

***Listeria monocytogenes* EM PRODUTOS FATIADOS
DO TIPO *READY-TO-EAT*, PRESUNTO COZIDO E
SALAME, COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE
SÃO PAULO: OCORRÊNCIA, QUANTIFICAÇÃO E
SOROTIPAGEM**

ELISABETE APARECIDA MARTINS

Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Prática de Saúde
Pública da Faculdade de Saúde Pública
da Universidade de São Paulo para
obtenção do Grau de Doutor.

Área de Concentração:
Prática de Saúde Pública.

**São Paulo
2009**

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores.

Assinatura:

Data:

Ao Mário,

Meu companheiro de todos os momentos, por todo incentivo constante e dedicação.

Ao meu filho, André,

Que é o meu maior aprendizado, faz com que eu questione algumas “certezas” e ainda me surpreenda com algumas descobertas.

Devemos navegar algumas vezes a favor do vento e outras contra ele – mas temos de navegar sempre, e não nos deixar levar pelo vento, nem jogar a âncora.

Oliver Wendell Holmes

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. Pedro Manuel Leal Germano, pela orientação, incentivo e oportunidade na realização deste trabalho acadêmico.

À Profa. Dra. Ivone Delazari, cujo conhecimento e dedicação, na área de segurança de alimentos, me levaram a seguir por este caminho.

À Profa. Sandra Heidtmann e equipe, por todo o suporte na realização das análises microbiológicas e pelo entusiasmo com o “mundo dos microrganismos”.

À Dra Dália dos Prazeres Rodrigues e equipe, da FIOCRUZ, pela realização da sorotipificação das cepas de *Listeria monocytogenes*.

À Profa. Dra. Isabel Cesaretti, pela dedicação na revisão deste trabalho e o carinho sempre presente.

À Profa. Dra. Izabel Simões Germano, pela contribuição com sugestões para a realização deste trabalho e pela presença sempre estimulante.

Aos meus familiares e amigos, que direta ou indiretamente contribuíram para que fosse possível a conquista desta etapa, através do estímulo constante.

RESUMO

Martins EA. *Listeria monocytogenes* em produtos fatiados do tipo *ready-to-eat*, presunto cozido e salame, comercializados no Município de São Paulo: ocorrência, quantificação e sorotipagem; 2008. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP]

A preferência por produtos prontos para consumo pode implicar em aumento do risco de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) e uma grande preocupação, nesse caso, é a presença da *Listeria monocytogenes*. A infecção por essa bactéria apresenta baixa taxa de morbidade, porém alta de mortalidade, representando maior risco para gestantes, idosos, crianças e indivíduos imunodeprimidos. Os produtos considerados de maior risco são aqueles prontos para o consumo, mantidos sob refrigeração e com longa vida útil. Face ao exposto, foi pesquisada a ocorrência de *L. monocytogenes* em dois grupos de produtos cárneos fatiados: presunto cozido e salame. Cento e trinta amostras de cada tipo de produto, adquiridas no comércio varejista do Município de São Paulo, foram submetidas a análises laboratoriais. Tais análises foram conduzidas em dois momentos: no terço inicial e no final de vida útil dos produtos. Nos casos de positividade, foram realizadas a quantificação e a sorotipagem da bactéria em cada um dos produtos, a fim de avaliar se os resultados obtidos poderiam oferecer risco à saúde. O salame apresentou prevalência significativamente maior para a *L. monocytogenes*, 6,2% (8/130), enquanto no presunto a prevalência foi de 0,8% (1/130). As contagens nas amostras de salame apresentaram valores entre <10 a 1900 UFC/g. Os sorotipos identificados, considerando os dois tipos de produtos, apresentaram as seguintes freqüências: 4b= 37,5% (3/8), 1/2b= 25% (2/8), 3b= 25% (2/8) e 1/2c= 12,5% (1/8). Os resultados encontrados permitem inferir que, para os produtos analisados, o risco de *listeriose* decorrente do consumo de salame é maior do que o associado ao consumo de presunto cozido.

Descritores: *Listeria monocytogenes*. Produto pronto para o consumo. Presunto Cozido. Salame.

SUMMARY

Martins EA. *Listeria monocytogenes* in sliced ready-to-eat products, cooked ham and salami, acquired from São Paulo retailing market: occurrence, quantification and serotyping. São Paulo; 2008. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

The preference for ready-to-eat products can raise the risk of diseases transmitted by food and in this case there is a main concern about the presence of *Listeria monocytogenes*. The infection caused by these bacteria presents low morbidity but high mortality rate, representing higher risk to pregnant, elderly, children and immunodepressed people. Products considered to have higher risk are the ready-to-eat kept under refrigeration and with longer shelf life. Considering this, it has been searched the occurrence of *L. monocytogenes* in two groups of sliced meat: cooked jam and salami. There were submitted to laboratorial analyses, to identification of *L. monocytogenes*, 130 samples of each product, acquired from São Paulo retailing market. Analyses were conducted in two times, in the starting third part life of product and in the end of shelf live. For the positive cases it was realized quantification and serotype from this bacterium, in order to evaluate if found results can offer risk to health. Salami has presented occurrence significantly higher for *L. monocytogenes*, 6.2% (8/130), while cooked jam has presented 0.8% (1/130). Counts of salami have shown results from <10 to 1900 CFU/g. Identified serotypes, considering both types of products, presented the following frequencies: 4b= 37,5% (3/8), 1/2b= 25% (2/8), 3b= 25% (2/8) e 1/2c= 12,5% (1/8). Presented results allow us to infer, to the tested products, that the risk of listeriosis from consuming salami is higher than the risk associate to consuming cooked jam.

