positivos (coloração escura ou preta) como os negativos (sem escurecimento) foram semeados por estrias em placas de LPM e MOX. As placas de LPM foram incubadas a 30°C por 48 h e as placas de MOX a 35°C por 48 h para posterior isolamento e identificação, conforme item seguinte.

A detecção de *Listeria* spp foi realizada concomitantemente com a quantificação (item 4.2.1.4.2.)

4.2.1.3. Isolamento e Identificação

Três colônias típicas de cada placa de LPM (colônias azul-esverdeado sob luz transmitida) e MOX (colônias pretas com halo escuro) foram purificadas e mantidas em TSAYE até a identificação, que foi realizada através de:

- a) caracterização morfológica pela coloração de Gram e bioquímica pelas provas de produção de catalase, oxidase, β -hemólise em ágar sangue de cavalo, produção de indol, motilidade a 25°C, reação característica em ágar TSI, vermelho de metila, Voges Proskauer, uréia, redução de nitrato, produção de ácido a partir de glicose, ramnose, manitol e xilose e Camp teste, conforme DONNELLY et alii (1992) ou,
- b) emprego do método rápido API Listeria, conforme recomendação da BioMérieux (**Anexo 1**), que prevê a caracterização morfológica pela coloração de Gram, as provas de catalase, oxidase, β -hemólise em sangue de cavalo e motilidade a 25°C, antes da utilização do API Listeria. O sistema com 10 testes, baseia-se na presença de arilamidase (teste de DIM), hidrólise da esculina, presença de α -manosidase, produção de ácido a partir de D-arabitol, D-xilose, L-ramnose, α -metil-D-glicosídeo, D-ribose, glicose 1 fosfato e D-tagatose.

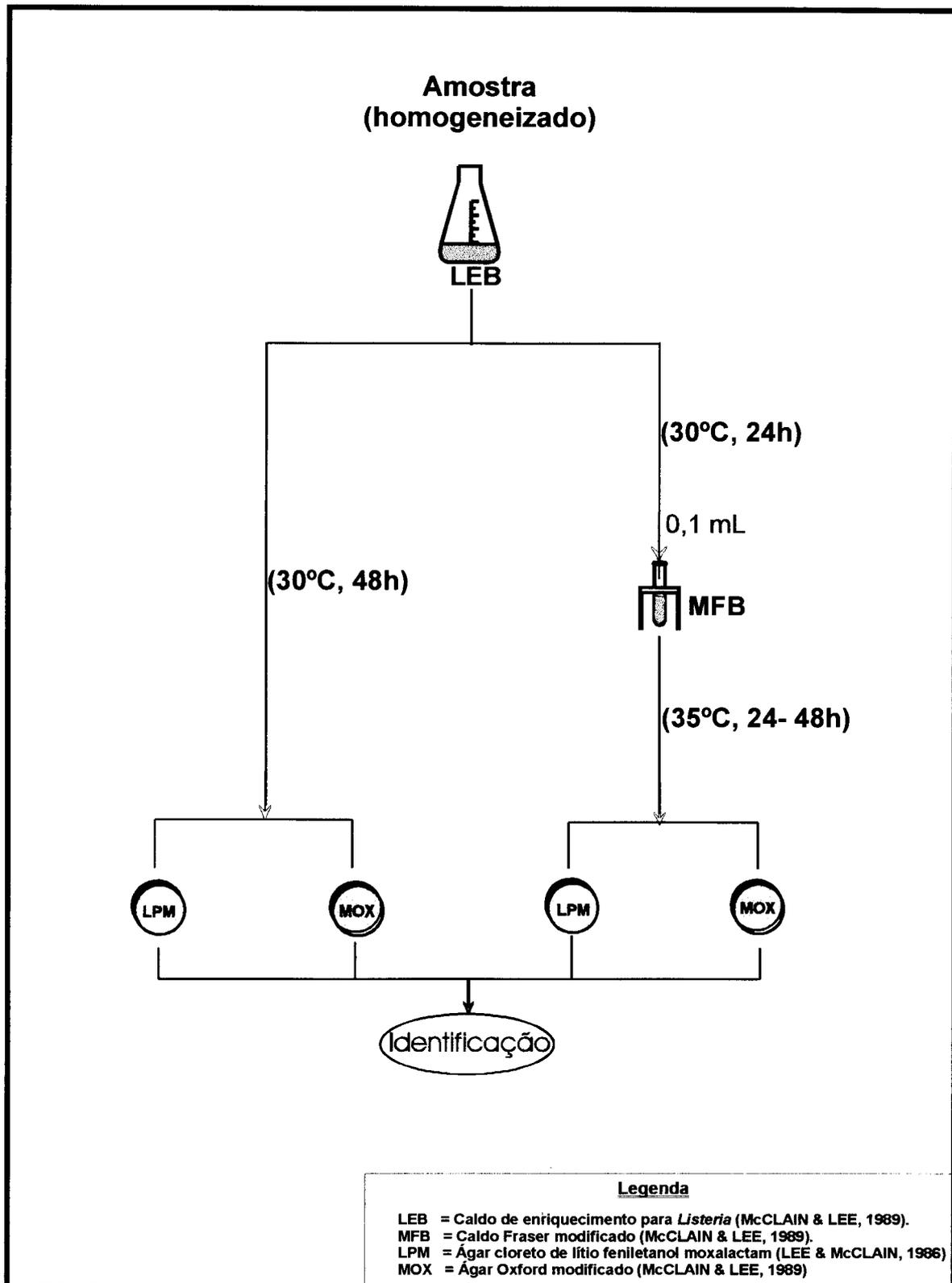


Figura 1. Esquema da metodologia para detecção de *Listeria* spp em frangos (McCLAIN & LEE, 1989 - modificado).

4.2.1.4. Proposta de Metodologia para Quantificação de *Listeria* spp.

4.2.1.4.1. Avaliação do crescimento de uma cepa padrão de *L. monocytogenes* em Diferentes Meios de Enriquecimento

Foi avaliado o crescimento de uma cepa padrão de *L. monocytogenes* (Scott A) em: LEB contendo 0,5 g/l de citrato férrico amoniacal (LEBc), FB, MFB e MdFB.

Após duas transferências sucessivas de *L. monocytogenes* (Scott A) em TSBYE incubados a 35°C por 24 horas, 1 ml de cultura de 24 h foi diluída em solução peptonada até a concentração de 10^4 UFC/ml; 1 ml desta, foi inoculado em duas séries de frascos contendo 100 ml de cada um dos meios de enriquecimento: LEBc, FB, MFB e MdFB. Uma série dos meios foram incubados a 30°C e outra série a 35°C, a intervalos de tempos de 0, 3, 6, 9, 12, 24, 27, 30, 36 e 48 horas. A contagem do número de células foi realizada retirando-se 1 ml de caldo e utilizando-se a técnica de contagem em profundidade (SWANSON et alii, 1992) em TSAYE, após 48 h de incubação a 35°C.

O meio (MdFB a 35°C) que proporcionou o crescimento de *L. monocytogenes* semelhante ao caldo LEBc a 30°C foi utilizado posteriormente para verificar a contagem da cepa padrão pela técnica do NMP de 3 tubos usualmente empregada para bactérias coliformes (PEELER et alii, 1992).

4.2.1.4.2. Contagem de *Listeria* spp pela Técnica do NMP

O esquema da metodologia para quantificação de *Listeria* spp pela técnica do NMP de 3 tubos é apresentado na **Figura 2**. O estudo foi realizado seguindo três procedimentos: **a)** incubação em meio **LEB**, a 30°C por 48 h; **b)** utilização de 2 etapas de enriquecimento, primeiro em **LEB** a 30°C por 24 h e em seguida em meio **MFB** a 35 °C por 24 a 48 h, meios estes recomendados pelo “USDA” (McCLAIN & LEE, 1989) para detecção de *L. monocytogenes* em carnes e, **c)** incubação em meio modificado nesta pesquisa **MdFB** a 35°C por 48 h.

Inicialmente, foram retiradas alíquotas de 10 e 1 ml da amostra homogeneizada em LEB (diluição 10^{-1}), preparada no item 4.2.1.1, e 1 ml das diluições 10^{-2} e 10^{-3} (preparadas a partir da diluição 10^{-1} em solução peptonada) e em seguida inoculadas conforme descrição abaixo:

a) Inoculação em tubos contendo 10 ml de LEB:

os tubos com o inóculo foram incubados a 30°C por 48 horas. A partir de cada tubo, foi realizada a semeadura em placas de LPM e MOX para posterior isolamento e identificação das colônias típicas de *Listeria* sp conforme o item 4.2.1.3. Neste ensaio, pela impossibilidade da observação visual, a contagem do Número Mais Provável foi confirmada (**NMPc**) após a identificação positiva dos microrganismos nas placas.

b) Inoculação utilizando dois meios de enriquecimento:

a partir dos tubos inoculados em LEB e incubados a 30°C por 24 horas (item anterior), 0,1 ml foi retirado e transferido para tubos contendo 10 ml de MFB, os quais foram incubados a 35°C por 24 - 48 horas. A leitura do Número Mais Provável presuntivo (**NMPp**) foi realizada considerando-se positivos os tubos com escurecimento (marrom ou preto) devido a hidrólise da esculina. A partir de cada tubo positivo e negativo (sem escurecimento) foram realizadas semeaduras em LPM e MOX. As colônias típicas foram isoladas e identificadas como em 4.2.1.3. Assim, o Número Mais Provável confirmado (**NMPc**) pode ser comparado com os valores do Número Mais Provável presuntivo (**NMPp**).

c) Inoculação em tubos contendo 10 ml de MdFB:

os tubos de MdFB foram incubados a 35°C por 48 h. Previamente, nos tubos aonde foram inoculadas alíquotas de 10 ml da amostra homogeneizada em LEB, as concentrações de LiCl, acriflavina e cloreto férrico amoniacal foram ajustadas para não alterar a concentração final do meio. A contagem do Número Mais Provável presuntivo (**NMPp**) e a sua confirmação, Número Mais Provável confirmado (**NMPc**), foram realizadas conforme o procedimento anterior.

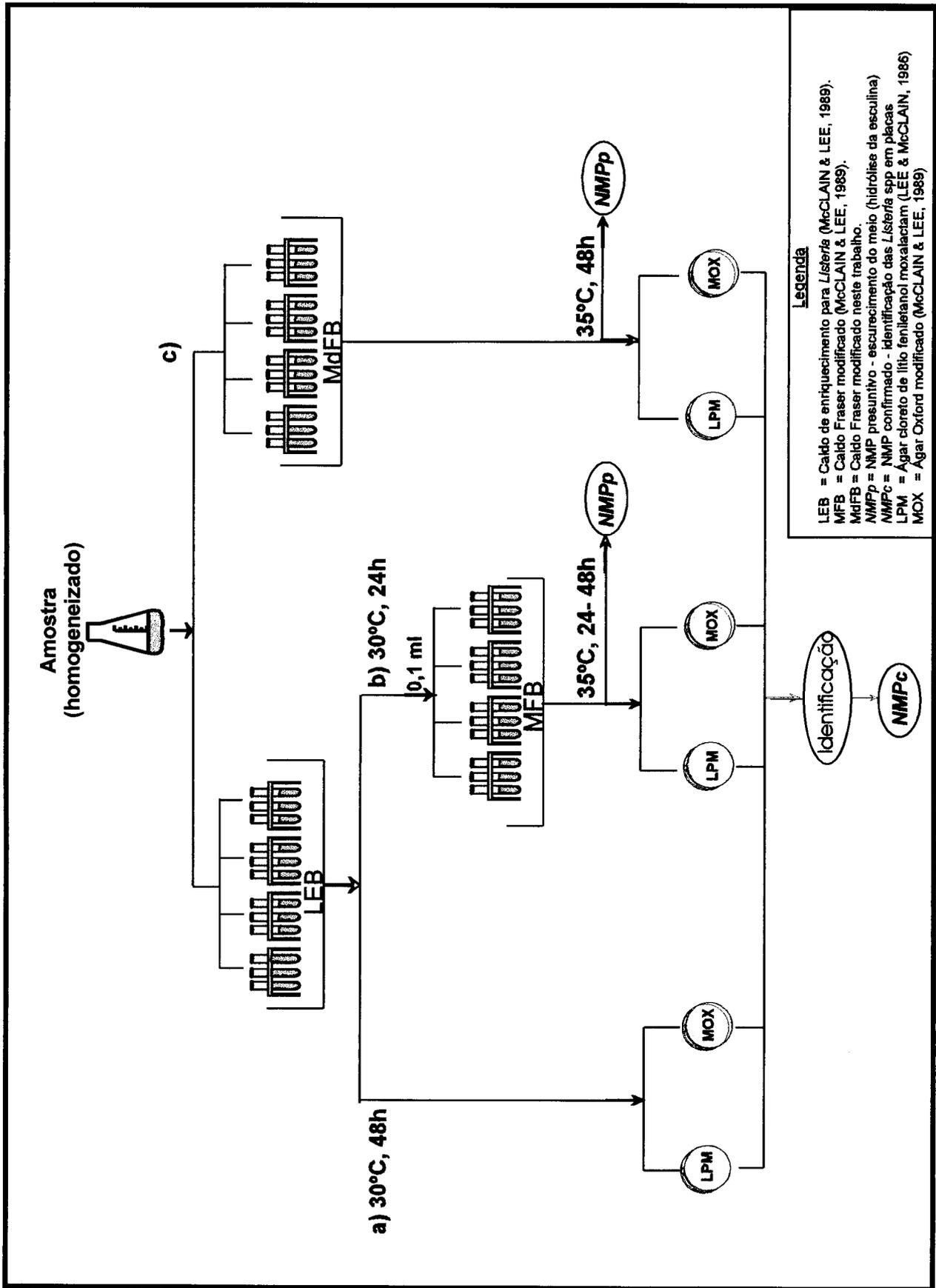


Figura 2. Esquema da metodologia para quantificação de *Listeria* spp pela técnica do NMP.

Numa primeira fase, os diferentes métodos (**a**, **b** e **c**) foram avaliados utilizando-se cepa padrão de *L. monocytogenes* (Scott A). Nestes ensaios, após duas transferências sucessivas de *L. monocytogenes* em TSBYE a 35°C durante 24 horas, foram preparadas suspensões de 25 ml contendo de 10¹ a 10² UFC/ml de *L. monocytogenes* em água peptonada e em água de enxágüe de carcaça. A água de enxágüe de carcaça foi obtida através do enxágüe (conforme item 4.2.1.1.) de uma carcaça resfriada de frango em 150 ml de solução peptonada. As contagens de *L. monocytogenes* das suspensões utilizadas foram realizadas pelos métodos de profundidade (SWANSON et alii, 1992) em TSAYE e de superfície (SWANSON et alii, 1992) em LPM, respectivamente para as suspensões em solução peptonada e em água de enxágüe de carcaça.

Os resultados da contagem foram interpretados segundo a tabela do NMP (anexo 2) descrito em PEELER et alii, 1992.

Na fase posterior, os três métodos de quantificação pelo NMP foram avaliados em 10 amostras de peito resfriado de frango e em 10 amostras de carcaça resfriada de frango.

Na seqüência do trabalho, devido aos resultados obtidos, as demais amostras de carcaça (10) foram quantificadas somente utilizando-se o MdFB.

4.2.2. AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR *L. monocytogenes* EM FRANGOS, PELA APLICAÇÃO DE AGENTES QUÍMICOS

Nesta pesquisa, coxas resfriadas de frango adquiridas sempre de um mesmo fornecedor foram contaminadas com 5 cepas de *L. monocytogenes* isoladas da pesquisa anterior, e agentes químicos relacionados no item 4.1.3. foram avaliados frente a redução de *L. monocytogenes*, às temperaturas de 4 e 25°C. Cada experimento teve 2 repetições.

4.2.2.1. Preparo da Suspensão Bacteriana

Cinco cepas de *L. monocytogenes* sorotipadas pelo Fundação Oswaldo Cruz (cepas n^os : 13, sorotipo 1/2a e 308, sorotipo 4b provenientes de peitos e M347, sorotipo 1/2a; M685, sorotipo 4b e M850, sorotipo 4b provenientes de carcaça), isoladas anteriormente (item 4.2.1.4.2.c), foram semeadas separadamente em TSBYE e incubadas a 35°C. Após 18-24h de incubação, 0,1 ml de crescimento foi inoculado em 100 ml de TSBYE e incubados sob agitação (120 rpm) a 35°C por 24h. As culturas foram centrifugadas a 1600 x g por 30 minutos à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado de células foi ressuscitado em 10 ml de solução peptonada. A suspensão de *L. monocytogenes*, contendo 10⁷ UFC/ml, foi preparada adicionando-se em 3 L de solução peptonada 3 ml de cada cultura centrifugada.

4.2.2.2. Contaminação Artificial das Coxas de Frango

As coxas adquiridas no comércio local foram submetidas primeiramente a um pré-enxágüe com água potável corrente e então foram imersas na suspensão de cultura por 10 minutos. As amostras foram retiradas da solução e deixadas a 4°C por 2 horas para drenagem do excesso de líquido. Na **Figura 3**, a seqüência dos procedimentos é apresentada de forma esquemática.

4.2.2.3. Preparo das Soluções Sanitizantes

As soluções de fosfato trissódico e hipoclorito (relacionadas no item 4.1.3.) foram preparadas com água destilada estéril e o pH foi determinado com potenciômetro.

A dosagem de cloro disponível total nas soluções de hipoclorito de sódio a 5 ppm de cloro, foi realizada utilizando-se o método Titulométrico - DPD Ferroso da American Public Health Association n^o 4500-CI F (APHA, 1992) e nas soluções a 20 ppm pelo método Iodométrico da American Public Health Association n^o 4500-CI C. (APHA, 1992).