Descriptors: *Listeria monocytogenes*. Ready -to-eat products. Cooked jam.Salami.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	<i>Listeria monocytogenes</i> – caracterização	2
1.2.	Listeriose: aspectos epidemiológicos	5
1.3.	<i>Listeria monocytogenes</i> : ocorrência em alimentos	10
1.4.	<i>Listeria monocytogenes</i> – Regulamentação	15
1.5.	Presunto e Salame – Caracterização	19
2.	OBJETIVOS	21
3.	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	Tipo e local do estudo	22
3.2	Amostragem	23
3.3	Análises laboratoriais	24
3.4.	Análises estatísticas	27
4.	RESULTADOS	29
4.1.	Ocorrência de <i>Listeria</i> spp e <i>Listeria monocytogenes</i> nas amostras de presunto	29
4.2.	Ocorrência de listéria no presunto versus Atividade de água (Aa)	30
4.3.	Ocorrência de <i>Listeria</i> spp e <i>Listeria monocytogenes</i> nas amostras de salame	31
4.4.	Ocorrência de listéria no salame versus Atividade de água (Aa)	35
4.5.	Ocorrência de <i>Listeria monocytogenes</i> : presunto versus salame	36
4.6.	Quantificação e sorotipificação da <i>Listeria monocytogenes</i> nas amostras de presunto e salame	37

5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÕES	50
7. REFERÊNCIAS	52

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A busca crescente da praticidade destaca-se dentre as principais tendências de consumo de alimentos, pois, em função da falta de tempo para o preparo das refeições, a característica praticidade tem sido, cada vez mais, valorizada pelos consumidores, e, nesse contexto, os alimentos prontos para o consumo (*ready-to-eat*) vêm ganhando espaço no cotidiano das pessoas (ACNIELSEN, 2004).

Um aspecto importante a se considerar nesse cenário de mudança de hábito alimentar, é a segurança do alimento no que se refere à sua inocuidade. É reconhecido que a maioria dos patógenos é destruída pelo tratamento térmico, porém em certos tipos de alimentos prontos para o consumo não se faz necessário nenhum tipo de aquecimento prévio, situação essa que pode elevar o risco de doenças transmitidas por alimentos (DTAs). Esse fato exige da cadeia produtora e distribuidora de alimentos a garantia de atendimento aos parâmetros microbiológicos até o momento do consumo.

Dentre os microrganismos associados às DTAs, destaca-se a *Listeria monocytogenes*. Essa bactéria foi reconhecida, inicialmente, como patógeno de importância na veterinária, em 1926, e como agente da listeriose humana, em 1929, mas somente na década de 1980 foi reconhecida como agente de DTA (UBOLDI-EIROA, 1990; GERMANO e GERMANO, 2008).

Vale ressaltar que foram divulgados no sítio do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (United States Department of Agriculture - USDA) os dados relativos ao recolhimento (“*Recall*”) de produtos prontos para o consumo, relativos ao período de 2000 a 2007. Do total de 574 casos de recolhimento de produtos do mercado, 30% ocorreu em função da presença da *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2008).

1.1 *Listeria monocytogenes* – caracterização

A *L. monocytogenes* é uma bactéria gram-positiva que não forma esporos. Essa bactéria cresce em temperatura de 0 a 45°C e em pH de 6 a 8, considerada a faixa ótima de crescimento, embora algumas pesquisas tenham demonstrado o seu crescimento em pH de 4,1 a 9,6. Pode crescer em atividade de água (Aa) inferior a 0,93, e resiste bem aos efeitos do congelamento e secagem, ao tratamento com nitrato de sódio (120mg/Kg) e cloreto de sódio (3%), a literatura preconiza que a pasteurização é suficiente para destruí-la (FORSYTHE, 2002; JAY,2005; GERMANO e GERMANO, 2008). Entretanto, existem publicações que sugerem a sobrevivência da *L. monocytogenes* ao processo de pasteurização (FLEMING E COL, 1985; DOYLE E COL, 1987; GARAYBAZAL E COL, 1987). FLEMING e colaboradores (1985) relatam um surto de listeriose ocorrido em 1983, no qual foi identificado, durante a investigação, que em uma das fazendas que

forneceu leite ao processador, haviam ocorrido casos de listeriose bovina,. Relataram ainda, que todos os registros da pasteurização indicavam atendimento dos parâmetros de processo. DOYLE e colaboradores (1987) inocularam *L.monocytogenes* em animais, e o leite proveniente destes foi pasteurizado com dois protocolos diferentes, sendo que em um dos protocolos houve a sobrevivência da bactéria. No terceiro estudo, GARAYBAZAL e colaboradores (1987) inocularam diferentes concentrações de *L.monocytogenes* no leite e o submeteram a pasteurização, com temperaturas entre 69 a 73°C. A bactéria foi isolada em 46,6% das amostras, porém em nenhuma que tenha submetida a pasteurização a 73°C. O ICMSF (1996) cita que a menos que a contagem inicial seja muito alta ($10^5 - 10^6$ UFC/mL) a *L. monocytogenes* não deveria sobreviver a uma pasteurização comercial (71°C por 15s), entretanto a mesma referência cita como valor de resistência térmica da bactéria, para o leite integral, o $D_{71.7^\circ\text{C}} = 0,9\text{s}$ (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS, 1996). Sendo o valor D o tempo em uma dada temperatura necessário para destruição de um ciclo log do microrganismo (JAY, 2005), não está claramente definido na literatura as características que afetam a resistência térmica da bactéria no leite.

São reconhecidas seis espécies de listéria: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* e *L. grayi*, sendo a principal espécie patogênica a *L. monocytogenes* (JAY, 2005; GERMANO e GERMANO, 2008).

A importância da *L. monocytogenes*, como a única espécie do gênero listéria de interesse para a saúde humana, é reiterada por KATHARIOU (2002), em particular para os produtos resfriados prontos para o consumo, onde não será necessário cozimento ou reaquecimento.

São doze os sorotipos de *L. monocytogenes* que podem causar doenças, entretanto, 95% das cepas isoladas de casos de listeriose humana envolvem três sorotipos: 1/2a, 1/2b e 4b. A ocorrência destes sorotipos em casos de doenças tem sido documentada em pesquisas de diferentes países. Vários casos de listeriose indicam alta ocorrência do sorotipo 4b, variando de 50 a 70%; por outro lado, estudos sugerem que o 4b não é o principal sorotipo isolado dos alimentos. Segundo o autor essa discrepância entre a ocorrência da bactéria no alimento e a ocorrência da doença pode sugerir que o sorotipo 4b é mais virulento que os demais sorotipos (KATHARIOU, 2002). O fato do sorotipo que provoca a doença não ser o mesmo encontrado em alimentos implicados em surtos também foi descrito por ARRUDA e colaboradores (2007), que atribuíram a ausência de correlação à diferença de capacidade e sobrevivência de determinados sorotipos no alimento.