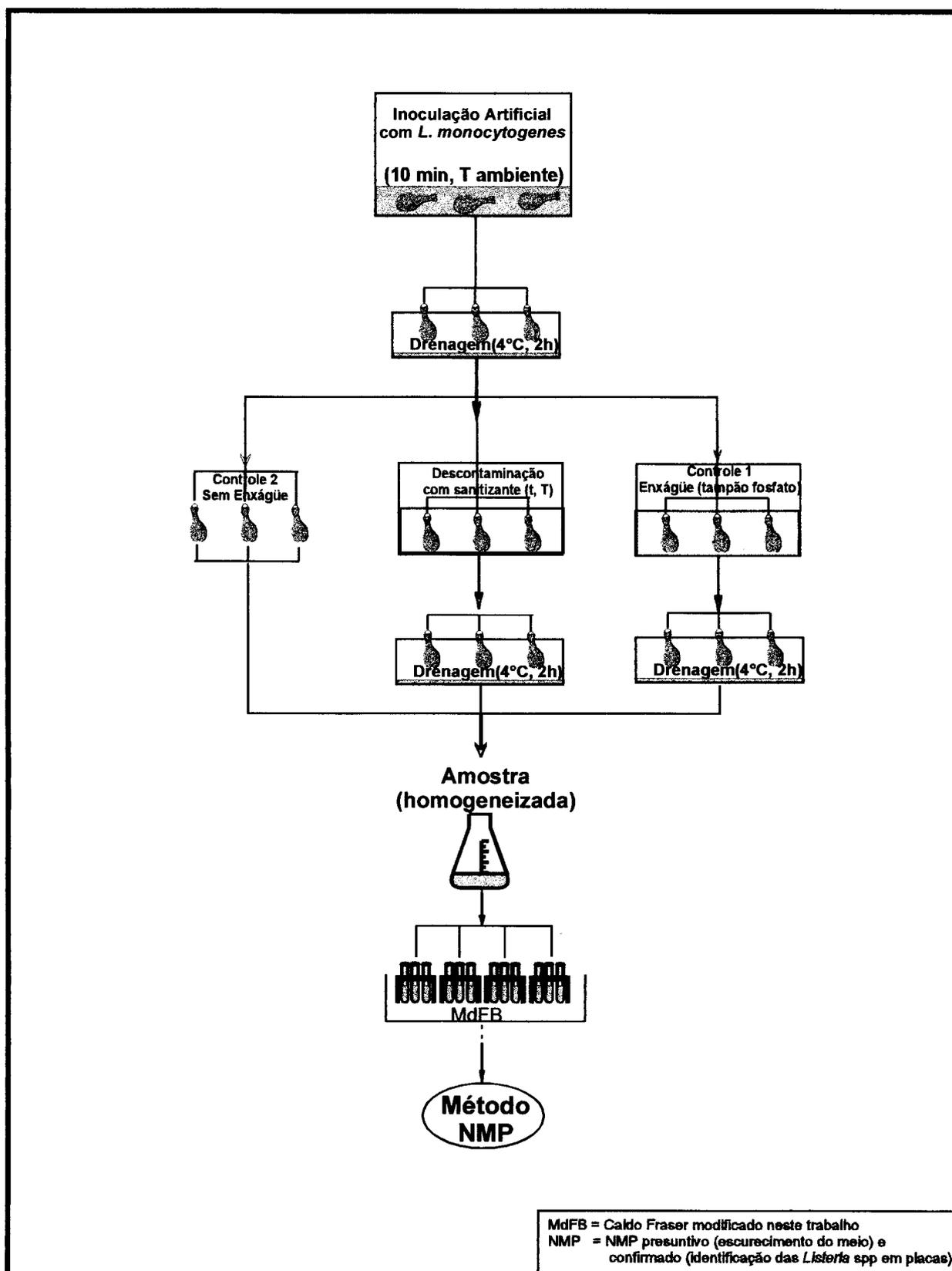


Figura 3. Esquema para avaliar a eficiência de agentes sanitizantes na redução da contaminação de coxas de frango artificialmente inoculadas com *L. monocytogenes*

4.2.2.4. Tratamento com Agentes Sanitizantes

Após a contaminação, cada grupo de 3 coxas foi submetido a descontaminação com os agentes apresentados no item 4.1.3. Para tanto, as coxas foram imersas em 800 ml de cada solução teste. Para as soluções de fosfato trissódico, as coxas foram deixadas em contato por 1 minuto a 25°C e as soluções de hipoclorito e 20 minutos à temperatura de 4 °C .

Após o contato com as soluções sanitizantes, as coxas foram colocadas a 4°C por 2 horas para drenagem do excesso de líquido, e posterior quantificação da *L. monocytogenes*.

Paralelamente aos tratamentos com os sanitizantes, um grupo de 3 coxas (Controle 1) também foi submetido a imersão em 800 ml de solução tampão fosfato de Butterfield estéril nas mesmas condições de tempo e temperatura utilizadas nos diferentes testes, servindo de controle para cada experimento.

4.2.2.5. Contagem de *L. monocytogenes*

Após o tratamento com os agentes sanitizantes, 10 g de pele foram coletados assepticamente, em capela de fluxo laminar, e homogeneizados em 90 ml de LEB por 2 min, em homogeneizador de pistões. A partir do homogeneizado, diluições decimais foram feitas com solução peptonada e a contagem foi realizada pelo método do NMP de 3 tubos utilizando-se o meio MdFB, conforme descrito em 4.2.1.4.2. item c. Os tubos positivos e os negativos foram semeados por estrias em MOX. Após 48 horas de incubação a 35°C, colônias típicas suspeitas foram isoladas do MOX e submetidas a alguns testes. As colônias isoladas foram consideradas *L. monocytogenes* quando produziu β-hemolisina em sangue de cavalo, não utilizou xilose a reação do Camp teste foi positivo com *S. aureus*. Os resultados da contagem foram interpretados usando-se a tabela do **NMP** descrita em PEELER et alii (1992).

Um outro grupo de três coxas após contaminação, mas sem tratamento com sanitizante (Controle 2) sofreu o mesmo procedimento de contagem para que o

nível real de contaminação das coxas utilizadas no experimento fosse determinado.

4.2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar o desempenho dos caldos de enriquecimento (LEB e MFB), bem como dos ágaros seletivos (LPM e MOX) durante a detecção de *Listeria* spp em amostras resfriadas de peito e frango inteiro, foi utilizado o teste Z para diferença de proporções com nível de significância de 5%.

A influência da aplicação de hipoclorito de sódio e do fosfato trissódico na redução de *L. monocytogenes* em coxas de frango artificialmente contaminadas foi verificada através de análise de variância de um critério de classificação (ANOVA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ESTUDO DA OCORRÊNCIA E QUANTIFICAÇÃO DE *Listeria* spp EM PEITOS E CARÇAÇAS DE FRANGO

5.1.1. CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS COLETADAS

A descrição das amostras de frango coletadas são apresentadas nas **Tabelas 4 e 5**. No total, foram avaliadas 10 amostras de peito resfriado de frango e 20 carcaças resfriadas de frango, abrangendo 12 marcas distintas denominadas de A a L, sendo 4 diferentes para peito e 11 para carcaça.

Embora todas as amostras estivessem no prazo de validade estipulado na embalagem, variando de 8 a 15 dias a 4°C, deve-se considerar a dificuldade de se encontrar nos pontos de comercialização, balcões refrigerados mantidos a esta temperatura, o mesmo acontecendo nos refrigeradores domésticos. Assim seria necessário que as indústrias revissem este prazo em função da realidade do comércio e do consumidor.

Tabela 4. Dados gerais sobre as amostras de peito resfriado de frango.

Código da Amostra	Código da Marca	Data de Embalagem	Validade	Data de Análise
P1	A	14/02/95	-	16/02/95
P2	B	02/03/95	-	03/03/95
P3	A	01/03/95	-	03/03/95
P4	B	09/03/95	-	14/03/95
P5	B	09/03/95	-	14/03/95
P6	C	31/03/95	8 dias	07/04/95
P7	C	04/04/95	8 dias	07/04/95
P8	D	13/11/95	10 dias	21/11/95
P9	D	16/11/95	10 dias	21/11/95
P10	C	17/11/95	8 dias	21/11/95

Em trabalho realizado por HART et alii (1991) foi observado que *L. monocytogenes* pode crescer em peito de frango em diferentes condições de atmosfera e temperatura de refrigeração. À temperatura de 1°C, não houve crescimento de *L. monocytogenes* durante a estocagem por 20 dias, enquanto que, a 6°C, um pequeno crescimento foi observado durante 15 dias de armazenagem, e a 15°C, a contagem de *L. monocytogenes* aumentou 100 vezes quando estocado em presença de ar por 3 dias, mas ligeiramente menor em 100% de CO₂.

Tabela 5. Dados gerais sobre as amostras de carcaça resfriada de frango.

Código da Amostra	Código da Marca	Data de Embalagem	Validade	Data de Análise	Peso da Carcaça (g)^a
C1	E	16/10/95	10 dias	24/10/95	1.437
C2	A	18/10/95	10 dias	24/10/95	1.763
C3	F	07/11/95	12 dias	08/11/95	1.625
C4	G	02/11/95	10 dias	08/11/95	1.441
C5	E	17/11/95	10 dias	21/11/95	-
C6	H	28/02/96	12 dias	05/03/96	1.519
C7	F	01/03/96	12 dias	05/03/96	1.594
C8	B	19/04/96	10 dias	24/04/96	1.955
C9	A	22/04/96	10 dias	24/04/96	1.457
C10	C	24/05/96	8 dias	30/05/96	1.425
C11	A	31/07/96	10 dias	06/08/96	1.702
C12	A	03/08/96	10 dias	06/08/96	2.056
C13	I	01/08/96	15 dias	06/08/96	1.970
C14	I	01/08/96	15 dias	06/08/96	1.528
C15	E	02/08/96	10 dias	06/08/96	1.831
C16	J	09/08/96	12 dias	15/08/96	1.463
C17	L	12/08/96	15 dias	15/08/96	1.568
C18	M	10/08/96	15 dias	15/08/96	1.425
C19	I	09/08/96	15 dias	15/08/96	1.876
C20	J	09/08/96	12 dias	15/08/96	1.468

^a peso da carcaça sem pés, cabeça, pescoço e miúdos.

5.1.2. OCORRÊNCIA EM PEITOS E CARÇAÇAS RESFRIADA DE FRANGO

Os resultados desta investigação, conforme mostra a **Tabela 6**, revelaram uma contaminação pelo gênero *Listeria* em 96,7% (29) das amostras analisadas e em 70% (21) delas a presença do patógeno *L. monocytogenes*. Do total, 9 (90%) amostras de peito e 20 (100,0%) de carcaça de frango foram positivas para *Listeria* sp, enquanto que *L. monocytogenes* foi encontrada em 9 (90%) amostras de peito e 12 (60%) de carcaça.

Tabela 6. Freqüência de amostras positivas para o gênero *Listeria* e *L. monocytogenes* em amostras resfriadas de peitos e carcaças de frango.

Amostras	Amostras positivas para o gênero <i>Listeria</i>		Amostras positivas para <i>L. monocytogenes</i>	
	N ^a	(%)	N	(%)
Peito	9/10	(90,0)	9/10	(90,0)
Carcaça	20/20	(100,0)	12/20	(60,0)
			18/20	(90,0) ^b
Total	29/30	(96,7)	21/30	(70,0)
			27/30	(90,0) ^b

^a N = n° de amostras positivas sobre o total de amostras analisadas.

^b N = n° de amostras positivas utilizando-se a técnica do **NMP**.

A ocorrência (90%) de *Listeria* sp em peitos verificada neste trabalho, mostrou-se próxima àquela encontrada aqui no Brasil por LAGE (1993), 96,7% e superior à de NUNES (1994), 70,0%. Quanto a *L. monocytogenes* o valor de 90% foi bem superior aos obtidos por LAGE (1993) e NUNES (1994) que encontraram valores de 6,6 e 50,0% respectivamente, dados estes reportados na **Tabela 2**.

Na literatura, os relatos da ocorrência de *L. monocytogenes* em cortes de frango (**Tabela 2**) são bem variáveis. Em filés de frango, RYU et alii (1992) encontraram-na em 75,0% das amostras e LAWRENCE & GILMOR (1994) em 83,3%.

Segundo GENIGEORGIS et alii (1989) e GENIGEORGIS et alii (1990), a ocorrência maior de *L. monocytogenes* em cortes de aves do que em carcaças, ocorre pela contaminação cruzada no processamento e/ou devido a posterior manipulação dos cortes. As mãos e as luvas de manipuladores de abatedouros de frango apresentaram *L. monocytogenes*, sendo verificada a presença em 36,4% dos manipuladores da seção de cortes de carcaças e 45,5% em mãos e 59% em luvas de manipuladores da área de embalagem dos cortes (GENIGEORGIS et alii 1989).

Nas carcaças de frango analisadas nesta pesquisa, a presença do gênero *Listeria* foi evidenciada em 100,0% das amostras, fato este semelhante aos obtidos por LAGE (1993) e NUNES (1994).

A prevalência do gênero *Listeria* em frango resfriado é bastante variada nos diversos países (**Tabela 2**). Na Dinamarca é de 94,0% (SKOVGAARD & MORGEN, 1988), na Inglaterra, 26,0% (PINI & GILBERT, 1988) e 50,0% (HUDSON & MEAD, 1989), nos Estados Unidos, 67,5% (BAILEY & FLETCHER, 1987), 38,0% (BAILEY et alii, 1989) e 73% (RYSER et alii, 1996), na Itália, 82,6% (IANIERE et alii, 1990), no Japão, 50,0% (RYU et alii, 1992), na Irlanda do Norte, 33,3% (LAWRENCE & GILMOR, 1994), e na União dos Emirados Árabes, 33,3% (GOHIL et alii, 1995a).

A ocorrência (60,0%) de *L. monocytogenes* em carcaças de frango verificada neste trabalho foi bem superior aos 3,3 e 15,0% obtidos por LAGE (1993) e NUNES (1994), respectivamente. Em outros países, os dados também variam, como os 3,3% de GOHIL et alii (1995a) e os 66,0% de PINI & GILBERT (1988).

A frequência de *L. monocytogenes* em carnes de frango no Brasil, observada por LAGE (1993) e NUNES (1994) em relação à deste trabalho é bem divergente, muito provavelmente, devido à metodologia empregada.

O baixo nível de contaminação encontrado por LAGE (1993), deve-se provavelmente ao tempo de incubação, de apenas 24 h, do caldo de enriquecimento para *Listeria* (LEB) e caldo Fraser (FB) à 30°C. Além disso, o isolamento foi realizado em LPM e Ágar Oxford somente a partir do FB. Outro fator que talvez tenha contribuído para o baixo nível de detecção, seja o pequeno número de

colônias isoladas (4 por amostra).

NUNES (1994), utilizando os mesmos meios de enriquecimento que LAGE (1993), mas incubando-os a 30°C por um tempo maior (48 h), observou uma frequência maior. O primeiro pesquisador, para o isolamento, usou o ágar LPM (o mesmo utilizado neste trabalho) e o ágar base seletivo para *Listeria* de CURTIS et alii (1989) suplementado com cicloheximide, acriflavina e ácido nalidíxico (LSAB-CAN) provenientes do FB.

Neste trabalho, a utilização de um segundo meio de enriquecimento mais seletivo, o MFB, além do isolamento em LPM e MOX a partir do LEB e MFB, deve ter colaborado no aumento da frequência.

Em 30,0% (6/20) das carcaças (amostras C1, C3 e C7 da **Tabela 15** e C11, C18 e C20 da **Tabela 16**) não foi possível o isolamento de *L. monocytogenes* utilizando-se o método de detecção tradicional, porém isto ocorreu ao se utilizar a técnica do NMP. Isto provavelmente ocorreu em virtude do emprego de uma menor concentração do inóculo nos tubos do NMP. Segundo BALIMANDAWA et alii (1994) a concentração do inóculo tem uma influência marcante na detecção de *Listeria* spp em amostras de carne; eles observaram que a taxa de isolamento foi duas vezes maior ao utilizar uma concentração menor (diluição 1/100). O efeito negativo na taxa de isolamento pelo aumento da concentração do inóculo, se daria devido a neutralização da atividade de alguns compostos seletivos do meio pela maior quantidade de matéria orgânica. Desta forma, considerando o isolamento de *L. monocytogenes* durante a quantificação, o patógeno foi encontrado em 90,0% das carcaças; índice este, semelhante aos de HAYES et alii (1991) e HAYES et alii (1992) que isolaram este microrganismo em 90% e 91% das amostras de aves coletadas de refrigeradores de pacientes com listeriose.

A variabilidade dos resultados de prevalência observada neste trabalho e nos demais citados acima, provavelmente se deve às diferentes técnicas empregadas e aos diferentes locais (abatedouros) de origem das amostras.

Estudo realizado por OJENIYI et alii (1996) em 7 abatedouros de frango evidencia uma grande diversidade nos resultados obtidos a partir das amostras

coletadas nos vários pontos da linha de processamento, desde a matéria prima até o produto acabado. A ocorrência de *L. monocytogenes* variou entre 0,3 a 18,7% nas 385 amostras examinadas de cada abatedouro.

A presença de *L. monocytogenes* no ceco de matrizes e de frangos de corte e nas gaiolas de transporte verificada por OJENIYI et alii (1996) sugere que as aves são veículos de entrada do patógeno no abatedouro e a sua confirmação na linha de processamento (SKOVGAARD & MORGEN, 1988; HUDSON & MEAD, 1989; GENIGEORGIS et alii, 1989; VARABIOF, 1990; DYKES, et alii, 1990; LAWRENCE & GILMOUR, 1994; LONCAREVIC et alii, 1994; OJENIYI et alii, 1996) demonstra a disseminação pela indústria. Para DYKES et alii (1994), a contaminação do produto final se deve ao material fecal e ao conteúdo intestinal das aves ou a presença de cepas epidêmicas dentro do abatedouro.

As diferenças existentes entre as indústrias processadoras de grande e pequeno porte, no que diz respeito ao tipo de equipamento e processamento, são fatores que levam a diferentes resultados de ocorrência de *L. monocytogenes* nos diversos pontos da linha de abate e conseqüentemente no produto acabado.

A presença de cepas do mesmo genótipo em ambientes de processamento de aves, observado por LAWRENCE & GILMOUR (1995), sustenta a hipótese de que certos clones podem se adaptar a certos nichos e a sua permanência pode aumentar pela capacidade de adesão e formação de biofilmes na superfície dando-lhe proteção adicional contra agentes biocidas (sanitizantes), fato este que sustenta a constatação de OJENIYI et alii (1996).