Outros autores também citam os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b como os mais prevalentes nos casos de listeriose humana. Afirmam que os três sorotipos são responsáveis por mais de 90,0% dos casos, sendo que o sorotipo 4b está associado a mais de 50,0% dos casos de listeriose em todo o mundo e parece ser mais virulento que os demais (CAMPOS 2005; JAY 2005).

A *L. monocytogenes* é um microrganismo que exige especial atenção em locais de processamento de alimentos, devido a algumas peculiaridades que propiciam sua ocorrência, dentre as quais se destacam: a) ser ubiqüista, b) sobreviver no meio ambiente mesmo em condições adversas, e com o mínimo de nutrientes, c) ter a capacidade de multiplicar-se sob temperaturas de refrigeração; d) ser tolerante a altas concentrações de sal e pHs relativamente baixos (CAMPOS, 2005).

Confirmando o que foi dito anteriormente, GANDHI e CHIKINDAS (2007), citando Rocourt e Cossart (1997) em "*Listeria: A food-borne pathogen that knows how to survive*", mencionam que a *L. monocytogenes* apresenta habilidade de adaptação a condições adversas tais como: baixas temperaturas (2 a 4 °C), pH ácido e alto teor de sal.

A *L. monocytogenes* pode sobreviver em vários tipos de superfície de contato, portanto existe o risco de contaminação cruzada nos ambientes e equipamentos de processamento (JEMMI e STEPHAN, 2006).

1.2. Listeriose: aspectos epidemiológicos

A listeriose é, reconhecidamente, um problema de saúde pública. Sua taxa de mortalidade chega a 70% em casos de meningite, 50% nos casos de septicemia e superior a 80% em casos de infecção neonatal (FORSYTHE, 2002; GERMANO e GERMANO, 2008). O grau de severidade da infecção realça a necessidade de se minimizar a exposição à *L. monocytogenes* da

população considerada de alto risco, como gestantes, crianças, idosos e pessoas com o sistema imune comprometido (TOMPKIN, 2002).

Segundo LENHART e colaboradores (2008) a chance de uma gestante ser infectada por *L. monocytogenes* é quatorze vezes maior do que uma não gestante pertencente à população saudável, sendo que este aspecto está associado à redução do mecanismo de imunidade requerida para manter a gravidez.

A listeriose tem como agente causal a *L. monocytogenes*, e a quantidade mínima de bactérias capaz de gerar a doença não está claramente definida, visto que pode variar em função da linhagem e da susceptibilidade do indivíduo exposto. THOMPSON (2002) relata que os alimentos implicados em casos ou surtos de listeriose apresentavam níveis superiores a 1000 UFC/g ou mL. FORSYTHE (2002) afirma que menos de mil organismos podem causar a doença, enquanto JEMMI e STEPHAN (2006) citam contagens entre 10^2 a 10^9 UFC/g.

A listeriose tem um longo período de incubação, podendo chegar a 90 dias, o que dificulta a identificação do patógeno e o rastreamento para a identificação do alimento contaminado que tenha causado a doença (FORSYTHE, 2002; GANDHI e CHIKINDAS, 2007).

As principais formas clínicas de listeriose indicam que a bactéria apresenta tropismo para a placenta e para o sistema nervoso central, podendo ocasionar as seguintes doenças: infecção na gestação, infecção neonatal, bacteremia, meningites, abscessos cerebrais, endocardites, infecções localizadas e gastroenterite (CAMPOS, 2005). Por outro lado,

FORSYTHE (2002) relata que as infecções podem ocorrer sem manifestação de sintomas, ocorrendo a eliminação das bactérias pelas fezes, visto que cerca de 1% das amostras fecais e 94% das amostras de esgoto são positivas para *L. monocytogenes*. ARRUDA e colaboradores (2007) citam a estimativa de que 1,0% a 10,0% da população seja portadora intestinal de *L. monocytogenes*.

O diagnóstico da listeriose é realizado a partir do isolamento da bactéria no sangue, no fluido cerebrospinal, na placenta e no feto. São manifestações da listeriose: meningite, encefalite e septicemia. No caso de mulheres grávidas, quando infectada no segundo e terceiro trimestres, pode levar ao abortamento, nascimento de feto prematuro ou morto (FORSYTHE, 2002; GERMANO e GERMANO, 2008).

A análise de dados de incidência de listeriose na Europa demonstrou que na Suécia, no período de 2000 a 2001, a incidência passou de 5,9 para 7,5 casos por milhão de pessoas. Em outros países como Bélgica, Dinamarca, Inglaterra, País de Gales e Finlândia, a incidência média, em 2006, foi de 4,7 casos por milhão de pessoas. Na França, no período de 1999 a 2005, houve um decréscimo na incidência de 4,5 para 3,5 casos por milhão de pessoas, mas, no ano de 2006, houve um aumento para 4,7 casos por milhão (GOULET e col, 2008).

Segundo os mesmos autores, avaliando os dados relativos à França, o aumento da incidência de listeriose pode estar associado à redução do teor de sal nos produtos prontos para consumo. Tal hipótese foi levantada em função da Agência Francesa de Segurança de Alimentos ter

recomendado a redução de 20% na ingestão de sal nos últimos cinco anos. Conseqüentemente, as indústrias de alimentos reduziram o sal de seus produtos, o que pode ter levado ao aumento da incidência da listeriose em pessoas mais susceptíveis. Os autores afirmam que para verificar essa hipótese, a partir de 2008, as pesquisas irão incluir, além da frequência, a quantificação da *L. monocytogenes* (GOULET e col., 2008).

A listeriose é doença de notificação obrigatória na Alemanha desde 2001. De 2001 a 2005, foram relatados 1519 casos, sendo constatado aumento da incidência, pois de 2,6 casos em 2001 passou para 6,2 por milhão de pessoas, em 2005. Destaca-se que o aumento foi observado, principalmente, em neonatos e em adultos com idade maior ou igual 70 anos (KOCH e STARK, 2006).

Nos Estados Unidos, a incidência de listeriose declinou de 4,1 para 2,3 casos por milhão de pessoas, no período de 1996 a 2003. No entanto, foi observada elevação da incidência nos anos de 2005 e 2006, com 3,0 e 3,1 casos por milhão de pessoas, respectivamente (GOULET e col, 2008).

No Brasil, o Ministério da Saúde estabeleceu a Lista Nacional de Doenças e Agravos de Notificação Compulsória, através da Portaria 05/2006, e a listeriose não consta explicitamente como tal. A notificação dessa doença pode ser realizada com base no artigo 2º da referida Portaria, onde consta que: “a ocorrência de agravo inusitado, caracterizado como a ocorrência de casos ou óbitos de doença de origem desconhecida ou alteração no padrão epidemiológico de doença conhecida, independente de

constar na Lista Nacional de Agravos de Notificação Compulsória, deverá também ser notificada às autoridades sanitárias” (BRASIL, 2006).

Por outro lado, o Centro de Vigilância Epidemiológica de São Paulo, entre as medidas de controle da listeriose, orienta que a ocorrência de surtos requer a notificação imediata às autoridades de vigilância epidemiológica municipal, regional ou central (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO, 2003).

São escassas as publicações sobre a incidência de listeriose no Brasil. GERMANO e GERMANO (2008) inferem que os poucos relatos podem ser atribuídos ao elevado nível de subnotificação de DTAs ou as dificuldades de diagnóstico. Nesse contexto, destaca-se o estudo de HOFER e colaboradores (2006) que analisaram 245 amostras de *L. monocytogenes*, isoladas de material clínico humano, no período de 1969 a 2000, provenientes de várias regiões do Brasil. Foram identificados sete sorotipos com as seguintes frequências: 4b (60,3%), 1/2a (29,0%), 4ab (2,7%), 1/2b (2,4%), 4a (0,8%), 1/2c (0,4%) e 3a (0,4%).

Em outro estudo, FRANCESCATO e colaboradores (2002) avaliaram, no período de julho de 1998 a julho de 2000, 808 resultados positivos de patógenos emergentes relacionados com DTAs, isolados de amostras de sangue, fezes, líquido e lavado gástrico e registrados por laboratórios de análises clínicas e de microbiologia dos municípios de Botucatu, Marília e dos distritos de São Paulo. Do total de 460 resultados positivos para a presença de bactérias, somente um caso foi relativo à presença de *Listeria*, registrado no município de São Paulo. A distribuição dos demais resultados

por tipo de bactérias encontradas foi: *E. coli* (78,7%), *Salmonella spp* (15,7%), *Shigella* (5,2%) e *Listeria monocytogenes* (0,2%).

Ainda no Brasil, no estudo de dez placentas provenientes de abortamentos, ou partos prematuros, ocorridos no ano de 2000, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e conduzido através do método de imunohistoquímica, observou-se que cinco dessas placentas foram positivas para a presença de *L. monocytogenes* (SCHWAB e EDELWEISS, 2003).

1.3. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em alimentos

Qualquer tipo de alimento fresco, de origem vegetal ou animal, pode apresentar *L. monocytogenes* em números variados. A bactéria tem sido detectada em: leite cru, queijo mole, carnes frescas ou congeladas, aves, frutos do mar, frutas e vegetais. A *L. monocytogenes* tem sido considerada como um patógeno de mais de 50 mamíferos, incluindo os humanos, aves silvestres, peixes e crustáceos, caracterizando que a transmissão zoonótica é relevante. Não pode ser descartada a possibilidade de animais e humanos saudáveis serem portadores da bactéria (JAY, 2005).

GERMANO e GERMANO (2008) relacionam o isolamento da bactéria em uma grande variedade de alimentos, tais como: produtos lácteos, leite cru ou pasteurizado, sorvetes e queijos, produtos cárneos crus ou termoprocessados, peixes, além de produtos de origem vegetal.

Diversos alimentos têm sido implicados em casos e surtos de listeriose, porém alguns tipos apresentam maior importância como

veiculadores de *L. monocytogenes*. Os produtos prontos para consumo, estocados sob refrigeração e com longa vida de prateleira são considerados os de maior risco. Os alimentos com contagens do patógeno, superiores a 100 unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) ou 100 por mililitro (UFC/mL), também, são considerados de alto risco (SAKATE e col, 2003).

De acordo com AGUADO e colaboradores (2004), o risco de transmissão de listeriose por vegetais é considerado baixo, em função da baixa ocorrência do agente nesse tipo de alimento. Tal afirmação é corroborada por pesquisas conduzidas em Portugal e no Japão nas quais a totalidade de amostras analisadas de vegetais, 23 e 285 respectivamente, foi negativa para a presença de *L. monocytogenes* (GUERRA e col, 2001; INOUE e col, 2000).

GANDHI e CHIKINDAS (2007) afirmam que a contaminação dos alimentos pode ocorrer em qualquer etapa do processamento. Dados de vigilância demonstram que a contaminação pós-processamento tem sido a maior causa dos surtos, sendo que as fontes de re-contaminação identificadas foram: ingredientes crus, não processados e adicionados a produtos finais, superfícies de contato com alimentos e ambientes, falhas na manipulação e na embalagem.

INOUE e colaboradores (2000) pesquisaram a presença de *L. monocytogenes* em amostras de alimentos do varejo no Japão. Foram encontradas positivities de 12,0% (5/41) a 37,0% (17/46) em amostras de carne moída de bovinos, suínos e frango, sendo a maior positividade (37,0%) detectada nas amostras de carne moída de frango. A bactéria foi

pesquisada, também, em salmão defumado, que apresentou 5,4% (5/92) de positividade. As amostras de carne moída de frango apresentaram número mais provável (NMP) superior a 100/g e as de salmão defumado, NMP menor que 10/g. Com base nos resultados, os autores concluíram pelo baixo risco no grupo de amostras analisadas, visto que as carnes usualmente são cozidas antes do consumo e os valores da quantificação da bactéria no salmão defumado estavam abaixo do nível que representa risco para a saúde. Os sorotipos 1/2a e 1/2b foram isolados para todos os tipos de produtos.