A alta frequência de *L. monocytogenes* constatada neste trabalho e o fato de ser uma bactéria amplamente distribuída no ambiente, são fatores que podem ser considerados no estabelecimento de limites máximos de tolerância em alimentos.

A higienização eficiente de abatedouros de aves, impedindo que certos clones de *L. monocytogenes* se instalem, é recomendável para reduzir os níveis de contaminação nos produtos avícolas e assim minimizar o risco de doenças. Neste contexto, a aplicação de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e a implantação do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, recomendado pela

Portaria 1.428/93 do Ministério da Saúde (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 1993), devem contribuir para melhorar a qualidade dos alimentos.

A constatação da elevada ocorrência de *L. monocytogenes* em carnes de aves revela a importância das BPF, atentando-se para que as condições de cozimento (tempo x Temperatura) sejam efetivas na eliminação do patógeno. O Código Regulamentar Federal dos EUA (citado por HARRISON & CARPENTER, 1989), preconiza que a temperatura interna de 71,1°C deva ser atingida durante o cozimento destes produtos. Porém, HARRISON & CARPENTER, (1989) e CARPENTER & HARRISON (1989) mostraram que o cozimento a uma temperatura interna de 82,2°C em peitos de frango, altamente contaminados com *L. monocytogenes* (10^6), não elimina completamente o patógeno e ocorre o crescimento se o produto for armazenado a 10°C, mas não a 4°C.

A manipulação cuidadosa do alimento após o seu cozimento é necessária para evitar a sua contaminação, pois este patógeno pode crescer a temperaturas de refrigeração (7°C) em alimentos como molho de frango (HUANG et alii, 1993) e peito de frango (BEUMER et alii, 1996), e a 4,4°C em pedaços de frango (GLASS & DOYLE, 1989). WALKER et alii, (1990) observaram o crescimento em meio de cultura de caldo de frango até a -0,4°C.

5.1.2.1. Espécies identificadas

Nesta pesquisa (ocorrência e quantificação pelo NMP) foram identificadas no total 927 cepas de *Listeria* spp., sendo aproximadamente 670 através da utilização do kit API-Listeria, conforme exemplos e 257 através dos testes bioquímicos tradicionais. As espécies identificadas foram: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. seeligeri*, conforme apresentamos na **Figura 4**.

Nas cepas isoladas de *L. monocytogenes*, foram observadas em ágar sangue de cavalo, reações de β -hemólise de intensidades diferentes; fato este observado por FUJISAWA & MORI (1994), que avaliaram diversos meios de ágar sangue de cavalo e carneiro e constataram o melhor desempenho do ágar sangue Columbia com 5 % de sangue de cavalo (o mesmo utilizado nesta pesquisa).

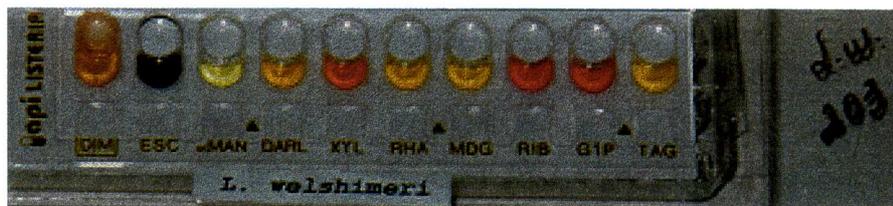
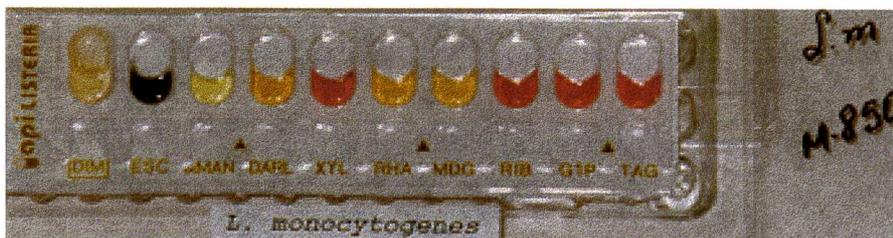
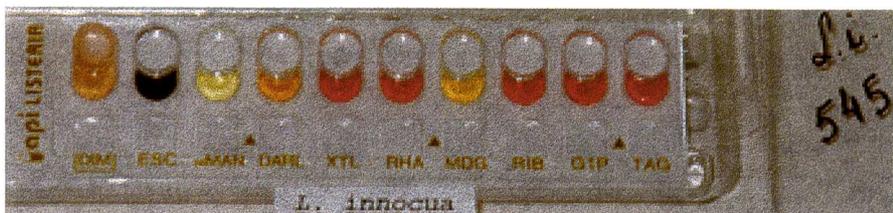


Figura 4. Identificação de espécies de *Listeria* pelo sistema API.

5.1.2.2. Avaliação da Eficiência dos Meios de Enriquecimento e Isolamento

A **Tabela 7** mostra a frequência de amostras positivas para o gênero *Listeria* e *L. monocytogenes* utilizando-se os meios de enriquecimento LEB incubados por 48 horas (LEB), LEB por 24 h seguido do MFB por 24-48 h (LEB-MFB), após a semeadura nos meios LPM e MOX.

Tabela 7. Frequência de amostras positivas para o gênero *Listeria* e *L. monocytogenes* após enriquecimento em LEB, LEB-MFB e em LEB combinado com LEB-MFB e plaqueamento em LPM e MOX.

Amostras	LEB		LEB-MFB		LEB e LEB-MFB	
	<i>List.</i> ^a	<i>L.m.</i> ^b	<i>List.</i>	<i>L. m.</i>	<i>List.</i>	<i>L. m.</i>
Peito	8/10 ^c	8/10	9/10	7/10	9/10	9/10
	(80,0) ^d	(80,0)	(90,0)	(70,0)	(90,0)	(90,0)
Carcaça	20/20	9/20	20/20	7/20	20/20	12/20
	(100,0)	(45,0)	(100,0)	(35,0)	(100,0)	(60,0)
Total	28/30	17/30	29/30	14/30	29/30	21/30
	(93,3)	(56,7)	(96,7)	(46,7)	(96,7)	(70,0)

LEB = Caldo de enriquecimento para *Listeria* (McCLAIN & LEE, 1989).

MFB = Caldo Fraser Modificado (McCLAIN & LEE, 1989).

^a *List.* = gênero *Listeria*.

^b *L.m.* = *L. monocytogenes*.

^c n° de amostras positivas sobre o total de amostras analisadas.

^d porcentagem.

5.1.2.2.1. Meios de Enriquecimento

Para o gênero *Listeria*, quando se considera o total de 30 amostras, verificou-se um índice um pouco maior (96,7%) ao se utilizar os meios LEB seguido do MFB (LEB-MFB), em relação ao obtido com o caldo LEB (93,3%) (**Tabela 7**).

Comparando-se os meios LEB e LEB-MFB na detecção de *L. monocytogenes* os resultados indicaram um melhor desempenho (56,7%) com o caldo LEB. No

entanto, a diferença só foi considerada estatisticamente significativa para as amostras de carcaça ($Z=2,08 > 1,96$) (**Tabela 7**).

Um acréscimo considerável na taxa de detecção de *L. monocytogenes* ocorreu quando se fez a identificação a partir do enriquecimento primário LEB e enriquecimento secundário MFB (LEB-MFB); o nível de amostras positivas para *L. monocytogenes* aumentou de 56,7% e 46,7% para 70% (**Tabela 7**). Contudo, os resultados foram estatisticamente significantes somente em frango inteiro ($Z=2,08 > 1,96$). Isto demonstra que o isolamento após os enriquecimentos primário e secundário foi importante para aumentar a eficiência da detecção.

HAYES et alii (1992) após analisarem diversos alimentos com o método do USDA, FDA e NGFIS, sugeriram ao menos 2 métodos de enriquecimento combinados para recuperação de *L. monocytogenes* a partir de alimentos contaminados e com uma taxa de sucesso próximo a 90%.

5.1.2.2.2. Meios de Isolamento

Dentre os meios seletivos, o LPM foi o que apresentou melhor resultado no isolamento de *L. monocytogenes*, como se pode observar nas **Tabelas 8 e 9**.

O uso do LEB e LPM concomitantemente proporcionou resultado um pouco melhor (51%) para o isolamento de *L. monocytogenes* (**Tabela 8**) quando comparado com outras combinações (48,1%, 37,0% e 33,3%). No entanto, esta diferença foi estatisticamente significativa somente para amostras de carcaça quando comparada com LEB-MFB e LPM ou MOX ($Z=2,28 > 1,96$).

Em duas amostras de carcaça (C9 e C10) provenientes do LEB houve o crescimento de contaminantes e não de *Listeria* sp. Por isso, na **Tabela 8** a frequência de gênero *Listeria* foi menor quando comparada aos isolamentos obtidos com LPM a partir do MFB (LEB-MFB). No entanto, isto não afetou os resultados gerais da ocorrência de amostras positivas para *L. monocytogenes* (8/20) que foi maior do que em MFB (5/20).

Tabela 8. Frequência de amostras positivas para gênero *Listeria* e *L. monocytogenes* em LPM e MOX a partir do enriquecimento em LEB e LEB-MFB.

Amostras	LEB/LPM		LEB/MOX		LEB-MFB/LPM		LEB-MFB/MOX	
	List. ^a	L.m. ^b	List.	L. m.	List.	L. m.	List.	L. m.
Peito	7/7 ^c	6/7	7/7	5/7	7/7	5/7	7/7	4/7
	(100,0) ^d	(85,7)	(100,0)	(71,4)	(100,0)	(71,4)	(100,0)	(57,1)
Carcaça	18/20	8/20	20/20	8/20	20/20	5/20	20/20	5/20
	(90,0)	(40,0)	(100,0)	(40,0)	(100,0)	(25,0)	(100,0)	(25,0)
Total	25/27	14/27	27/27	13/27	27/27	10/27	27/27	9/27
	(92,6)	(51,0)	(100,0)	(48,1)	(100,0)	(37,0)	(100,0)	(33,3)

LEB = Caldo de enriquecimento para *Listeria* (McCLAIN & LEE, 1989).

MFB = Caldo Fraser modificado (McCLAIN & LEE, 1989).

LPM = Ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LEE & McCLAIN, 1986).

MOX = Ágar Oxford modificado (McCLAIN & LEE, 1989).

^a List. = gênero *Listeria*.

^b L.m. = *L. monocytogenes*.

^c n° de amostras positivas sobre o total de amostras analisadas.

^d porcentagem.

O método do USDA não prevê o plaqueamento a partir do LEB, a incubação adicional do meio LEB por 24 h (completando 48 h de incubação a 30°C) e nem o uso do ágar LPM. Estas modificações levaram a obtenção de resultados com valores superiores. Avaliações de versões modificadas dos métodos do USDA e da FDA realizadas por WARBURTON et alii (1991a), WARBURTON et alii (1991b) e WARBURTON et alii (1992) confirmam que o emprego de 2 meios de enriquecimento e de mais de um ágar, para o isolamento, influenciam a taxa de detecção.

Na **Tabela 9**, apresenta-se a frequência de amostras positivas para o gênero *Listeria* e *L. monocytogenes* em LPM e MOX, considerando-se os isolamentos a partir do LEB e LEB-MFB. A recuperação de *L. monocytogenes* foi maior quando utilizado o LPM (63,0%) do que o MOX (51,8%), porém estatisticamente significativa somente para amostras de carcaça ($Z=2,00 > 1,96$). Esta avaliação é contrária ao

de BLYSICK-MCKENNAL & SCHAFFNER (1994), que não observaram diferença estatística entre os ágaros LPM e MOX e consideraram-nos igualmente efetivos no isolamento de *L. monocytogenes*. Contudo, HAYES et alii (1992) apesar de não encontrarem diferença significativa entre estes meios, preferiram o LPM pelo maior poder inibitório dos organismos competidores. WARBURTON et alii (1991b) também demonstraram que o LPM foi um pouco melhor que o MOX.

Tabela 9. Frequência de amostras positivas para o gênero *Listeria* e *L. monocytogenes* em ágaros LPM e MOX a partir do enriquecimento em LEB e LEB-MFB.

Amostras	LEB e LEB-MFB ⇒ LPM		LEB e LEB-MFB ⇒ MOX	
	<i>List.</i> ^a	<i>L.m.</i> ^b	<i>List.</i>	<i>L.m.</i>
Peito	7/7 ^c (100,0) ^d	6/7 (85,7)	7/7 (100,0)	5/7 (71,4)
Carcaça	20/20 (100,0)	11/20 (55,0)	20/20 (100,0)	9/20 (45,0)
Total	27/27 (100,0)	17/27 (63,0)	27/27 (100,0)	14/27 (51,8)

LEB = Caldo de enriquecimento para *Listeria* (McCLAIN & LEE, 1989).

MFB = Caldo Fraser modificado (McCLAIN & LEE, 1989).

LPM = Ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LEE & McCLAIN, 1986).

MOX = Ágar Oxford modificado (McCLAIN & LEE, 1989).

^a *List.* = gênero *Listeria*.

^b *L.m.* = *L. monocytogenes*.

^c n° de amostras positivas sobre o total de amostras analisadas.

^d porcentagem.

5.1.3. PROPOSTA DE METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE *Listeria*

5.1.3.1. Avaliação do crescimento de *L. monocytogenes* em diferentes meios de enriquecimento

Neste etapa, conforme gráficos da **Figura 5**, pode-se observar o crescimento de *L. monocytogenes* a temperaturas de 30 e 35°C nos meios de enriquecimento LEBc, FB, MdFB e MFB.

Durante a avaliação do crescimento de *L. monocytogenes* nestes meios, todos com esculina e citrato férrico, pode-se observar o aparecimento do escurecimento dos meios, devido a hidrólise da esculina, quando o número de células atingiu 10⁷/ml. Este escurecimento foi visualizado nos meios LEBc, FB, MdFB incubados a 35°C após 24 horas e no meio MFB após 30 horas.

Quando incubados a 30°C, os meios LEBc e FB escureceram após 24 horas, no entanto, o MdFB e o MFB necessitaram um tempo maior, respectivamente 30 e 36 horas.

Com estes resultados e visando utilizar um meio com resposta semelhante ao LEBc a 30°C, porém com mais agentes inibidores da microbiota acompanhante de carnes, optou-se pelo uso do meio MdFB a 35°C para a quantificação de *Listeria sp* e *L. monocytogenes* em peitos e carcaças de frango.

5.1.3.2. Quantificação de *Listeria spp* pela técnica do NMP

5.1.3.2.1. Amostras inoculadas com *L. monocytogenes* Scott A

Em primeiro lugar, a eficiência de três procedimentos de contagem pelo NMP foi avaliada quanto a capacidade de promover a recuperação de *L. monocytogenes* Scott A inoculada em água peptonada e em água de enxágüe de carcaça resfriada de frango. Os resultados da quantificação de *L. monocytogenes* utilizando estes procedimentos são apresentados nas **Tabela 10 e 11**.

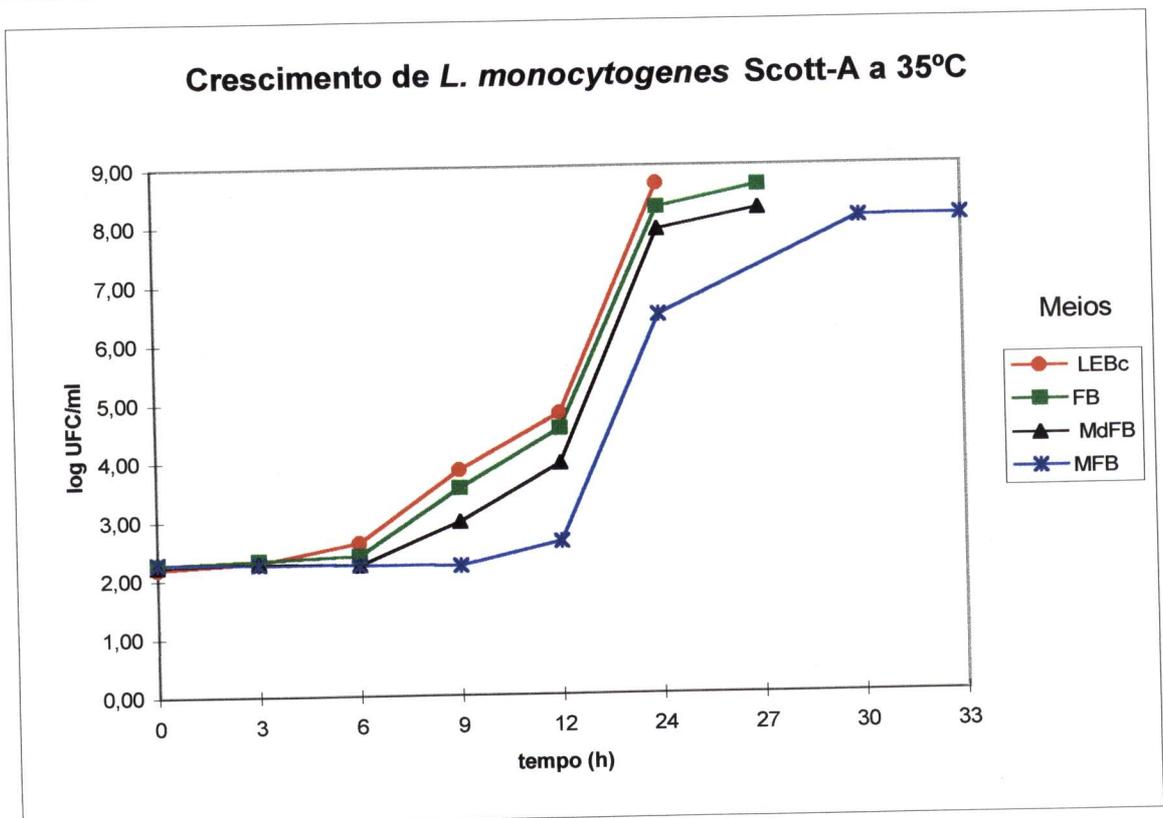
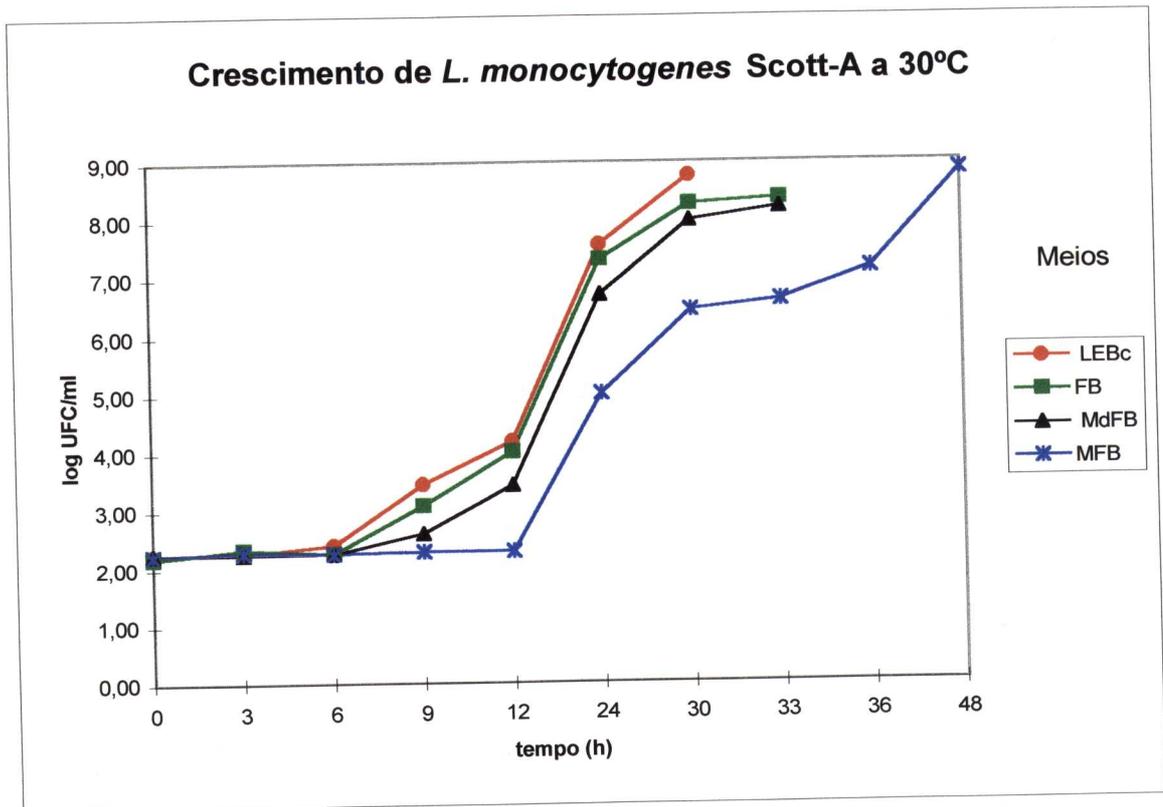