Na Dinamarca, nos anos de 1994 e 1995, foram realizadas análises para identificar e quantificar a *L. monocytogenes* em amostras de alimentos prontos para consumo: produtos cárneos tratados pelo calor, produtos cárneos preservados e produtos de peixe. Os produtos cárneos preservados apresentaram ocorrência de 23,5% (77/328) dessa bactéria. Na quantificação, 1,8% (6/328) das amostras apresentavam níveis da bactéria entre 10 e 100 UFC/g, e somente 0,6% (2/328) tiveram resultados maiores que 100/g de *L. monocytogenes*. Por outro lado, os produtos cárneos tratados pelo calor apresentaram contaminação menor, 5,0% (45/772) de positividade, e o percentual de amostras com resultados maiores que 100/g para este tipo de bactéria foi de 1,4% (11/772). Com base nesses resultados, os pesquisadores discutiram a possibilidade de os tipos de produtos cárneos preservados, em função das suas características intrínsecas, oferecerem limitado potencial para o crescimento da bactéria e que a sua microbiota natural propicia o controle do crescimento da *L.*

monocytogenes. Quanto aos produtos tratados por calor, os resultados sugeriram que a eliminação da microbiota, ocasionada pelo tratamento térmico, pode melhorar as condições para o crescimento da bactéria (NORRUNG e col, 1999), ou seja, o estudo indicou que a bactéria multiplica-se melhor em condições com reduzida microbiota competitiva.

Também VITAS e GARCIA-JALON (2004), em trabalho realizado na Espanha, relataram a positividade de 36,1% (57/158) para *L. monocytogenes* em carne de frango crua. Os autores ressaltaram que a alta ocorrência de contaminação da carne crua não representa um risco elevado de transmissão da infecção, visto que os produtos serão submetidos a tratamento térmico antes do consumo e o agente é sensível aos tempos e temperaturas comumente utilizados para a cocção e a pasteurização dos alimentos. Quanto aos produtos cárneos prontos para consumo, os cozidos apresentaram positividade de 8,8% (35/396), enquanto nos curados a ocorrência foi de 6,7% (23/345).

A ocorrência de *L. monocytogenes* foi pesquisada em amostras de diversos tipos de alimentos e de ambientes de produção na Itália, no período de 1990 a 1999. Também foi realizada a sorotipagem das amostras. Nesse estudo, os produtos cárneos tiveram positividade de 17,3% (306/1777), sendo os sorotipos mais frequentes: 1/2c (35%), 1/2a (29,4%) e 1/2b (18%) (GIANFRANCESCHI e col, 2003).

O monitoramento das taxas de ocorrência de *L. monocytogenes*, realizado pelo Serviço de Inspeção e Segurança de Alimentos (*Food Safety and Inspection Service* – FSIS), órgão do governo norte americano, no

período de 1989 a 1999, revelou os seguintes resultados: 2,0% a 3,0% em carne bovina cozida, 2,0% a 5,0% em salsichas de diâmetro pequeno, 1,0% a 3,0% em carne de aves, cozida e 1,0% a 5,0% em saladas com carnes. Nesse mesmo estudo, a ocorrência em produtos cárneos fatiados, no período de 1994 a 1999, variou de 4,2% a 7,8% (TOMPKIN, 2002).

Outra pesquisa com oito categorias de produtos prontos para o consumo, conduzida também nos Estados Unidos, apresentou ocorrência de 1,8% (577/31.705) para *L. monocytogenes*, com positividade variando entre 0,2% a 4,7%, em função da categoria do produto (GOMBAS e col, 2003).

Estudos realizados em Portugal, no período de 1998 a 2000, com produtos prontos para consumo e alimentos não processados, evidenciaram 9,0% (39/429) de positividade de *L. monocytogenes* para o total de amostras, sendo que os tipos que apresentaram maior positividade foram: 25,0% (16/65) frango cru, 24,0% (8/34) queijos e 21,0% (10/47), produtos cárneos prontos para consumo (GUERRA e col, 2001).

CORDANO e ROCOURT (2001) pesquisaram a presença de *L. monocytogenes* em amostras recebidas para controle de rotina no Instituto de Saúde Pública do Chile, no período de 1990 a 1997. Nesse período, foram analisadas 634 amostras de produtos cárneos processados, sendo que 3,6% destas foram positivas.

No Brasil, em pesquisa conduzida com quatro tipos de salames de diferentes marcas comerciais, a ocorrência de *L. monocytogenes* foi de 13,3%, e os autores afirmam que para esse tipo de produto a positividade pode variar de 5,0% a 23,0% (BORGES e col, 1999).

Em outro trabalho, realizado com dois tipos de produtos formulados com carne de peru: presunto e *blanquet*, a análise de *L. monocytogenes* foi efetuada em produtos inteiros, adquiridos em sua embalagem original, e nos mesmos tipos de produtos, fatiados em estabelecimento comercial. As análises dos produtos inteiros não apresentaram a bactéria; mas no caso dos produtos fatiados, a positividade foi de 60,0% (6/10) para o presunto e 50,0% (5/10) para o *blanquet* (ARAÚJO e col, 2002).

Na mesma linha, SAKATE e colaboradores (2003) investigaram a presença da *L. monocytogenes* em diferentes tipos e marcas de salames, fatiados e comercializados, na cidade de São Paulo (Brasil), e detectaram a ocorrência de 6,7% (3/45) dessa bactéria, sendo a população de 9,2 NMP/g para todas as amostras positivas. Os sorotipos isolados foram o 1/2a e o 1/2b.

1.4. *Listeria monocytogenes* – Regulamentação

A maioria dos países possui regulamentação específica para o controle da *L. monocytogenes* nos alimentos. Os Estados Unidos adotam a política de “tolerância zero”, de modo que a presença da *L. monocytogenes* em 25g de qualquer tipo de alimento pronto para o consumo é considerada como inaceitável, caracterizando-o como impróprio para o consumo. Em suma, não faz distinção entre alimentos contaminados, seja com baixos ou altos níveis (CHEN e col, 2003). Tal critério foi adotado pela maioria dos países, porém, atualmente, observa-se que o mesmo passou a ser definido

com base em análises de risco. Nessa situação, são estabelecidos valores para contagens máximas, ou ausência, por tipos de alimentos, classificados em função de suas características propiciarem ou não o crescimento da bactéria, e também em função do público alvo que irá consumi-los. Um exemplo desse tipo de critério é o Regulamento da Comissão das Comunidades Europeias (REGULAMENTO CE N° 2073, 2005).

A Comissão das Comunidades Europeias, através do Regulamento CE 2073 (2005), alterado em dezembro de 2007 pelo Regulamento CE 1441 (2007), estabeleceu que para os alimentos prontos para o consumo a presença da bactéria deve ser inferior a 100 UFC/g. Este critério aplica-se aos produtos colocados no mercado durante todo o seu período de vida útil, para os alimentos não susceptíveis e susceptíveis ao crescimento de *L. monocytogenes*. Observando-se que, no caso dos produtos susceptíveis ao crescimento da bactéria, existe também o critério de ausência em 25g na saída do processamento. Os produtores são responsáveis por comprovar que esse padrão está sendo atendido durante toda a vida útil do alimento, até o momento do consumo. O mesmo regulamento estabelece maior rigor para alimentos destinados a lactentes e para fins medicinais, onde é exigida a ausência da bactéria em 25g ou ml.

Na Dinamarca tolera-se que duas em cinco amostras de alimentos prontos para o consumo possam conter entre 10 e 100 UFC/g de *L. monocytogenes*, mas nenhuma amostra poderá exceder a 100 UFC/g (EUROPEAN COMMISSION SCIENTIFIC COMMITTEE, 1999).

A contagem estabelecida na regulamentação europeia é frequentemente citada na literatura, onde alimentos com contagens do patógeno, superiores a 100 unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) ou 100 por mililitro (UFC/ml) são considerados de alto risco. Atualmente, não é possível manter a pesquisa e o controle da *L. monocytogenes* apenas com base na presença ou ausência, fazendo-se necessária a quantificação da bactéria. Alguns estudos abordam a quantificação assim como a sorotipagem da cepa isolada. (FORSYTHE, 2002; SAKATE e col, 2003; JEMMI & STEPHAN, 2006).

No Canadá, alimentos prontos para o consumo que não têm sido associados a surtos de listeriose e que não permitem o crescimento de *L. monocytogenes* durante 10 dias sob refrigeração, podem conter até 100 UFC/g de *L. monocytogenes* sem se constituir uma infração legal (HEALTH CANADA, 2004).

No Brasil, os padrões microbiológicos para alimentos, estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) número 12, de 2 de janeiro de 2001, definem a ausência de *L. monocytogenes* em 25g somente para os queijos. Para os demais produtos prontos para o consumo não são contemplados limites específicos para essa bactéria (BRASIL, 2001).

O recolhimento (“recall”) de produtos prontos para o consumo, em função da detecção de *L. monocytogenes*, está regulamentado nos Estados Unidos na Diretiva 8080 do Serviço de Inspeção e Segurança de Alimentos (FSIS), no qual são estabelecidas as classes de “recall” em função do risco

envolvido. A presença de patógenos em alimentos prontos para o consumo enquadra-se em “*Recall*” Classe I, onde existe uma probabilidade do uso do produto vir a ocasionar riscos ou conseqüências adversas à saúde, inclusive morte (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2004).

ROCOURT e colaboradores (2003) ressaltam que o enfoque do controle da *L. monocytogenes* está relacionado aos alimentos prontos para o consumo e que a Organização Mundial da Saúde e a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentos, através de avaliações de riscos microbiológicos, têm procurado estabelecer um nível aplicável internacionalmente para a presença da bactéria no alimento. Três questões relacionadas aos alimentos prontos para o consumo em geral são consideradas na avaliação de riscos: a) a estimativa de riscos para os consumidores de diferentes grupos susceptíveis (idosos, primeira infância, gestantes e imunocomprometidos) e a população em geral; b) estimativa do risco da *L. monocytogenes* em alimentos que propiciam e não propiciam o crescimento sob específicas condições de estocagem e de vida de prateleira e; c) a estimativa do risco da *L. monocytogenes*, considerando a variação do número de organismos, desde ausência em 25g até 1.000 UFC/g ou por ml, ou o fato de não exceder um determinado nível específico no ponto de consumo. Dados preliminares indicaram que a eliminação de altos níveis no ponto de consumo tem um grande impacto no número de casos.

Vista a caracterização da bactéria, sua ocorrência em alimentos e a revisão dos aspectos epidemiológicos, enfatiza-se que, apesar da importância da *L. monocytogenes* em produtos prontos para o consumo,

poucas pesquisas foram realizadas no Brasil sobre a ocorrência do patógeno em produtos cárneos, fatiados e prontos para o consumo, sejam estes cozidos ou submetidos a outras formas de preservação. Por essa razão, para o presente estudo, foram selecionados dois tipos de produtos cárneos prontos para o consumo: presunto e salame fatiados.

1.5. Presunto e Salame – Caracterização

O presunto e salame, embora submetidos a diferentes tipos de processamento na indústria, são produtos prontos para o consumo. Um deles é submetido ao processo de cozimento, enquanto o outro é fermentado e maturado. Ambos são fatiados e embalados a vácuo na indústria, ou seja, não existe o risco de contaminação cruzada no varejo.

Segundo a definição do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), presunto cozido é um produto cárneo industrializado obtido, exclusivamente, com o pernil de suínos, desossado, adicionado de ingredientes e submetido a um processo de cozimento. Portanto, o mesmo é classificado como produto cozido (BRASIL, 2000 a).