Figura 5. Curvas de crescimento de *L. monocytogenes* Scott-A em diversos meios (LEBc=Caldo de enriquecimento para *Listeria* (McCLAIN & LEE, 1989) com citrato férrico amoniacal; FB=Caldo Fraser (FRASER & SPERBER, 1988); MFB=Caldo Fraser modificado segundo McCLAIN & LEE, 1989; MdFB=Caldo Fraser modificado neste trabalho).

A estimativa da população de *L. monocytogenes* em solução peptonada apresentou resultados insatisfatórios, conforme mostra a **Tabela 10**, onde se observa a grande variação entre os valores obtidos empregando-se as três técnicas. Os valores do NMP nos ensaios A, B e C obtidos pelo emprego do MdFB e no ensaio E quando utilizado o LEB-MFB ficaram fora do limite de confiança de 95% previsto pela tabela de NMP.

Tabela 10. Estimativa da população de *L. monocytogenes* Scott A em suspensões preparadas com solução peptonada, utilizando 3 diferentes meios de enriquecimento e técnica do NMP.

Ensaio	Inóculo (UFC/ml) ^a	Meios		
		LEB (NMP/ml) ^b	MdFB (NMP/ml)	LEB-MFB (NMP/ml)
A	104	43	9,3	43
B	63	75	4,3	43
C	112	23	4,3	23
D	65	43	150	43
E	176	93	240	21

LEB = Caldo de enriquecimento para *Listeria* (McCLAIN & LEE, 1989).

MFB = Caldo Fraser modificado (McCLAIN & LEE, 1989).

MdFB = Caldo Fraser modificado neste trabalho.

^a UFC/ml = unidade formadora de colônia por mililitro.

^b NMP/ml = número mais provável por mililitro.

O emprego da água de enxágüe de carcaça, como mostra a **Tabela 11**, proporcionou resultados mais coerentes entre os 3 métodos, mesmo havendo uma diferença com relação ao inóculo inicial, aceitável pelo método do NMP. A utilização da água de enxágüe de carcaça foi proposta com o intuito de testar os métodos nas condições mais próximas da realidade das amostras de frango que seriam analisadas posteriormente. A diferença nos resultados, pelo uso da solução peptonada e da água de enxágüe, se deve provavelmente a ação dos agentes inibidores sobre a microbiota existente no segundo. No caso da água peptonada, a ausência de contaminantes disponibilizaria os inibidores do meio a atuarem

negativamente sobre o crescimento de *L. monocytogenes*, o que, em alguns casos, provocou uma grande variação nas contagens.

Tabela 11. Estimativa da população de *L. monocytogenes* Scott A em suspensões preparadas com água de enxágüe de carcaça, utilizando 3 diferentes meios de enriquecimento e técnica do NMP.

Ensaio	Inóculo (UFC/ml) ^a	Meios		
		LEB (NMP/ml) ^b	MdFB (NMP/ml)	LEB-MFB (NMP/ml)
A	122	150	150	150
B	159	240	240	240
C	90	150	150	150

LEB = Caldo de enriquecimento para *Listeria* (McCLAIN & LEE, 1989).

MFB = Caldo Fraser modificado (McCLAIN & LEE, 1989).

MdFB = Caldo Fraser modificado neste trabalho.

^a UFC/ml = unidade formadora de colônia por mililitro.

^b NMP/ml = número mais provável por mililitro.

5.1.3.2.2. Amostras de peito e carcaça de frango

O limite mínimo de detecção de gênero *Listeria* e *L. monocytogenes*, utilizando-se os métodos do NMP foi de 0,3/g para amostras de peito e 9/carcaça para amostras de frango inteiro.

O NMP de *Listeria* sp e *L. monocytogenes*, conforme mostram as **Tabelas 12** e **13**, em peitos de frango variaram entre < 0,3 a 93/g, sendo que 80% das amostras apresentaram NMP < 25/g, valor este não detectável pelo método de contagem direta em placas.

Em frango inteiro, o NMP de *Listeria* sp (**Tabelas 14** e **15**) e *L. monocytogenes* (**Tabelas 15** e **16**) variou de <9 a $2,8 \times 10^3$ /carcaça ou < 0,005 a 1,943/g.

A quantificação de *Listeria* spp em carnes de frango tem sido pouco estudada. CARACAPPA et alii (1994), utilizando a técnica de contagem em placas com ágar Oxford, quantificaram *L. monocytogenes* em 50 amostras de frango previamente como positivas para este patógeno. Estes pesquisadores avaliaram

pele e músculo isoladamente e verificaram que 70% das amostras de pele e 86% de músculo apresentaram contagem $< 10^2$ UFC/g, sendo observada uma contaminação máxima em pele da ordem de 10^4 e em músculo de 10^3 /g. Este fato, revela um grande número de amostras com baixo nível de contaminação por *L. monocytogenes*; portanto, de difícil quantificação pelo método de contagem direta em placas e apropriadas para o uso do NMP.

COMI et alii (1990) obtiveram 94 e 95% de amostras com nível NMP < 160 /g, respectivamente para amostras de queijo e produtos cárneos.

VALLAVANTI et alii (1994) analisaram 423 amostras de carne de aves, e encontraram valores de NMP de *L. monocytogenes* < 11 /g em 15,0% e >110 /g em 4,3% das amostras.

Em nossa pesquisa, de 70 a 80% (dependendo do meio utilizado) das amostras de peito de frango apresentaram NMP de *L. monocytogenes* < 11 /g e nenhuma amostra esteve acima de 100/g (**Tabela 13**). Em carcaças, 50 % apresentaram NMP <100 /carcaça e em apenas 15% (amostras C2, C4 e C19) a contagem foi da ordem de 10^3 /carcaça (**Tabelas 15 e 16**).

Além destes trabalhos, HAYES et alii (1991) e HAYES et alii (1992) quantificaram *Listeria* pelo método do NMP em diversos alimentos, incluindo frango, coletados de refrigeradores de pacientes com listeriose. O NMP nas amostras de frango variou de $<0,3$ a >220 /g.

BUYSER et alii (1990) compararam a técnica de contagem de *Listeria* sp pelo NMP com a contagem direta em ágar Oxford em produtos cárneos e verificaram que mais de 90% das amostras (102) apresentavam contaminação <100 listérias/g; cujo resultado foi também observado no presente estudo com amostras de peitos.

As pesquisas até agora evidenciam a contaminação das carnes de frango em níveis relativamente baixos (<100 listérias/g), e podem conduzir a sugestão de aplicação de limites de tolerância neste tipo de alimento, assim como aquele que já existe na Itália (Decreto Ministerial número 291 de 07/12/93, citado por VALLAVANTI et alii, 1994) que tolera, para produtos sujeitos a cozimento, níveis

< 11 *L. monocytogenes*/g em uma unidade de amostra e <110 em 2 unidades de amostras. VALLAVANTI et alii (1994), no entanto, sugerem a mudança dos limites para uma unidade com NMP de 110/g e 2 com 1.100/g.

Para alimentos prontos para o consumo, a exigência de tolerância zero aplicada nos Estados Unidos (SHANK et alii 1996) nos parece viável uma vez que existem segmentos da população que são suscetíveis a adquirir a infecção. Em países como Canadá (FARBER & HARWING 1996) e Alemanha (VAN SCHOTHORST 1996) é aceitável um limite para algumas classes destes produtos.

A obtenção de alimentos crus livres de *L. monocytogenes* diante dos resultados e discussões apresentados, não é real.

A "International Commission of Microbiological Specifications for Foods" (ICMSF) estabeleceu uma forma de escolha do plano de amostragem para *L. monocytogenes*. Segundo este plano, para alimentos que sofrerão um tratamento listericida antes do consumo, como as carnes *in natura*, não é necessário o exame do produto (VAN SCHOTHORST 1996).

Diante dos resultados até aqui analisados e observações notadas deve-se salientar que as carnes de frango só serão consideradas potencialmente causadoras de infecção se não forem bem manipuladas durante o preparo.

5.1.3.3. Avaliação do desempenho dos métodos de NMP

Os resultados da contagem de *Listeria* em peitos de frango, utilizando-se a técnica do NMP, de três formas diferentes, são apresentados na **Tabela 12**.

Numa primeira análise, quando se compara os valores obtidos através da contagem presuntiva pela visualização da cor escura nos tubos (NMPp) em relação àqueles obtidos após confirmação com a identificação (NMPc) verifica-se poucos resultados conflitantes, quer para o meio MdFB quanto para a combinação LEB-MFB. Para o primeiro, em apenas uma das amostras (P6) o valor do NMPc (43) foi superior ao NMPp (24) sendo os demais resultados idênticos. Já para a combinação LEB-MFB, a diferença foi mais acentuada, observando-se apenas 4 amostras com

valores iguais e 6 com o NMPp maior que o NMPc.

Considerando-se a contagem confirmada NMPc, observou-se resultados idênticos, para amostras de peitos, utilizando-se meio LEB com uma etapa de enriquecimento ou o meio combinado LEB-MFB.

Tabela 12 Número Mais Provável (**NMP**) de gênero *Listeria* em amostras de peito resfriado de frango.

Amostras	NMP (<i>Listeria</i> sp/g)				
	Meios				
	MdFB		LEB	LEB-MFB	
	NMPp	NMPc	NMPc	NMPp	NMPc
P1	93	93	93	93	93
P2	<0,3	<0,3	<0,3	4,3	<0,3
P3	<0,3	<0,3	<0,3	2,3	<0,3
P4	9,3	9,3	4,3	4,3	4,3
P5	2,3	2,3	4,3	4,3	4,3
P6	24	43	93	93	93
P7	<0,3	<0,3	<0,3	0,9	<0,3
P8	0,4	0,4	<0,3	2,3	<0,3
P9	4,3	4,3	1,5	4,3	1,5
P10	24	24	7,5	43	7,5

LEB = Caldo de enriquecimento para *Listeria* (McCLAIN & LEE, 1989).

MFB = Caldo Fraser modificado (McCLAIN & LEE, 1989).

MdFB = Caldo Fraser modificado neste trabalho.

NMPp = Resultado presuntivo pelo escurecimento do meio - hidrólise da esculina pelas *Listeria* spp.

NMPc = Resultado confirmado através da identificação das *Listeria* spp.

A quantidade de *L. monocytogenes* determinada pela técnica do NMP com o meio MdFB, nas amostras de peito de frango, segundo a **Tabela 13**, foi maior em 5 delas quando comparada com o LEB e 6 quando comparada com o LEB-MFB. O meio LEB quando comparado com a combinação LEB-MFB apresentou valores

maiores em 3 amostras. Para as 3 amostras onde a contagem pelo NMP deram valores abaixo do limite inferior de contagem <0,3, em apenas 1 (uma) amostra (P3) confirmou-se a ausência de *L. monocytogenes* através do teste de detecção.

Tabela 13. Número Mais Provável (NMP) de *L. monocytogenes* em amostras de peito resfriado de frango.

Amostras	NMPc (<i>L.monocytogenes</i> /g)			Método de Detecção ^a <i>List.</i> ^b / <i>L.m.</i> ^c
	MdFB	LEB	LEB-MFB	
P1	93	43	43	+/+
P2	<0,3	<0,3	<0,3	+/+
P3	<0,3	<0,3	<0,3	-/-
P4	0,9	0,7	0,4	+/+
P5	0,9	0,9	0,4	+/+
P6	43	93	93	+/+
P7	<0,3	<0,3	<0,3	+/+
P8	0,4	<0,3	<0,3	+/+
P9	2,3	1,5	0,7	+/+
P10	24	7,5	7,5	+/+

LEB = Caldo de enriquecimento para *Listeria* (McCLAIN & LEE, 1989).

MFB = Caldo Fraser modificado (McCLAIN & LEE, 1989).

MdFB = Caldo Fraser modificado neste trabalho.

NMPc = Resultado confirmado através da identificação.

^a + = presença , - = ausência.

^b *List.* = gênero *Listeria* .

^c *L.m.* = *L. monocytogenes*.

Em carcaças de frango, conforme a **Tabela 14**, os valores NMPp e NMPc apresentaram-se, na maioria das amostras, bem diferentes tanto com os meios LEB-MFB quanto MdFB. Para os resultados de NMPc com MdFB, verificou-se valores maiores de contagem de *Listeria* sp em 3 amostras quando comparados com aqueles obtidos com os meios LEB e LEB-MFB, cujos resultados foram similares.

Para *L. monocytogenes*, 5 amostras apresentaram contagens de NMPc maiores em LEB e LEB-MFB, contra 4 do MdFB, e apenas uma amostra foi maior em LEB-MFB do que em LEB, como mostra a **Tabela 15**.

A presença de citrato férrico amoniacal no meio MdFB e MFB permite a visualização da hidrólise da esculina pelas *Listeria* spp, através do escurecimento, proporcionando resultados presuntivos das contagens. Observando-se a **Tabela 14** nota-se que os resultados presuntivos da quantificação de *Listeria* sp em carcaças de frango foram maiores em 70% (7/10) das amostras quando empregou-se o meio MdFB e em 80% (8/10) pelo uso dos meios LEB-MFB. Este comportamento pode estar relacionado com a microbiota diferenciada das carcaças na qual a técnica de enxágüe utilizada na amostragem poderia remover outras bactérias com a capacidade de hidrolisar a esculina.

Para amostras de peito, o uso do MdFB subestimou a contagem presuntiva (NMPp) apenas na amostra P6 (10%), isto ocorreu porque, em 1 tubo, apesar de não escurecer (presumivelmente negativo), houve o crescimento e confirmação de *Listeria* sp. Na avaliação do crescimento de *L. monocytogenes* em diferentes meios de enriquecimento (item 5.1.3.1.), foi constatado que o escurecimento dos meios ocorriam quando o número de células atingia 10^7 UFC/mL. Neste tubo da amostra P6, o número de células não deve ter atingido o nível para visualização do escurecimento. Resultados falsos negativos em caldo Fraser já foram observados por KORNACKI et alii (1993).

Uma superestimação do resultado do NMPp ocorreu com LEB-MFB em 6 amostras (60 %) de peitos (**Tabela 12**). Neste tipo de amostra, provavelmente, a acriflavina do MdFB tenha inibido inicialmente a maior parte da microbiota produzindo poucos resultados falsos. No caso do LEB-MFB, provavelmente o LEB inicialmente, permitiu um crescimento maior da microbiota, devido ao menor poder inibitório, levando para o MFB possíveis contaminantes que hidrolisaram a esculina, ocasionando um número maior de falsos positivos.

Observando-se os resultados das 20 amostras (10 peitos e 10 carcaças), a quantificação pela técnica do NMP utilizando o meio MdFB apresentou-se um pouco melhor na quantificação de *L. monocytogenes*, onde 9 amostras tiveram contagens

maiores contra 6 do LEB e 6 do LEB-MFB.

GOHIL et alii (1995b) obtiveram resultados similares ao empregar a técnica do NMP de 3 tubos de duas formas distintas: a primeira com apenas uma etapa de enriquecimento em caldo LEB e a segunda com duas etapas de enriquecimento em meio da Universidade de Vermont seguido do caldo Fraser (UVM-FB) para quantificar *L. monocytogenes* em iogurte concentrado ("labneh"), artificialmente contaminados. Os pesquisadores, ressaltaram ainda a vantagem do emprego do UVM-FB que, pelo aparecimento da cor preta no FB, é possível obter um resultado presuntivo e sugeriram o emprego desta técnica na rotina de controle de qualidade de alimentos processados.

TRAN & HITCHINS (1996) adaptaram o método da FDA e avaliaram a performance do método do NMP em leite e produtos cárneos e constataram que o método parece promissor na quantificação de baixas concentrações (1 a 100 UFC/g) nestes produtos.

A avaliação realizada por BLYSICK-MCKENNAL & SCHAFFNER (1994) durante a quantificação pelo NMP de baixos níveis de *L. monocytogenes* em leite de com baixo teor de gordura, artificialmente contaminado, mostraram que os meios LPM e MOX foram igualmente efetivos no isolamento de *L. monocytogenes*. Este resultado difere do presente trabalho, cujo melhor desempenho foi observado com o LPM onde foi verificado que dos 253 tubos positivos confirmados para o gênero *Listeria* durante as quantificações, 69,56% (176/253) apresentaram positivos para *L. monocytogenes* em LPM e 61,66% (156/253) em MOX.

Considerando as avaliações acima, a técnica do NMP de 3 tubos utilizando o meio MdFB proposto, apresentou um bom desempenho e comparável com a técnica utilizando os meios de cultura LEB e LEB-MFB, oficialmente aprovados para a detecção de *L. monocytogenes*. A técnica utilizando o meio MdFB, além de apresentar a vantagem de oferecer resultados presuntivos pela visualização do escurecimento do meio pelas prováveis *Listeria* spp tem como característica a utilização de apenas uma etapa de enriquecimento, que representa uma menor manipulação.

Tabela 14. Número Mais Provável (NMP) de gênero *Listeria* em amostras de carcaça resfriada de frango.

Amostras	Meios									
	MdFB			LEB			LEB-MFB			
	NMPP <i>List./carc.</i> ^a	NMPC <i>List./carc</i>	NMPC <i>List./g</i> ^b	NMPC <i>List./carc</i>	NMPC <i>List./g</i>	NMPP <i>List./carc.</i>	NMPC <i>List./carc.</i>	NMPC <i>List./g</i>	NMPP <i>List./carc.</i>	NMPC <i>List./carc.</i>
C1	1,3x10 ³	2,3x10 ²	0,160	2,8x10 ²	0,195	1,3x10 ³	2,8x10 ²	0,195	1,3x10 ³	2,8x10 ²
C2	2,8x10 ³	2,8x10 ³	1,588	1,3x10 ³	0,737	1,3x10 ³	1,3x10 ³	0,737	1,3x10 ³	1,3x10 ³
C3	1,3x10 ³	2,8x10 ²	0,172	7,2x10 ²	0,443	4,5x10 ³	7,2x10 ²	0,443	4,5x10 ³	7,2x10 ²
C4	1,3x10 ³	1,3x10 ³	0,902	2,8x10 ³	1,943	1,4x10 ⁴	2,8x10 ³	1,943	1,4x10 ⁴	2,8x10 ³
C5	2,3x10 ³	2,3x10 ³	nd ^c	2,8x10 ³	nd	1,4x10 ⁴	2,8x10 ³	nd	1,4x10 ⁴	2,8x10 ³
C6	7,2x10 ²	2,8x10 ²	0,184	1,3x10 ²	0,085	1,3x10 ³	1,3x10 ²	0,085	1,3x10 ³	1,3x10 ²
C7	1,3x10 ³	2,7x10 ¹	0,017	1,3x10 ²	0,081	7,2x10 ³	1,3x10 ²	0,081	7,2x10 ³	1,3x10 ²
C8	1,3x10 ²	< 9,0x10 ⁰	<0,005	9,0x10 ⁰	0,005	7,2x10 ²	9,0x10 ⁰	0,005	7,2x10 ²	9,0x10 ⁰
C9	7,2x10 ²	<9,0x10 ⁰	<0,006	<9,0x10 ⁰	<0,006	1,3x10 ³	<9,0x10 ⁰	<0,006	1,3x10 ³	<9,0x10 ⁰
C10	2,8x10 ²	1,3x10 ²	0,091	6,9x10 ¹	0,048	nd	6,9x10 ¹	0,048	nd	6,9x10 ¹

LEB = Caldo de enriquecimento para *Listeria* (McCLAIN & LEE, 1989).

MFB = Caldo Fraser modificado (McCLAIN & LEE, 1989).

MdFB = Caldo Fraser modificado neste trabalho.

NMPP = Resultado presumitivo pelo escurecimento do meio - hidrólise da esculina pelas *Listeria* spp.

NMPC = Resultado confirmado através da identificação das *Listeria* spp.

^a *List./carc.* = gênero *Listeria* por carcaça.

^b *List./g* = gênero *Listeria* por grama de carcaça.

^c nd = não determinado.

Tabela 15. Número Mais Provável (NMP) de *L. monocytogenes* em amostras de carcaça resfriada de frango.

Amostras	NMPc (<i>L. monocytogenes</i>)										Método de Detecção ^a
	Meios					Meios					
	MdFB		LEB		LEB-MFB		LEB		LEB-MFB		
<i>L.m./carc.</i> ^b	<i>L.m./g</i> ^c	<i>L.m./carc.</i>	<i>L.m./g</i>	<i>L.m./carc.</i>	<i>L.m./g</i>	<i>L.m./carc.</i>	<i>L.m./g</i>	<i>L.m./carc.</i>	<i>L.m./g</i>	<i>List./L.m.</i> ^d	
C1	2,1x10 ¹	0,015	9,0x10 ⁰	0,006	9,0x10 ⁰	0,006	9,0x10 ⁰	0,006	0,006	+/-	
C2	2,8x10 ³	1,588	4,5x10 ²	0,255	1,3x10 ³	0,737	1,3x10 ³	0,255	0,737	+/+	
C3	9,0x10 ⁰	0,005	6,3x10 ¹	0,039	3,3x10 ¹	0,020	3,3x10 ¹	0,039	0,020	+/-	
C4	1,3x10 ³	0,902	2,8x10 ³	1,943	2,8x10 ³	1,943	2,8x10 ³	1,943	1,943	+/+	
C5	2,1x10 ²	nd ^e	4,5x10 ²	nd	4,5x10 ²	nd	4,5x10 ²	nd	nd	+/+	
C6	6,3x10 ²	0,415	1,3x10 ²	0,085	1,3x10 ²	0,085	1,3x10 ²	0,085	0,085	+/+	
C7	1,2x10 ¹	0,007	4,5x10 ¹	0,028	4,5x10 ¹	0,028	4,5x10 ¹	0,028	0,028	+/-	
C8	< 9,0x10 ⁰	< 0,005	9,0x10 ⁰	0,005	9,0x10 ⁰	0,005	9,0x10 ⁰	0,005	0,005	+/+	
C9	< 9,0x10 ⁰	< 0,006	< 9,0x10 ⁰	0,006	< 9,0x10 ⁰	0,006	< 9,0x10 ⁰	0,006	0,006	+/+	
C10	1,3x10 ²	0,091	6,9x10 ¹	0,048	6,9x10 ¹	0,048	6,9x10 ¹	0,048	0,048	+/+	

LEB = Caldo de enriquecimento para *Listeria* (McCLAIN & LEE, 1989).

MFB = Caldo Fraser modificado (McCLAIN & LEE, 1989).

MdFB = Caldo Fraser modificado neste trabalho.

NMPc = Número Mais Provável confirmado.

^a + = presença, - = ausência.

^b *L.m./ carc.* = *L. monocytogenes* por carcaça.

^c *L.m./g* = *L. monocytogenes* por grama de carcaça.

^d *List./ L.m.* = *Listeria* sp / *L. monocytogenes*.

^e nd = não determinado.

Tabela 16. Número Mais Provável (NMP) pelo uso do caldo MdFB e detecção de *Listeria* sp e *L. monocytogenes* em carcaça resfriada de frango.

Amostras	Meio MdFB					Método de
	NMPp <i>List./carc.</i> ^b	NMPc <i>List./carc.</i>	NMPc <i>List./g</i> ^c	NMPc <i>L.m./carc.</i> ^d	NMPc <i>L.m./g</i> ^e	Detecção ^a <i>List./L.m.</i> ^f
C11	4,5x10 ²	4,5x10 ²	0,264	2,7x10 ¹	0,0159	+/-
C12	2,7x10 ¹	2,7x10 ¹	0,131	2,7x10 ¹	0,0131	+/+
C13	2,8x10 ²	6,9x10 ¹	0,035	2,7x10 ¹	0,014	+/+
C14	2,8x10 ²	1,3x10 ²	0,085	1,3x10 ²	0,085	+/+
C15	7,2x10 ²	7,2x10 ²	0,393	7,2x10 ²	0,393	+/+
C16	1,3x10 ²	1,3x10 ²	0,089	<9,0x10 ⁰	<0,006	+/-
C17	7,2x10 ²	1,3x10 ²	0,083	<9,0x10 ⁰	<0,006	+/-
C18	1,3x10 ²	1,3x10 ²	0,091	1,2x10 ¹	0,008	+/-
C19	1,3x10 ³	1,3x10 ³	0,692	1,3x10 ³	0,692	+/+
C20	6,9x10 ¹	6,9x10 ¹	0,042	1,2x10 ¹	0,008	+/-

LEB = Caldo de enriquecimento para *Listeria* (McCLAIN & LEE, 1989).

MFB = Caldo Fraser modificado (McCLAIN & LEE, 1989).

MdFB = Caldo Fraser modificado neste trabalho.

NMPp = Resultado presuntivo pelo escurecimento do meio - hidrólise da esculina pelas *Listeria* spp.

NMPc = Resultado confirmado através da identificação das *Listeria* spp.

^a + = presença , - =ausência.

^b *List./carc.* = gênero *Listeria* por carcaça.

^c *List./g* = gênero *Listeria* por grama de carcaça.

^d *L.m./ carc.* = *L. monocytogenes* por carcaça.

^e *L.m./g* = *L. monocytogenes* por grama de carcaça.

^f *List./ L.m.* = *Listeria* sp / *L. monocytogenes* .

5.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE AGENTES QUÍMICOS NA REDUÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR *L. monocytogenes*

O uso do fosfato trissódico foi aprovado para o processamento de aves nos Estados Unidos em 1992 e, no Brasil, o Ministério da Agricultura do Abastecimento e Reforma Agrária, em 1995 autorizou o uso do produto em estabelecimentos com inspeção federal.

As **Tabelas 17 e 18**, apresentam os resultados das contagens de *L. monocytogenes* aderidas a coxas de frango artificialmente contaminadas antes e após os tratamentos com diferentes agentes sanitizantes.

Na **Tabela 19**, estão expostos os resultados das reduções das contagens de *L. monocytogenes* após os tratamentos. Os tratamentos das coxas contaminadas com soluções de fosfato trissódico a 25°C durante um minuto, provocaram uma pequena redução, na ordem de 0,14 e 0,42 ciclos log para soluções de 8 e 12% respectivamente. No entanto, estas reduções não foram estatisticamente significativa, conforme mostra a **Tabela 20**.

Uma ligeira redução (0,3 ciclos log) de *L. monocytogenes* em carne bovina artificialmente contaminadas e imersa em soluções de TSP a 25°C por 1 minuto, foi obtida por DICKSON et alii (1994), redução semelhante a apresentada neste trabalho. Ainda segundo aqueles autores, o tempo de contato, a forma de aplicação (imersão ou pulverização/lavagem) e a temperatura do produto são fatores que influenciam a redução da contaminação.

HWANG & BEUCHAT (1995) observaram uma redução de *L. monocytogenes* na ordem de 1,3 ciclos log em pele de frango inoculado após tratamento com solução a 1% de TSP durante 30 minutos a 25°C. A redução de um ciclo log desta bactéria aderida a superfície de aço inoxidável e borracha somente ocorreu após exposição a solução de 8% durante 10 minutos à temperatura ambiente ou 20 minutos a 10°C (SOMERS et alii, 1994).

O fosfato trissódico, no entanto tem demonstrado resultados melhores contra bactérias Gram negativas. A redução da contaminação de *Salmonella typhimurium*

aderidas a pele de coxa de frango pelo uso de solução a 10% de fosfato trissódico a 10 e 50 °C por 15 segundos, na ordem de 2,2 e 1,7 log respectivamente, foi observada por KIM et alii (1994b). Uma redução de 2 ciclos log desta mesma bactéria foi obtido por LILLARD (1994) em pele de frango após imersão em TSP a 10% por 15 minutos a temperatura de 10 °C. KIM et alii (1994a) conseguiram uma redução de 1,6-1,8 log de *Salmonella* em amostras de frango tratadas com solução a 10% de TSP por 15 segundos. Uma significativa diminuição da presença de *Salmonella* também foi constatado em amostras tratadas com TSP.

Com *Campylobacter*, SLAVIK et alii (1994) verificaram uma redução de 1,2-1,5 log em carcaças de frango após imersão por 15 segundos em solução de TSP a 10%, a temperatura de 50 °C e 0,16 log quando tratadas a 10 °C. A temperatura ambiente, FEDERIGHI et alii (1995) obtiveram 1,3 log de redução.

O cloro é um agente tradicionalmente usado nos abatedouros tanto para a sanitização dos equipamentos e instalações, como na água utilizada durante o processamento, para lavagem das aves e em tanques de resfriamento das carcaças. As concentrações de cloro empregadas no resfriamento, segundo a literatura (PRESOT & CHAVES, 1995; GENIGEORGIS et alii, 1989 e GENIGEORGIS et alii, 1990), variam de 2 a 25 mg/L.

O tratamento das coxas contaminadas com soluções de hipoclorito de sódio provocou uma ligeira redução, da ordem de 0,29 e -0,07 ciclos log para as concentrações de 4,95 mg/L e 23,34 mg/L de cloro disponível total respectivamente, porém sem significado estatístico (**Tabela 21**).

A presença de *L. monocytogenes* em frangos após resfriamento em tanque constatada por SKOVGAARD & MORGEN (1988), GENIGEORGIS et alii (1989), VARABIOFF (1990), DYKES et alii (1994), LONCAREVIC et alii (1994) e OJENIYI et alii (1996), revela a ineficiência do cloro na redução da contaminação por esta bactéria. Segundo LILLARD (1990), que obteve uma incidência maior de *Salmonella* após resfriamento em tanque rotatório, esta etapa seria um local de contaminação cruzada das carcaças.

Examinando água de resfriamento de aves, GENIGEORGIS et alii (1989), isolaram *L. monocytogenes* de abatedouro de frango que utilizava 20 mg/L de cloro, mas GENIGEORGIS et alii (1990) só encontraram *L. welshimeri* em água de chiller com 20-25 mg/L de cloro, dados estes compatíveis com os resultados da **Tabela 19** onde não constatamos ação de cloro sobre *L. monocytogenes*. Por outro lado, LONCAREVIC et alii (1994) encontraram *L. monocytogenes* somente em amostras de frango que foram resfriadas em água com ≤ 10 mg/L de cloro, não sendo isolada quando o nível de cloro estava a 15 mg/L.

Os resultados insatisfatórios obtidos, os relatos acima, a alta incidência deste agente patogênico no produto acabado reafirmam a ineficiência do uso de cloro na água de resfriamento de carcaças para garantia de um produto final livre de *L. monocytogenes*.

As concentrações das soluções de cloro e fosfato trissódico que foram utilizadas na pesquisa são as recomendadas pelos órgãos oficiais para uso no processamento de aves. No entanto, estes produtos não foram eficientes na redução da contaminação por *L. monocytogenes*. A alta ocorrência deste patógeno em amostras de peito e carcaça de frango verificada nas pesquisas realizadas na primeira fase deste projeto talvez possa ser justificada através dos resultados desta segunda etapa, ou seja, os agentes químicos sanitizantes nas condições de uso são ineficientes frente a uma possível contaminação por *L. monocytogenes* durante o abate.

Novas medidas de redução de *Listeria monocytogenes* durante o processo de abate, e corte de aves, até o recebimento da embalagem devem ainda ser avaliadas e pesquisadas para a melhoria da qualidade destes produtos.

Tabela 17. Contagem de *L. monocytogenes* em coxas de frango artificialmente contaminadas após imersão em soluções de fosfato trissódico a 25°C por 1 minuto.

Grupo	Conc.	pH	log NMP/g de pele
1	TSP 8 %	12,61	6,24 ± 0,08
2	TSP 8 %	12,61	6,65 ± 0,21
3	TSP 12%	12,77	6,02 ± 0,25
4	TSP 12%	12,77	6,32 ± 0,23
Controle 1 ^a	tampão fosfato	-	6,59 ± 0,28
Controle 2 ^b	sem imersão	-	6,81 ± 0,24

^a Grupo controle dos ensaios dos grupos 1, 2, 3 e 4 - com imersão em tampão fosfato.

^b Grupo controle do nível de contaminação das coxas utilizadas nos ensaios (grupos 1, 2, 3, 4 e 5).

Tabela 18. Contagem de *L. monocytogenes* em coxas de frango artificialmente contaminadas após imersão em soluções de hipoclorito de sódio a 4°C por 20 minutos.

Grupo	Conc. (mg/L) ^a	pH	log NMP/g de pele
1	4,95	7,68	6,09 ± 0,38
2	4,95	7,68	6,18 ± 0,14
3	23,34	8,00	6,54 ± 0,12
4	23,34	8,00	6,45 ± 0,12
Controle 1 ^b	tampão fosfato	-	6,42 ± 0,11
Controle 2 ^c	sem imersão	-	6,63 ± 0,00

^a Conc. = concentração de cloro disponível total.

^b Grupo controle dos ensaios dos grupos 1, 2, 3 e 4 - com imersão em tampão fosfato.

^c Grupo controle do nível de contaminação das coxas utilizadas nos ensaios (grupos 1, 2, 3, 4 e 5).

Tabela 19. Efeito dos tratamentos com fosfato trissódico e hipoclorito de sódio sobre *L. monocytogenes* aderidos a pele de coxas de frangos.

Solução	Concentração	pH	Temperatura / Tempo	Redução (log NMP/g)
TSP	8 %	12,61	25°C / 1 min	0,14
TSP	12%	12,77	25°C / 1 min	0,42
NaOCl	4,95 mg/L ^a	7,68	4°C / 20 min	0,29
NaOCl	23,34 mg/L ^a	8,00	4°C / 20 min	-0,07

^a Concentração de cloro disponível total.