Salame é o produto cárneo industrializado, obtido de carne suína ou suína e bovina, adicionado de toucinho e ingredientes, embutido em envoltórios naturais e /ou artificiais, curado, fermentado, maturado, defumado ou não, e dessecado. É classificado como produto cru, curado, fermentado, maturado e dessecado, e, em função da sua origem, ou do processo de obtenção, pode ser classificado em mais de sete tipos. A

atividade de água máxima do produto pode variar entre 0,90 a 0,92, em função do tipo de salame (BRASIL, 2000b).

Outro aspecto bastante relevante para a seleção dos produtos para o presente estudo ancora-se no fato de que os mesmos são mantidos à temperatura de refrigeração e possuem vida de prateleira igual ou superior a 30 dias.

Considerando que a *L. monocytogenes* está distribuída, de forma ampla, no ambiente, que a mesma apresenta crescimento em temperaturas de refrigeração e que sua presença está associada a alimentos que são mantidos sob refrigeração por longos períodos, é de suma importância o conhecimento da ocorrência da bactéria no presunto e no salame, comercializados no comércio varejista (super e hipermercados) do município de São Paulo. Além da ocorrência, quantificar a bactéria nas amostras positivas também é de suma importância, visto que os produtos prontos para o consumo não serão submetidos a nenhum tipo de aquecimento antes da ingestão. Assim o conhecimento desses resultados é de relevante utilidade para quem processa os alimentos, além de contribuir, direta ou indiretamente, para a saúde dos consumidores desses produtos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Objetivo geral: Pesquisar a ocorrência de *Listeria monocytogenes* em amostras de produtos fatiados do tipo pronto para o consumo (*ready-to-eat*), presunto cozido e salame, comercializados no município de São Paulo.

Objetivos específicos:

1. determinar o número de amostras positivas de presunto fatiado, para *L. monocytogenes*, em dois momentos de vida de prateleira;
2. correlacionar a Atividade de água (A_a) com a ocorrência de *L. monocytogenes*, nas amostras de presunto fatiado;
3. determinar o número de amostras positivas de salame fatiado, para *L. monocytogenes*, em dois momentos de vida de prateleira;
4. correlacionar a Atividade de água (A_a) com a ocorrência de *L. monocytogenes*, nas amostras de salame fatiado;
5. quantificar em Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC/g) as amostras positivas de presunto e salame fatiados;
6. sorotipar as colônias de *L. monocytogenes* isoladas das amostras positivas de presunto e salame fatiados;
7. analisar se a ocorrência de *L. monocytogenes*, os resultados de quantificação e os sorotipos identificados podem representar risco à saúde do consumidor.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Tipo e local do estudo

Trata-se de um estudo descritivo transversal, no qual os dados de identificação dos locais, onde foram adquiridas as amostras, bem como dos fabricantes dos produtos foram codificados e serão mantidos em sigilo, atendendo aos requisitos éticos.

As amostras foram adquiridas no comércio varejista (super e hipermercados) do município de São Paulo, e de marcas comerciais mais freqüentemente disponíveis para a comercialização nestes estabelecimentos, nos anos de 2006 e de 2007. Somente foram analisados produtos fatiados e embalados pela indústria, ou seja, produtos embalados a vácuo, processados em estabelecimentos registrados no Serviço de Inspeção Federal.

Os produtos apresentavam indicações de temperatura máxima de conservação de 4°C e 5°C, para estocagem. Todos eles foram mantidos em temperatura de 4°C, em função da disponibilidade de estufa para vida de prateleira e atendendo à indicação máxima da temperatura de estocagem estabelecida pelos fabricantes. Observou-se que nas embalagens dos produtos também constava a temperatura de exposição que, no caso dos produtos envolvidos neste estudo, variavam de 8°C a 9°C. A opção por manter as amostras na temperatura de estocagem e não na temperatura de

exposição deveu-se ao fato de não haver informações que permitissem a simulação do período de tempo que estes produtos ficam expostos à venda. As análises foram realizadas observando-se o prazo de validade estipulado pelos diferentes fabricantes.

A amostra foi constituída de dois tipos de produtos cárneos, fatiados: produtos cozidos, representados pelo presunto cozido e produtos curados crus, representados pelos salames.

As análises para a verificação da presença de *L. monocytogenes*, tanto para o presunto como para o salame, foram conduzidas em dois momentos: no primeiro terço da vida útil do produto (vida útil inicial) e na última semana de expiração do prazo de validade do produto (vida útil final).

Foram três as marcas avaliadas para o presunto (Ap, Bp e Cp) e quatro as marcas avaliadas para o salame (As, Bs, Cs e Ds). A codificação para as marcas de presunto e salame não é coincidente, ou seja, a marca A de presunto não corresponde à mesma marca de salame.

Os presuntos analisados tinham prazo de validade de 30 e 45 dias e os salames, vida útil de 45, 60 e 90 dias. A vida de prateleira dos produtos foi definida pelos fabricantes e constava nas embalagens do produto.

3.2 Amostragem

O tamanho da amostra considerado para estimar a ocorrência da *L. monocytogenes*, nos dois produtos selecionados para o estudo (presunto e salame) foi de 130 unidades amostrais, divididas em partes iguais: 65 para

cada um deles. Esse cálculo foi feito considerando-se um nível de significância α de 5,0% e o poder de 80,0% para detectar um *effect size* de 0,14 em tabelas com 2 graus de liberdade (COHEN, 1988). As amostras foram adquiridas em duplicada, a fim de conduzir as análises dos produtos no início e no final da vida útil. Portanto, ao final do estudo foram avaliadas 260 amostras.

A distribuição do número de amostras por marca avaliada foi aleatória, conforme a disponibilidade do tipo de produto e marca nos hipermercados e o prazo de validade compatível com o estabelecido no estudo, primeiro terço da vida útil.

As amostras foram coletadas, mensalmente, no decorrer do ano de 2006 e primeiro semestre de 2007, acondicionadas em recipientes isotérmicos com gelo reciclável e transportadas até o laboratório. Foram coletadas sempre em grupos de 10 amostras de diferentes fabricantes, sendo que a metade das amostras era analisada de imediato e o restante era mantido sob refrigeração, de acordo com a temperatura recomendada pelo fabricante, para ser analisada no final da vida útil.