Tabela 20. Análise de variância para os tratamentos com fosfato trissódico

Fator de variação	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado da média	F
Tratamento	0,4168	2	0,2084	1,80
Erro experimental	1,3875	12	0,1156	
Total	1,8043	14	0,1288	

Sendo $F = 1,80 < F_{.05} = 3,89$, a hipótese nula é aceita, ou seja não há diferença entre os tratamentos.

Tabela 21. Análise de variância dos tratamentos com Hipoclorito de sódio

Fator de variação	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado da média	F
Tratamento	0,4250	2	0,2125	0,37
Erro experimental	6,7990	12	0,5666	
Total	7,2240	14	0,5160	

Sendo $F = 0,37 < F_{.05} = 3,89$, a hipótese nula é aceita, ou seja não há diferença entre os tratamentos.

6. CONCLUSÕES

O estudo realizado ao longo desta pesquisa e os resultados obtidos conduzem às seguintes conclusões:

- As metodologias tradicionais para detecção de *L. monocytogenes*, inclusive as oficiais, ainda precisam ser aperfeiçoadas. As modificações no método do USDA (incubação adicional do LEB por mais 24 h, o isolamento a partir do LEB a 48 h, e o uso de mais um ágar seletivo, o LPM) proporciona aumento substancial na detecção de *L. monocytogenes* em amostras de carnes de frango;
- A ocorrência de *Listeria* sp e *L. monocytogenes* em carnes de frango é muito elevada, sendo necessária uma maior preocupação quanto ao controle de sua presença em alimentos;
- O ágar LPM apresentou melhor desempenho que o ágar MOX na recuperação de *L. monocytogenes*, durante a avaliação da ocorrência e da quantificação pela técnica do NMP, em carnes de frango;
- A técnica do NMP é plenamente viável para avaliar quantitativamente a população de *Listeria* em carnes de frango;
- O meio MdFB proposto neste trabalho pode ser utilizado na quantificação de *Listeria* spp em carnes de frango;
- Em amostras com NMP de *Listeria* abaixo de 100/g é difícil a sua quantificação pelo método de contagem direta em placas;
- O emprego de soluções de fostato trissódico e hipoclorito de sódio não se mostrou eficiente na redução da contaminação de carnes de frango por *L. monocytogenes*, nas condições experimentais utilizadas.

7. SUGESTÕES

As indústrias processadoras que se preocupam com a qualidade de produtos alimentícios e com a segurança do consumidor, deverão reavaliar os prazos de validade (8-15 dias) a 4°C em função da dificuldade de atendimento desta temperatura pelos postos de distribuição e nos refrigeradores domésticos.

A elevada ocorrência de *Listeria* sp (96,7%) e de *L. monocytogenes* (70%) em frangos, verificado neste trabalho e o fato dela ser uma bactéria ambiental devem sensibilizar as autoridades sanitárias e empresas do setor no sentido de:

- estabelecer limites máximos de tolerância em carnes de frango para inserção nos padrões de identidade e qualidade da Legislação de Alimentos e nos programas de qualidade das empresas;
- verificar/rever os processos de elaboração dos produtos, bem como as recomendações para manipulação, limpeza e sanitização visando garantir a efetiva redução da contaminação por *L. monocytogenes*;
- informar/educar à população e as pequenas empresas que preparam este tipo de alimento sobre os cuidados necessários durante o preparo (Boas Práticas de Manufatura) para que se possa reduzir os riscos à saúde do consumidor, uma vez que o cozimento adequado elimina o patógeno.

Apesar do plano de amostragem para *L. monocytogenes* preconizada pela “International Commission of Microbiological Specifications for Foods” não prever plano para alimentos que sofrerão tratamento listericida antes do consumo, como é o caso de carnes de frango, devemos salientar que a determinação do NMP desta bactéria nestes produtos é valiosa no programa de qualidade das empresas.

A técnica do NMP pode ser utilizada para contagem de *L. monocytogenes* em outros alimentos, no entanto deve-se considerar que a escolha do meio de enriquecimento a ser utilizado depende da microbiota existente no alimento e do grau de injúria bacteriana provocada pelo processamento do alimento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANÔNIMO. FSIS proposes TSP for poultry; labeling not required. **Food Chemical News**, Washington, v.35, n.45, p. 38-39, Jan., 1994a.
2. ANÔNIMO. GAP questions TSP safety, efficacy, accuracy of study. **Food Chemical News**, Washington, v.36, n.7, p. 31, Apr., 1994b.
3. ANÔNIMO. GAP questions food safety benefits of TSP. **Food Chemical News**, Washington, v.36, n.7, p. 32-33, Apr., 1994c.
4. ANÔNIMO. APHA, AWWA support TSP use. **Food Chemical News**, Washington, v.36, n.6, p. 42-43, Apr., 1994d.
5. ANÔNIMO. TSP on post-chill carcasses evaluated for *Campylobacter* reduction. **Food Chemical News**, Washington, v.36, n.11, p. 5-6, May, 1994e.
6. APHA (American Public Health Association) - AWWA - WPCF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 18. ed. Washington: APHA, 1992.
7. AZADIAN, B. S.; FINNERTY, G. T.; PEARSON, A. D. Cheese-borne *Listeria meningitis* in immunocompetent patient. **The Lancet**, London, v.1, n.8632, p. 322-323, Feb., 1989.
8. BAILEY, J. S.; FLETCHER, D. L. The incidence of *Listeria monocytogenes* on fresh broiler carcasses. **Poultry Science**, Champaign, v.66, suppl.1, p.59, 1987.
9. BAILEY, JOURNAL S.; FLETCHER, D. L.; COX, N. A. Recovery and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* from broiler chickens in the Southeastern United States. **Journal of Food Protection**, Ames, v.52, n.3, p. 148-150, Mar., 1989.
10. BALIMANDAWA, M.; DE ZUTTER, L.; ROLLIER, I.; WAUTERS, G. Influence of the inoculum concentration on the recovery of *Listeria* from meat by L-Palcamy enrichment. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 23, n.2, p. 227-230, Oct., 1994.
11. BARNES, R.; ARCHER, P.; STRACK, G. R.; ISTRE, M.D. Listeriosis associated with consumption of turkey franks. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 38, n.15, p. 267-268, Apr., 1989.
12. BEUMER, R. R.; GIFFEL, M. C.; BOER, E.; ROMBOUTS, F. M. Growth of *Listeria monocytogenes* on sliced cooked meat products. **Food Microbiology**, London, v.13, n. 4, p. 333-340, Aug., 1996.

13. BILLE, J. Epidemiology of human listeriosis in Europe. with special reference to the Swiss outbreak. In: MILLER, A. J.; SMITH, J. L.; SOMKUTI, G.A. **Foodborne Listeriosis**. New York: Elsevier, 1990. cap. 12, p. 71-74.
14. BILLE, J.; CATIMEL, B.; BANNERMAN, E.; JACQUET, C.; YERSIN, M. N.; CANIAUX, I.; MONGET, D.; ROCOURT, J. API *Listeria*, a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.6, p. 1857-1860, June, 1992.
15. BLYSICK-MCKENNAL, D. N.; SCHAFFNER, D. W. Prediction of most probable number of *L. monocytogenes* using a generalized linear model and a modified FDA *Listeria* isolation method. **Journal of Food Protection**, Ames, v.57, n.12, p.1052-1056, Dec., 1994.
16. BOERLIN, P.; ROCOURT, J.; GRIMONT, F.; GRIMONT, A. D.; JACQUET, C.; PIFFARETTI, J. C. *Listeria ivanovii* subsp. *londoniensis* subsp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 42, n.1, p. 69-73, Jan., 1992.
17. BRACKETT, R. E. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. **Food Technology**, Chicago, v.42, n.4, p. 162-164, 178, Apr., 1988.
18. BREER, C. & SCHOPFER, K. *Listeria* and food. **The Lancet**, London, v.2, n.8618, p.1022, Oct., 1988.
19. BUCHANAN, R. L.; STAHL, H. G.; BENCIVENGO, M. M.; CORRAL, F. D. Comparison of lithium chloride-phenylethanol-moxalactam and modified Vogel Johnson agars detection of *Listeria* spp. in retail-level meats, poultry, and seafood. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, n.3, p. 599-603, Mar., 1989.
20. BUCHANAN, R. L. Advances in cultural methods for the detection of *Listeria monocytogenes*. In: MILLER, A. J.; SMITH, J. L.; SOMKUTI, G.A. **Foodborne Listeriosis**. New York: Elsevier, 1990. cap. 7, p. 85-95.
21. BUNCIC, S.; PAUNOVIC, L.; RADISIC, D. The fate of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages and in vacuum-packaged frankfurters. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.6, p. 413-417, June, 1991.
22. BUYSER, M. L. DE; POUMEYROL, M.; TACHÉ, J.; LIEVAL, F.; LEBRETON, V.; DELBART, M. O. Comparaison de deux methodes de denombrement de *Listeria* sp. dans les produits carnes. **Viandes-et-Produits-Carnes**, v.11, p. 222-223, 1990.
23. CARACAPPA, S.; COLONNA, V.; RUSSO ALES, E. M.; DI NOTO, A. M.; PICCININNO, G. Valutazione del numero di *Listeria monocytogenes* in determinati alimenti di origine animale: 1ª nota. **Industrie Alimentari**, Pinerolo, v. 33, p. 400-402,405, apr., 1994.

24. CARD, L. Listeriosis in pregnancy. **The Lancet**, London, v.1, n. 8632, p. 322, Feb., 1989.
25. CARPENTER, S.; HARRISON, M. A. Survival of *Listeria monocytogenes* on processed poultry. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 54, n.3, p.556-557, May/June, 1989.
26. CASERIO, G.; GRONCHI, C.; VILLA, C. *Listeria* in carni, pesce, pollame, paste farcite e vegetali. Nota I; Indagineconoscitiva. **Industrie Alimentari**, Pinerolo, v.28, n.269, p. 250-252, mar., 1989.
27. CASERIO, G.; GARZAROLI, C.; VILLA, C.; GRONCHI, C. Diffusione di *Listeria monocytogenes* in prodotti alimentari e ambienti di lavoro. **Industrie Alimentari**, Pinerolo, v.30, n.290, p. 129-132, 138, feb., 1991.
28. COMI, G.; MAIFRENI, M.; CANTONI, C.; D'AURELIO, F.; VALENTI, M. Conta di *Listeria* spp in alimenti mediante metodo diretto e metodo M.P.N. (most probable number). **Industrie Alimentari**, Pinerolo, v.29, n.287, p. 985-990, nov., 1990.
29. COX, L. J.; KLEISS, T.; CORDIER, J.L.; CORDELLANAC, KONKEL, P.; PEDRAZZINI, C.; BEUMER, R. SIEBENGA, A. *Listeria* spp in food processing, non-food, and domestic environments. **Food Microbiology**, London, v.6, n.1, p. 49-61, 1989.
30. CURTIS, G.D.W.; MICHELL, M.G.; KING, A.F. & GRIFFIN, E.J. Differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.8, n.3, p. 95-98, Mar., 1989.
31. CUMMINS, A. J.; FIELDING, A. K.; McLAUHLIN, J. *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. **Journal of Infection**, London, v.28, n.1, p.89-91, Jan., 1994.
32. DESTRO, M. T.; SERRANO, A. M.; KABUKI, D.Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, Oxford, v.2, n.2, p. 110-112, Apr., 1991.
33. DESTRO, M. T. ***Listeria monocytogenes* em camarão (*Penaeus brasiliensis*): marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação em uma unidade processadora de pescado.** São Paulo, 1995. 142p. Tese (Doutor em Ciências dos Alimentos - área de bromatologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
34. DEVER, F. P.; SCHAFFNER, D. W.; SLADE, P. J. Methods for the detection of foodborne *Listeria monocytogenes* in the U.S. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v.13, n.4, p. 263-292, Dec., 1993.

35. DICKSON, J. S.; NETTLES CUTTER, C. G.; SIRAGUSA, G. R. Antimicrobial effects of trisodium phosphate against bacteria attached to beef tissue. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.57, n.11, p. 952-955, Nov., 1994.
36. DONNELLY, C. W.; BRACKETT, R. E.; DOORES, S.; LEE, W. H.; LOVETT, J. *Listeria*. In: VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESER, D. F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3. ed. Washington: APHA, 1992. cap. 38, p.637-663.
37. DYKES, G. A.; GEORNARAS, I.; PAPATHANASOPOULOS, M. A.; VAN HOLY A. Plasmid profiles of *Listeria* species associated with poultry processing. **Food Microbiology**, London, v.11, n.6, p. 519-523, Dec., 1994.
38. ENGEL, R. E.; ADAMS, E.; CRAWFORD, L. M. Foodborne listeriosis: risk from meat and poultry. **Food Control**, Oxford, v.1, n.1, p. 27-31, Jan., 1990.
39. FARBER, J. M.; SANDERS, G. W.; JOHNSTON, M.A. A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. **Journal of Food Protection**, Ames, v.52, n.7, p. 456-458, July, 1989.
40. FARBER, J. M.; CARTER, M. D.; VARUGHESE, P. V.; ASHTON, F. E. EWAN, E. P. Listeriosis traced to the consumption of alfalfa tablets and soft cheese. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v.322, n.5, p. 338, Feb., 1990.
41. FARBER, J. M. & PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, Washington, v.55, n.3, p. 476-511, Sept., 1991.
42. FARBER, J. M.; COATES, F.; DALEY, E. Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.15, n.3, p. 103-105, Sept., 1992.
43. FARBER, J. M.; DALEY, E. Presence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally-contaminated meats. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.22, n.1, p.33-42, Apr., 1994.
44. FARBER, J. M.; HARWING, J. The Canadian position on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. **Food Control**, Oxford, v.7, n. 4/5, p. 253-258, Aug./Oct., 1996.
45. FLEMING, D. W.; COCHI, S. L.; MAC DONALD, K. L.; BRONDUM, J.; HAYES, P. S.; PLIKAYTIS, B. D.; HOIMES, M. B.; AUDURIER, A.; BROOME, C. V.; REINGOLD, A. L. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v.312, n.7, p. 404-407, Feb., 1985.
46. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual**. 6. ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 1984.

47. FREDERIGHI, M.; CAPPERLIER, J. M.; ROSSERO, A.; COPPEN, P.; DENIS, J. C. Evaluation de l'effet d'un traitement de décontamination de carcasses de poulets, vis-à-vis des *Campylobacter* thermotolérants. **Sciences des Aliments**, Paris, v.15,n.4, p.393-401, juil., 1995.
48. FRASER, J. A.; SPERBER, W.; H. Rapid detection of *Listeria* spp. in food and environmental samples by esculin hydrolysis. **Journal of Food Protection**, Ames, v.51, n.10, p.762-765, Oct., 1988.
49. FUJISAWA, T.; MORI, M. Evaluation od media for determining hemolytic activity and that of API *Listeria* system for identifying strains of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n.4, p.1127-1129, Apr., 1994.
50. FURLANETTO, S. M.; SANTOS, M. A. A.; HARA, C. *Listeria* spp. Avaliação da eficiência de quatro meios de plaqueamento no seu isolamento. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.10, n.46, p. 30-34, nov./dez., 1996.
51. GALLI, R.; SANNIPOLI, C. G. T.; VALENTE, C. *Listeria monocytogenes* quale contaminante de carcasse di pollo. **Industrie Alimentari**, Pinerolo, v.31, n.300, p.21-23, gen., 1992.
52. GENIGEORGIS, C. A.; DUTULESCU, D.; GARAYZABAL, J. F. Prevalence of *Listeria* spp. in poultry meat at the supermarket and slaughterhouse. **Journal of Food Protection**, Ames, v.52 n.9, p. 618-624, Sept.,1989.
53. GENIGEORGIS, C. A.; OANCA, P.; DUTULESCU, D. Prevalence of *Listeria* spp. in turkey meat at the supermarket and slaughterhouse level. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.4, p. 282-288, Apr., 1990.
54. GIESE, J. Experimental process reduces *Salmonella* on poultry. **Food Technology**, Chicago, v.46, n.4, p. 112, Apr., 1992.
55. GILBERT, R. J.; MILLER, K. L.; ROBERTS, D. *Listeria monocytogenes* and chilled foods. **The Lancet**, London, v.1, n.8634, p. 383-384, Feb., 1989.
56. GLASS, K. A.; DOYLE, M. P. Fate of *Listeria monocytogenes* in processed meat products during refrigerated storage. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n.6, p. 1565-1569, June, 1989.
57. GOHIL, V. S.; AHMED, M. A.; DAVIES, R.; ROBINSON, R. K. Incidence of *Listeria* spp. in retail foods inthe United Arab Emirates. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.58, n.1, p. 102-104. Jan., 1995a.
58. GOHIL, V. S.; AHMED, M. A.; DAVIES, R.; ROBINSON, R. K. The direct enumeration of *L. monocytogenes* in a food with a low background microflora. **Food Control**, Oxford, v.6, n.6, p.365-369, Dec., 1995b.

59. GORMAN, B.M.; SOFOS, J.N.; MORGAN, J.B.; SCHMIDT, G.R. & SMITH, G.C. Evaluation of Hand-Trimming, Various Sanitizing Agents, and Hot Water Spray-Washing as Decontamination Interventions for Beef Brisket Adipose Tissue. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.58, n. 8, p. 899-907, Aug., 1995.
60. GUYER, S.; JEMMI, T. Behavior of *Listeria monocytogenes* during fabrication and storage of experimentally contaminated smoked salmon. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.5, p. 1523-1527, May, 1991.
61. HARRISON, M. A.; CARPENTER, S. L. Survival of large populations of *Listeria monocytogenes* on chicken breasts processed using moist heat. **Journal of Food Protection**, Ames, v.52, n.6, p. 376-378, June, 1989.
62. HART, C. D.; MEAD, G. C.; NORRIS, A. P. Effects of gaseous environmental and temperature on the storage behaviour of *Listeria monocytogenes* on chicken breast meat. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.70, n.1, p. 40-46, Jan., 1991.
63. HARVEY, J.; GILMOUR, A. Occurrence and characteristics of *Listeria* in foods produced in Northern Ireland. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.19, n.3, p. 193-205, Aug., 1993.
64. HATHCOX, A.K.; HWANG, C.A.; RESURRECCION, A.V.A. & BEUCHAT, L.R. Consumer Evaluation of Raw and Fried Chicken After Washing in Trisodium Phosphate or Lactic Acid/Sodium Benzoate Solutions. **Journal of Food Science**, Chicago, v.60, n. 3, p. 604-610, March, 1995.
65. HAYES, P. S.; GRAVES, L. M.; AJELLO, G. W.; SWAMINATHAN, B.; WEAVER, R. E.; WENGER, J. D.; SCHUCHAT, A.; BROOME, C. V.; THE LISTERIA STUDY GROUP. Comparison of cold enrichment and U.S. Department of Agriculture methods for isolation *L. monocytogenes* from naturally contaminated foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.8, p. 2109-2113, Aug., 1991.
66. HAYES, P. S.; GRAVES, L. M.; SWAMINATHAN, B.; AJELLO, G. W.; MALCOLM, B.; WEAVER, R. E.; RANSOM, R.; DEEVER, K.; PLIKAYTIS, B. D.; SCHUCHAT, WENGER, J. D.; PINNER, R. W.;A.; BROOME, C. V.; THE LISTERIA STUDY GROUP. Comparison of three selective enrichment methods for the isolation of *L. monocytogenes* from naturally contaminated foods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.55, n.12, p.952-959, Dec., 1992.
67. HITCHINS, A. D. *Listeria monocytogenes*. In: Food and Drug Administration. **Bacteriological Analytical Manual**. 7. ed. Arlington: AOAC, 1992, cap. 10, p. 141-151.

68. HO, J.L.; SHANDS, K. N. FRIEDLAND, G. ECKIND, P.; FRASER, D. W. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. **Archives of Internal Medicine**, v.146, n.3, p. 520-524, Mar. 1986.
69. HOFER, E.; RIBEIRO, R. Ocorrência de espécies de *Listeria* em camarão industrializado. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 21, n.2, p. 207-208, 1990.
70. HOLLENDER, R.; BENDER, F.G.; JENKINS, R.K. & BLACK, C.L. Consumer evaluation of chicken treated with a trisodium phosphate application during processing. **Poultry Science**, v.72, n.5, p. 855-759, May, 1993.
71. HOLT, J. G.; KRIEY, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. group 19, p.565-570.
72. HUANG, I-P.D.; YOUSEF, A. E.; MATTHEWS, M. E.; MARTH, E. H. Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in chicken gravy during cooling and refrigerated storage. **Journal of Foodservice System**, Trumbull, v.7, n.3, p.185-192, 1993.
73. HUDSON, W. R.; MEAD, G. C. *Listeria* contamination at a poultry processing plant. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.9 n.6, p. 211-214, Dec., 1989.
74. HUDSON, J. A.; MOTT, S. J.; DELACY, K. M.; EDRIDGE, A. L. Incidence and coincidence of *Listeria* spp., motile aeromonads and *Yersinia enterocolitica* on ready-to-eat fleshfoods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.16, n.2, p. 99-108, June, 1992.
75. HWANG, C. A.; BEUCHAT, L. R. Efficacy of selected chemicals for killing pathogenic and spoilage microorganisms on chicken skin. **Journal of Food Protection**, Ames, v.58, n.1, p.19-23, Jan., 1995.
76. IANIERI, A.; FRANCIOSO, E.; TIECCO, G. Isolamento di *Listeria monocytogenes* da carni di pollo. **Industrie Alimentari**, Pinerolo, v.29, n.287, p. 998-999, 1003, Nov., 1990.
77. IIDA, T.; KANZAI, M.; MARUYAMA, T.; INOUE, S.; KANEUCHI, C. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in intestinal contents of healthy animals in Japan. **Journal of Veterinary Medicine Science**, Tokyo, v.53, n.5, p.873-875, Oct., 1991.
78. JEMMI, T. & KEUSCH, A. Behavior of *Listeria monocytogenes* during processing and storage of experimentally contaminated hot-smoked trout. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.15, n.3-4, p. 339-346, Mar./Apr., 1992.

79. JUNTILA, J.; BRANDER, M. *Listeria monocytogenes* septicemia associated with consumption of salted mushrooms. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, Stockholm, v.21, n.3, p. 339-342, 1989.
80. KACZMARSKI, E. B.; JONES, D. M. Listeriosis and ready-cooked chicken. **The Lancet**, London, v.1, n.8635, p.549, Mar.1989.
81. KERR, K. G.; DEALLER, S. F.; LACEY, R. W. *Listeria* in cook-chill food. **The Lancet**, London, v.2, n.8601, p. 37-38, July, 1988a.
82. KERR, K. G.; DEALLER, S. F.; LACEY, R. W. Materno-fetal listeriosis from cook-chill and refrigerated food. **The Lancet**, London, v.2, n.8620, p. 1133, Nov. 1988b.
83. KERR, K. G.; ROTOWA, N. A.; HAWKEY, P. M.; LACEY, R. W. Incidence of *Listeria* spp. in pre-cooked, chilled chicken products as determined by culture and enzyme-linked immunoassay (ELISA). **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.7, p. 606-607, 629, July, 1990.
84. KIM, J. W.; SLAVIK, M. F.; PHARR, M. D.; RABEN, D. P.; LOBSINGER, C. M.; TSAI, S. Reduction of *Salmonella* on post-chill chicken carcasses by trisodium phosphate (Na₃PO₄) treatment. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v.14, n.1, p. 9-17, Mar., 1994a.
85. KIM, J. W.; SLAVIK, M. F.; BENDER, F. G. Removal of *Salmonella typhimurium* attached to chicken skin by rinsing with trisodium phosphate solution: scanning electron microscopic examination. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v.14, n.1, p. 77-84, Mar., 1994b.
86. KIM, J. W.; SLAVIK, M. F.; Trisodium phosphate (TSP) treatment of beef surfaces to reduce *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. **Journal of Food Science**, Chicago, v.59, n.1, p.20-22, 1994.
87. KORNACKI, J. L.; EVANSON, D. J. REID, W.; ROWE, K.; FLOWERS, R.S. Evaluation of the USDA protocol for detection of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.56, n.5, p.441-443, May, 1993.
88. LACHICA, R. V. Selective plating medium for quantitative recover of food-borne *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, n.1,p.167-169, Jan., 1990.
89. LAGE, M. E. **Ocorrência de *Listeria* spp em carne de frango no mercado da cidade de Belo Horizonte, MG**. Belo Horizonte,1993. 85p. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

90. LAWRENCE, L. M. & GILMOUR, A. Incidence of *Listeria* spp, and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environment and in poultry products and their rapid confirmation by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.12, p. 4600-4604, Dec., 1994.
91. LEE, W.H. & McCLAIN, D. Improved *Listeria monocytogenes* selective agar. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.52, n.5, p. 1215-1217, May, 1986.
92. LESSING, M. P. A.; CURTIS, G.D.W.; BOWLER, I. C. F. *Listeria ivanovii* infection. **Journal of Infection**, London, v.29, n.2, p.230-231, Sept., 1994.
93. LILLARD, H. S.; The impact of commercial processing procedures on the bacterial contamination and cross-contamination of broiler carcasses. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.3, p.202-204, Mar., 1990.
94. LILLARD, H. S. Effect of trisodium phosphate on Salmonellae attached to chicken skin. **Journal of Food Protection**, Ames, v.57, n.6, p.465-469, June, 1994.
95. LINNAN, M. J.; MASCOLA, L.; LOU, X. D.; GOULET, V. MAY, S. SALMINEN, C.; HIRD, D. W.; 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. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v.319, n.13, p. 823-828, Sept. 1988.
96. LOCARENVIC, S.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M.L. Occurrence of *Listeria* species in broilers pre- and post-chilling in chlorinated water at two slaughterhouses. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v.35, n.2, p.149-154, 1994.
97. LOVETT, J. & TWEDT, R.M. *Listeria*. **Food Technology**, Chicago, v.42, n.4, p. 188-190, Apr., 1988.
98. MARTH, E. H. Disease characteristics of *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, Chicago, v.42, n.4, p. 165-168, Apr., 1988.
99. Mc CLAIN, D.; LEE, W. H. Development of USDA - FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v.71, n.3, p. 660-664, May/June, 1988.
100. McCLAIN, D. & LEE, W.H. FSIS Method for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from processed meat and poultry products. Laboratory Communication n° 57. Revised May 24, 1989. USDA FSIS, Beltsville, M. D., 1989. [Modifications to FSIS procedure for *Listeria monocytogenes*. Feb. 8, 1994].

101. Mc LAUCHLIN, J. *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.63, n.1, p. 1-11, July, 1987.
102. McLAUCHLIN, J.; SAUNDERS, N. A.; RIDLEY, A. M.; TAYLOR, A. G. Listeriosis and foodborne transmission. **The Lancet**, London, v.1, n.8578, p. 177-178, Jan., 1988.
103. Mc LAUCHLIN, J.; LOW, J. C. Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational disease of veterinarians and farmers. **The Veterinary Record**, London, v.135, n.26, p.615-617, Dec. 1994.
104. Mc LAUCHLIN, J. The role of the Public Health Laboratory Service in England and Wales in the investigation of human listeriosis during the 1980s and 1990s. **Food Control**, Oxford, v.7, n. 4/5, p. 235-240, Aug./Oct., 1996.
105. MORRIS, I. J.; RIBEIRO, C. D. *Listeria monocytogenes* and pate. **The Lancet**, London, v.2, n.8674, p. 1285-1286, Nov., 1989.
106. MOURA, S. M.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M. Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.19, n.3, p. 229-237, Aug., 1993.
107. NELSON, J. H. Where are *Listeria* likely to be found in dairy plants? **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.10, n.6, p. 344-345, June, 1990.
108. 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.** Jaboticabal, 1994. 108p. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.
109. OJENIYI, B.; WEGENER, H. C.; JENSEN, N. E.; BISGAARD, M. *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products: epidemiological investigations in seven Danish abattoirs. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.80, n.4. p. 395-401, Apr., 1996.
110. OLIVEIRA, A. N. **Bactérias do Gênero *Listeria* em Leite e Derivados no Comércio Varejista de Goiânia - Goiás.** Belo Horizonte, 1993. 101p. Tese (Mestre em Medicina Veterinária- área Inspeção de Carnes, Leite e Derivados) - Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais.
111. PEELER, J. T.; HOUGHTBY, G. A.; RAINOSEK, A. P. The most probable number technique. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** 3. ed. Washington: APHA, 1992. cap.6, p.105-120.

112. PINI, P. N.; GILBERT, R.J. The occurrence in the U.K. of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.6, n.4, p. 317-326, June, 1988.
113. PRESOT, I. M.; CHAVES, J.B.P. Implantação de Sistema da Qualidade ISO 9000 em Abatedouro de Aves. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, n.218, p.41-50, abr., 1995.
114. RHODIA. **Rhodigard**. São Paulo, s.d., não paginado. [Catálogo].
115. ROCOURT, J.; WEHMEYER, U.; STACKEBRANDT, E. Transfer of *Listeria denitrificans* to a new genus, *Jonesia* gen. nov., *Jonesia denitrificans* comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.37, n.3, p. 266-270, July, 1987.
116. RORVIK, L. M.; YNDESTAD, M. *Listeria monocytogenes* in foods in Norway. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.13, n.2, p. 97-104, June, 1991.
117. RORVIK, L. M.; CAUGANT, D. A.; YNDESTAD, M. Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in a salmon slaughterhouse **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.25, n.1, p. 19-27, Mar., 1995.
118. RYSER E.T.; MARTH, E. H. **Listeria, Listeriosis, and Food Safety**. New York:Marcel Dekker, Inc., 1991. 632 p.
119. RYU, C. H.; IGIMI, S. ; INOUE, S.; KUMAGAI, S. The incidence of *Listeria* species in retail foods in Japan. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.16, n.2, p. 157-160, June, 1992.
120. SCHLECH, W. F.; LAVIGNE, P. M.; BORTOLUSSI, R. A.; ALLEN, A. C.; HALDANE, E. V.; WORT, A. J.; HIGHTOWER, A. W.; JOHNSON, S. E.; KING, S. H.; NICHOLLS, E. S.; BROOME, C. V. Epidemic listeriosis - evidence for transmission by food, **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v.308, n.4, p. 203-206, Jan. 1983.
121. SCHLECH, W.F. Overview of listeriosis. **Food Control**, Oxford, v.7, n. 4/5, p. 183-186, Aug./Oct., 1996.
122. SCHUCHAT, A.; LIZANO, C.; BROOME, C. V.; SWAMINATHAN, B.; KIM, C.; WINN, K. Outbreak of neonatal listeriosis associated with mineral oil. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v.10, n.3, p. 183-189, Mar. 1991.
123. SCHWARTZ, B.; CIESIELKI, C. A.; BROOME, C. V.; GAVENTA, S.; BROWN, G. R.; GELLIN, B. G.; HIGHTOWER, A. W.; MASCOLA, L.; LISTERIOSIS STUDY GROUP. Association of sporadic listeriosis with consumption of uncooked hot dogs and undercooked chicken. **The Lancet**, London, v.2, n. 8614, p. 779-782, Oct. 1988.

124. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - M.S. Portaria nº 1.428 de 26 novembro de 1993. Aprova o Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos, as Diretrizes para o Estabelecimento de Boas Práticas de Produção e de Prestação de Serviços na Área de Alimentos e o Regulamento Técnico para o Estabelecimento de Padrões de Identidade e Qualidade para serviços e Produtos na Área de Alimentos. **Diário Oficial da União**, de 02 de dezembro de 1993, 5p.
125. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - M.S. Portaria nº 72 de 24 agosto de 1995. Autoriza o uso do fosfato trissódico dodecahidratado com a função de coadjuvante de tecnologia na lavagem de ovos e carcaças de carnes cruas, tais como: bovinas, porcinas e ovinas, aves em geral nas quantidades adequadas às Boas Práticas de Fabricação. **Diário Oficial da União**, de 28 de agosto de 1995, p. 13.177.
126. SEELIGER, H.P.R.; JONES, D. Genus *Listeria*. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v. 2, p.1235-1245.
127. SERAFINI, A. B.; CAIXETA, E. R.; BARBOSA, A. J.; VIEIRA, J. D. G. Isolamento de *Listeria* spp. de amostras de águas residuais de quatro indústrias de laticínios, localizadas nas cidades de Goiânia e Anápolis, Goiás. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.10, n.46, p. 48-50, nov/dez. 1996.
128. SHANK, F.R.; ELLIOT, E.L.; WACHSMUTH, I.K. & LOSIKOFF, M.E. US position on *Listeria monocytogenes* in foods. **Food Control**, Oxford, v.7, n. 4/5, p. 229-234, Aug./Oct., 1996.
129. SHERIDAN, J. J.; DUFFY, G.; MCDOWELL, D. A.; BLAIR, I. S. The occurrence and initial numbers of *Listeria* in Irish meat and fish products and the recovery of injured cells from frozen products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.22, n.2-3, p. 105-113, May, 1994.
130. SIMÓN, M.; TARRAGÓ, C.; FERRER, M. D. Incidence of *Listeria monocytogenes* in fresh foods in Barcelona (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 16, n.2, p. 153-156, June, 1992.
131. SKOVGAARD, N. & MORGEN, C. A. Detection of *Listeria* spp in faeces from animals, in feeds, and in raw food of animal origin. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.6, n.3, p. 229-242, May, 1988.
132. SLADE, P. J.; COLLINS-THOMPSON, D. L. Enumeration of *Listeria monocytogenes* in raw milk. **Letter in Applied Microbiology**, Oxford, v.6, n.5, p. 121-123, May, 1988.

133. SLAVIK, M. F.; KIM, J. W.; PHARR, M. D.; RABEN, D. P.; TSAI, S.; LOBSINGER, C. M. Effect of trisodium phosphate on *Campylobacter* attached to post chill chicken carcasses. **Journal of Food Protection**, Ames, v.57, n.4, p. 324-326, Apr., 1994.
134. SOMERS, E. B.; SCHOENI, J. L.; WONG, A. C. L. Effect of trisodium phosphate on biofilm and planktonic cells of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.22, n.4, p. 269-276, June, 1994.
135. SURKIEWCZ, B.F.; JOHNSTON, R.W.; MORAN, A.B. & KRUMM, G.W. A Bacteriological Survey of Chicken Evisceration Plants. **Food Technology**, Chicago, v.23, n.8, p. 1066-1069, Aug., 1969.
136. SWAMINATHAN, B.; HAYES, P. S. & PRZYBYSZEWSKI, V.A. Evaluation of Enrichment and Plating Media for Isolating *Listeria monocytogenes*. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v.71, n.3, p. 664-668, May/June, 1988.
137. SWANSON, K. M. J.; BUSTA, F. F.; PETERSON, E. H.; JOHNSON, M. G. Colony count methods. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3. ed. Washington: APHA, 1992. cap.4, p.75-95.
138. TAPPERO, J. W.; SCHUCHAT, A.; DEEVER, K. A.; MASCOLA, L.; WENGER, J. D.; LISTERIOSIS STUDY GROUP. Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.273, n.14, p.1118-1122, Apr., 1995.
139. TRAN, T. T.; HITCHINS, A. D. Evaluation of a selective enrichment most probable number enumeration methods for viable *Listeria* spp. in dairy products. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, n.9, p.928-931, Sept., 1996.
140. TWEDT, R. M.; HITCHINS, A. D.; PRENTICE, G. A. Determination of the presence of *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products: IDF collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v.77, n.2, p.395-402, Mar./Apr., 1994.
141. VALLAVANTI, W.; APPI, A.; RACCANELLI, F.; CANTONI, C.; COMI, G. Presenza e conta di *Listeria monocytogenes* in alcuni alimenti soggetti a cottura. **Industrie Alimentari**, Pinerolo, v.33, n.327, p. 643-647, 650, giug., 1994.

142. VAN NETTEN, P.; PERALES, I.; VAN DE MOOSDIJK, A.; CURTIS, G. D. W.; MOSSEL, D. A. A liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.8, n.4, p. 299-316, July, 1989.
143. VAN SCHOTHORST, M. Sampling plans for *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Oxford, v.7, n. 4/5, p. 203-208, Aug./Oct., 1996.
144. VARABIOFF, Y. Incidence and recovery of *Listeria* from chicken with a pre-enrichment technique. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.7, p. 555-557, 624, July, 1990.
145. WALKER, S.J.; ARCHER, P. & BANKS, J.G. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.68, n.2. p. 157-162, Feb., 1990.
146. WANG, C. & MURIANA, P. M. Incidence of *Listeria monocytogenes* in Packages of Retail Franks. **Journal of Food Protection**, v.57, n.5, p. 382-386, May, 1994.
147. WARBURTON, D. W.; FARBER, J. M.; BABIUK, T. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. In: CANADA. Health and Welfare. **Compendium of analytical methods: laboratory procedures of microbiological analytical of foods**, [MFHPB 30]. Ottawa: Polyscience, 1991a.
148. WARBURTON, D. W.; FARBER, J. M.; ARMSTRONG, A.; CALDEIRA, R.; HUNT, T.; MESSIER, S.; PLANTE, R.; TIWARI, N. P.; VINET, J. A comparative study of the "FDA and USDA" methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.13, n.2, p.105-118, June, 1991b.
149. WARBURTON, D. W.; FARBER, J.M.; POWELL, C.; TIWARI, N. P.; READ, S.; PLANTE, R.; BABIUK, T.; LAFFEY, P.; KAURI, T.; MAYERS, P.; CHAMPAGNE, M. J.; HUNT, T.; LACASSE, P.; VIET, K.; SMANDO, R.; COATES, F. Comparison of methods for optimum detection of stressed and low levels of *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology** v.9, n.2, p.127-145, June, 1992.
150. WENGER, J. D.; SWAMINATHAN, B.; HAYES, P. S.; GREEN, S. S.; PRATT, M.; PINNER, R. W.; SCHUCHAT, A.; BROOME, C. V. *Listeria monocytogenes* contamination of turkey franks: Evaluation of a production facility. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.12, p. 1015-1019, Dec., 1990.

151. WONG, H. C.; CHAO, W. L.; LEE, S. J. Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* in foods available in Taiwan. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n.10, p.3101-3104, Oct., 1990.
152. YU, L. S. L. & FUNG, D. Y. C. Five-tube most-probable-number method using the Fung-Yu tube for enumeration of *Listeria monocytogenes* in restructured meat products during refrigerated storage. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.18, n.2, p. 97-106, Apr., 1993.

ANEXO I

Opil Listeria

System for the identification of *Listeria*

API LISTERIA is a system for the identification of *Listeria*. It uses standardized and miniaturized tests with a specially adapted data base. It also permits the characterization of the genus *Listeria* by eliminating specimens not belonging to the genus *Listeria*.

PRINCIPLE

The API LISTERIA strip consists of 10 microtubes containing dehydrated substrates which enable the performance of enzymatic tests or sugar fermentations. The reactions produced during the incubation period are either revealed through spontaneous coloured reactions or by the addition of reagents. After 18-24 hours of incubation at 35-37°C, the reactions are read visually using the Reading Table and identification is obtained using the Profile List in the Instruction Manual.

REAGENTS

- Kit contents (10 tests) :
- 10 API LISTERIA strips
- 10 ampoules of Suspension Medium, 2 ml
- 1 ZYM B reagent
- 10 incubation boxes
- 10 result sheets
- 1 instruction manual

Additional products (not included in the kit) :

- McFarland Standard (ref. 70 900), 0.5 on the scale or ATB Expression Densitometer (ref. 15 500)
- Pipettes or PSpipettes (ref. 70 250)
- Ampoule rack (ref. 70 200)

Required laboratory equipment :

- 37°C incubator
- Refrigerator
- Bunsen burner
- Marker pen

STORAGE

The strips should be stored at 2-8°C and the suspension media between 2°C and 30°C until the expiry date indicated on the packaging.

The ZYM B reagent should be stored at 2-8°C and may be kept for up to 1 month after the ampoule has been opened.

The ZYM B reagent is sensitive to light : wrap the bottles in aluminium foil. The reagent should not be used if it turns pink. Only take the reagent out when it is being used and do not leave it on the glass bench for a long time.

COMPOSITION OF MEDIA AND REAGENTS

Suspension Medium 2 ml	Demeralized water	
ZYM B reagent	Fast Blue BB	0.35 g
	2-Methoxy-ethanol	qsp 100 ml

INSTRUCTIONS FOR USE

Selection of the colonies

- Check that the strain belongs to the genus *Listeria* (short Gram + rods which are polymorphic, motile at 25°C but not at 37°C; catalase positive and oxidase negative).
- As specimens often contain a mixture of several types of *Listeria*, it is preferable to make a subculture on blood agar using a well-isolated colony. Incubate the dish for 24 hours at 35-37°C.

NOTE : The following media may be used to take colony samples before using the API LISTERIA strip :

- non-selective blood agar media with a Columbia or TSA base and with or without antibiotics ;
- selective media for *Listeria*, excluding the McBride medium which inhibits the enzymatic manifestation of bacteria on the API LISTERIA strip. If this medium is used for isolation purposes, make a subculture on blood agar.

Preparation of the strip

- Prepare the incubation box (tray and lid) and distribute about 5 ml of water into the honey-combed wells of the tray to create a humid atmosphere.
- Record the strain reference on the elongated tab of the tray.
- Remove the strip from its individual packaging.
- Place the strip in the incubation box.
- Discard the desiccant sachet.

Preparation of the inoculum

- Open an ampoule of Suspension Medium, 2 ml.
- Using a pipette or PSpipette, take a few well-isolated colonies and make a suspension turbidity equivalent to 0.5 McFarland.
- Observe the haemolysis type and record it on the result sheet. This qualifies as an additional test.

Inoculation of the strip

Distribute the bacterial suspension into each cupule, avoiding the formation of bubbles (tilt the strip slightly forward and position the pipette or PSpipette at the edge of the cupule) :

- Fill [DIM] test tube and cupule (about 100 µl, i.e. 2 drops with Pasteur pipette or 5 drops with PSpipette), avoiding the formation of a convex meniscus.
- Only fill the tube part of tests ESC or TAG (about 50 µl, i.e. 1 drop with Pasteur pipette or 2 drops with PSpipette).

NOTE : The quality of the filling is very important : tubes which are insufficiently or excessively full may cause false positive or false negative results.

Close the incubation box.

Incubate for 18-24 hours at 35-37°C in aerobic conditions.

Reading the strip

- Add a drop of ZYM B reagent to the [DIM] test.
- Wait 3 minutes then read the reactions by referring to the Reading Table in the Instruction Manual.
- Record whether the reactions are positive or negative (+/-) on the result sheet.
- Also record the haemolysis type.

Identification

- Code the reactions obtained into a numerical profile : on the result sheet, the tests are separated into groups of three and a number 1, 2 or 4 is assigned to each one. By adding the numbers corresponding to positive reactions a 4-digit numerical profile is obtained.
- Identification is obtained by searching for the numerical profile in the Profile List of the Instruction Manual.

Disposal of used material

After use, all ampoules, pipettes and strips should be incinerated, autoclaved or immersed in a disinfectant prior to disposal.

LIMITATIONS

API LISTERIA is a system designed to identify bacteria belonging uniquely to the genus *Listeria*. Interpretation of the results should be made by a competent microbiologist who should also take into consideration the source of the specimen, microscopic and macroscopic morphology and any additional tests which may have been carried out.

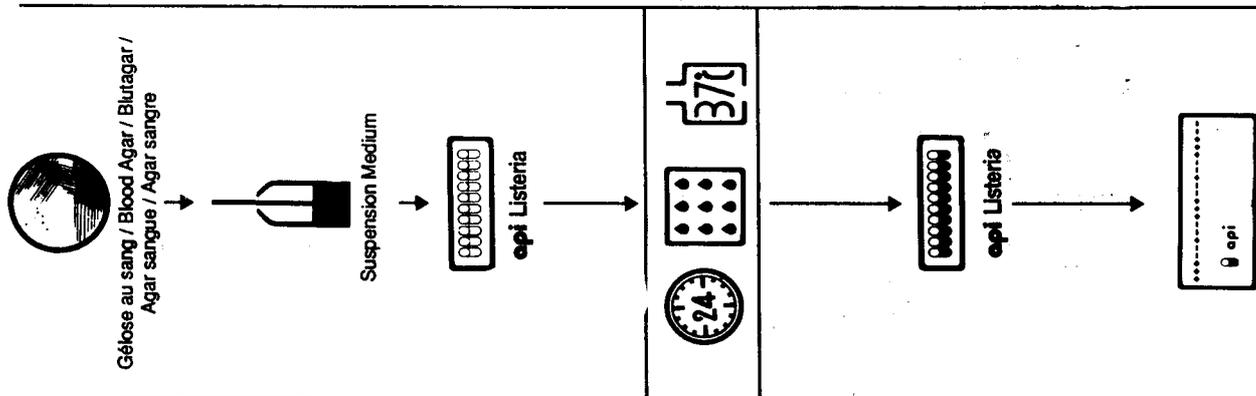
READING TABLE

TESTS	REACTIONS	RESULTS	
		NEGATIVE	POSITIVE
[DIM]	Differentiation <i>L. innocua</i> / <i>L. monocytogenes</i>	pale orange pink beige grey beige	ZYM B < 3 ml orange
ESC	ESCUlin (Hydrolysis)	pale yellow	black
αMAN	α-MANnosidase	colourless	yellow
DARL	D-ARabitol (Acidification)		
XYL	D-XYlose (Acidification)		
RHA	RHAmnose (Acidification)		
MDG	α-Methyl-D-Glucoside (Acidification)		
RIB	RIBose (Acidification)	red	yellow yellow-orange
GIP	Glucose-1-Phosphate (Acidification)	orange-red	
TAG	D-TAGalose (Acidification)		

BIBLIOGRAPHY

- BILLE J.
Listeria
(1991) Med. et Hyg., 49, 621-624
- BILLE J., CATMEL B., BANNERMAN E., JACQUET C., YERSIN M.N., CANHAUX I., MORGENT D., ROCOURT J.
API LISTERIA, a new and promising One Day System to identify *Listeria* isolates.
(1992) Appl. Environ. Microbiol., 58, 1857-1860.
- BOERLIN P., ROCOURT J., PIFFARETTI J.C.
Taxonomy of the Genus *Listeria* by using Multicoups Enzyme Electrophoresis.
(1991) Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 59-64.
- KERR K.G. and al.
Evaluation of the Mast ID and API 50 CH Systems for Identification of *Listeria* spp
(1989) Appl. Environ. Microbiol., 55, 657-660.
- MACGOWAN A.P. and al.
Evaluation of the API 20 STREP System for Identifying *Listeria* species
(1989) J. Clin. Pathol., 42, 549-550.
- ROCOURT J., CATMEL B.
Caractérisation biochimique des espèces du genre *Listeria*
(1985) Zbl. Bakt. Hyg., A 260, 221-231.
- ROCOURT J.
Listeria Numeraire : épidémiologie et prévention
(1991) La lettre de l'épidémiologie, VI, 14-18.
- SNEATH P.H.A., NAIRN S., SHAPE M.E., HOLT J.G.
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology
Ninth Edition Vol. 2
(1986) Williams and Wilkins, Co., Baltimore, MD

METHODOLOGIE/PROCEDURE/METHODIK/PROCEDIMENTO/TECNICA



INOCULUM/INOKULUM/
SOSPENSIONE/INOCULO

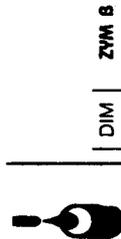
0.5 McF

INOCULATION/BEIMPFFEN
INOCULO/INOCULACION



INCUBATION/INKUBATION
INCUBAZIONE/INCUBACION

LECTURE/READING/ABLESEN
LETTURA/LECTURA



INTERPRETATION/INTERPRETIEREN
INTERPRETAZIONE/INTERPRETACION

- Liste des profils
- Profile list
- Profilliste
- Lista dei profili
- Lista de perfiles

**LISTE DE PROFILS NUMERIQUES / LIST OF NUMERICAL PROFILES /
LISTE DER NUMERISCHEN PROFILE / LISTA DEI PROFILI NUMERICI /
LISTA DE PERFILES NUMERICOS**

2 150	Listeria ivanovii	3 750	Listeria ivanovii
2 170	Listeria ivanovii	3 770	Listeria ivanovii
2 250	Listeria ivanovii	6 010	Listeria monocytogenes
2 310	Listeria seeligeri/ivanovii	6 110	Listeria monocytogenes/innocua
2 311	Listeria welshimeri	6 120	Listeria grayi
2 330	Listeria ivanovii	6 130	Listeria grayi
2 340	Listeria ivanovii	6 150	Listeria monocytogenes
2 350	Listeria ivanovii	6 310	Listeria monocytogenes
2 370	Listeria ivanovii	6 311	Listeria seeligeri/welshimeri
2 410	Listeria monocytogenes	6 311	Listeria welshimeri
2 510	Listeria monocytogenes	6 410	Listeria monocytogenes
2 550	Listeria monocytogenes	6 450	Listeria monocytogenes
2 550	Listeria monocytogenes/ivanovii	6 510	Listeria monocytogenes
2 711	Listeria welshimeri	6 520	Listeria monocytogenes
2 750	Listeria ivanovii	6 550	Listeria monocytogenes
2 770	Listeria ivanovii	6 701	Listeria welshimeri
3 110	Listeria seeligeri/innocua/ivanovii	6 711	Listeria welshimeri
3 120	Listeria grayi	7 110	Listeria innocua
3 130	Listeria grayi/ivanovii	7 111	Listeria welshimeri
3 150	Listeria ivanovii	7 120	Listeria grayi
3 170	Listeria ivanovii	7 130	Listeria grayi
3 210	Listeria seeligeri/ivanovii	7 301	Listeria welshimeri
3 250	Listeria ivanovii	7 310	Listeria seeligeri/welshimeri/innocua
3 270	Listeria ivanovii	7 311	Listeria welshimeri
3 300	Listeria seeligeri/ivanovii	7 320	Listeria grayi
3 310	Listeria seeligeri	7 330	Listeria grayi
3 311	Listeria welshimeri	7 500	Listeria innocua
3 330	Listeria ivanovii	7 510	Listeria innocua
3 340	Listeria ivanovii	7 511	Listeria welshimeri
3 350	Listeria ivanovii	7 520	Listeria grayi
3 360	Listeria ivanovii	7 530	Listeria grayi
3 370	Listeria ivanovii	7 701	Listeria welshimeri
3 510	Listeria innocua	7 710	Listeria seeligeri/innocua
3 520	Listeria grayi	7 711	Listeria welshimeri
3 711	Listeria welshimeri	7 720	Listeria grayi
3 730	Listeria ivanovii		

**TABEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICAZIONE / TABLA DE IDENTIFICACION /
TABELLA DI IDENTIFICAZIONE / TABLA DE IDENTIFICACION**

(% de réactions positives après 18-24 heures à 35-37°C / % of reactions positive after 18-24 hours at 35-37°C /
% der positiven Reaktionen nach 18-24 St. bei 35-37°C / % di reazioni positive dopo 18-24 ore a 35-37°C /
% de las reacciones positivas después 18-24 horas a 35-37°C)

API LISTERIA	Vt.1	DIM	ESC	aMAN	DARL	DXYL	RHA	MDG	RIB	G1P	TAG
Listeria grayi		99	100	99	100	1	16	33	100	0	0
Listeria monocytogenes		0	100	98	97	0	98	100	0	5	0
Listeria innocua		99	100	98	100	2	65	98	0	0	0
Listeria seeligeri		97	100	5	99	99	0	99	0	0	0
Listeria ivanovii		88	100	0	99	97	4	99	33	91	0
Listeria welshimeri		90	100	96	100	98	76	99	0	0	97

Fabriqué par / Manufactured by bioMérieux sa

bioMérieux sa

BO MERIEUX SA au capital de 77 421 420 F

RCS LYON B 673 620 399

66280 Marcy-l'Étoile / France

tel. (33) 78 87 20 00 / fax (33) 78 87 20 90

bioMérieux Vitek, Inc.

595 Anclum Drive Hazelwood, MO 63042-2395 / USA

tel. 800-638-4855/314-731-8500 / fax 314-731-8900

Imprimé en / Printed in France

ANEXO 2

Tabela do Número Mais Provável para série de 3 tubos.
Fonte: PEELER et alii, 1992.

Table 1—Selected MPN Estimates and 95% Confidence Limits^a of Estimates for Fermentation Tube Tests When Three Tubes with 0.1-g, 0.01-g, and 0.001-g Volumes Are Used^a

0.1 g	No. of positive tubes/3 tubes			MPN/g ^b	95% confidence limits	
	0.01 g	0.001 g	Lower		Upper	
0	0	0	<3	—	—	
0	1	0	3+	<1	17	
1	0	0	4	<1	21	
1	0	1	7+	2	27	
1	1	0	7	2	28	
1	2	0	11+	4	35	
2	0	0	9	2	38	
2	0	1	14+	5	48	
2	1	0	15	5	50	
2	1	1	20+	7	60	
2	2	0	21	8	62	
3	0	0	23	9	130	
3	0	1	39	10	180	
3	1	0	43	10	210	
3	1	1	75	20	280	
3	2	0	93	30	380	
3	2	1	150	50	500	
3	2	2	210+	80	640	
3	3	0	240	90	1400	
3	3	1	460	100	2400	
3	3	2	1100	300	4800	
3	3	3	>1100	—	—	

^aNormal results, obtained in 95% of tests, are *not* followed by a plus. Less likely results, obtained in only 4% of tests, are followed by a plus. Combinations of positive tubes not shown occur in less than 1% of tests, and their frequent occurrence indicates that technique is faulty or that assumptions underlying the MPN estimate are not being fulfilled. MPN estimates for combinations that are not shown may be obtained by extrapolation (or by Thomas's formulae, Section 6.6) to the next highest combination that is shown in the table. For example, a result of 2, 0, 2 would have an MPN of approximately 20, which is the MPN for a more likely result of 2, 1, 1.

^bAll figures under "MPN/g" in this table may be multiplied by 100 for reporting "MPN/100 g."