3.3 Análises laboratoriais

Foram realizadas análises qualitativas para *Listeria* spp e, no caso de positividade, foi realizada a pesquisa para *L. monocytogenes*. As amostras positivas para *L. monocytogenes* foram direcionadas para quantificação, a fim de se estabelecer uma correlação com os limites máximos permitidos

para a presença desse microrganismo em alimentos prontos para o consumo, definidos em legislações vigentes em outros países. Os ensaios foram realizados segundo a metodologia descrita pela *International Standard*, ISO 11290-1 e ISO 11290-2.

Para detecção da *L. monocytogenes* foram seguidos os procedimentos da ISO 11290-1 (INTERNATIONAL STANDARD, 1996 e 2004a), que compreendem as seguintes etapas: pesagem de 25 gramas do produto e adição de 225mL do caldo de enriquecimento primário (Half-Fraser), homogeneização e incubação a 30° C, por 24 horas. Depois da incubação, 0,1 mL do caldo foi transferido para um tubo, contendo 10 mL do meio de enriquecimento secundário (caldo Fraser) e incubado a 37°C por 48 horas.

Após o período de incubação do caldo de enriquecimento secundário, os tubos foram agitados e, com o auxílio de uma alça de platina estéril, alíquotas foram transferidas e estriadas na superfície dos agares ALOA, Palcam e Oxford, com o objetivo de obter colônias isoladas. As placas foram incubadas em temperatura de 37°C por 24-48 horas.

Após o crescimento nos agares, foram selecionadas pelo menos 5 colônias com características fenotípicas de *Listeria* spp, as quais foram transferidas para tubos contendo ágar Trypticase de soja, acrescido de extrato de levedura (TSAye) e incubados por 18-24 horas a 37°C.

Para confirmação de *Listeria* spp foram realizadas as provas de catalase e motilidade e coloração de Gram e para a confirmação de *L. monocytogenes* foram adicionados os testes de verificação de hemólise,

CAMP teste (Christie, Atkins, Munch-Paterson) e teste de fermentação de açúcares.

Todas as amostras confirmadas para *L. monocytogenes* foram submetidas ao teste de quantificação, segundo a Norma ISO 11290-2 (INTERNATIONAL STANDARD, 2004b), onde 25 gramas de cada amostra foram pesadas, homogeneizadas com água peptonada ou caldo Half Fraser sem suplementos, mantidas por 1 hora em temperatura ambiente (próxima a 20°C) e, na seqüência, semeadas em duplicata, volumes de 0,3 mL, 0,3 mL e 0,4 mL, na superfície de 3 placas de ágar ALOA e 3 de ágar Oxford, totalizando um volume final de 1 mL. Essas placas foram incubadas por 18-24 horas a temperatura de 37°C, e, quando não apresentaram crescimento nesse período, foram re-incubadas por mais 24 horas. Quando houve presença de colônias suspeitas, foram realizadas confirmações bioquímicas, conforme descrito anteriormente.

Ao final do procedimento foram efetuados os cálculos para a enumeração do microrganismo, sendo utilizadas as informações do número de colônias confirmadas, número de colônias submetidas à confirmação e número total de colônias características no ágar. Esses dados foram utilizados em fórmulas matemáticas específicas, conforme preconizado pela Norma ISO 11290-2 (INTERNATIONAL STANDARD, 2004b), sendo os resultados expressos em unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g)

As colônias confirmadas de *L. monocytogenes* foram encaminhadas para sorotipagem no laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento

de Bacteriologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), que realizou os testes utilizando antissoros específicos para as frações somáticas e flagelares, segundo SEELIGER e HÖHNE (1979).

Esse procedimento foi realizado com o objetivo de estabelecer a correlação dos sorotipos presentes nos produtos com os sorotipos de maior patogenicidade.

Adicionalmente, após a realização da pesquisa de *Listeria* spp, as amostras também foram submetidas à análise de atividade de água (Aa), através do Aqualab CX2 (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, USA).

Essas análises foram realizadas com o objetivo de correlacionar os resultados de presença de listéria em diferentes níveis de Aa.

3.4. Análises estatísticas

A análise estatística dos resultados obtidos foi, inicialmente, feita de forma descritiva. Para a variável Aa, por ser natureza quantitativa, foram calculadas algumas medidas-resumo, como média e desvio-padrão, entre outras (BUSSAB e MORETTIN, 2006).

As variáveis relativas à presença ou ausência da *listéria* nos produtos presunto e salame, correlação com a marca do produto (Ap, Bp e Cp, As, Bs, Cs e Ds), estágio da vida de prateleira (inicial e final), todas de natureza qualitativa, foram analisadas através do cálculo de frequências absolutas e relativas (%) (BUSSAB e MORETTIN, 2006).

As análises inferenciais, empregadas com o intuito de confirmar ou refutar evidências encontradas na análise descritiva foram: a) Teste t-Student na comparação das médias da Aa entre as amostras de salame com e sem listéria (NETER e col, 1996) e b) Teste de Qui-quadrado de Pearson e a extensão do teste Exato de Fisher (AGRESTI, 1990) para o estudo da associação entre: (b1) Presença ou ausência de listéria nos produtos presunto e salame, considerando o estágio da vida de prateleira; (b2) presença ou ausência de listéria versus marca do produto (A_p , B_p e C_p , A_s , B_s , C_s e D_s), considerando o estágio da vida de prateleira.

Para todos os resultados, obtidos através das análises inferenciais, foi utilizado o nível de significância α igual a 5%.

Os dados foram digitados em planilhas do Excel 2000 para Windows para o adequado armazenamento das informações. As análises estatísticas foram realizadas com o software Statistical Package for Social Sciences (SPSS), versão 11.0 for Windows.

A nomenclatura das tabelas foi elaborada conforme o indicado por BERQUÓ e colaboradores (1980).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Ocorrência de *Listeria spp* e *Listeria monocytogenes* nas amostras de presunto

Tabela 1. Distribuição de frequência da ocorrência de listéria, em amostras de produto *ready-to-eat*, presunto fatiado, segundo vida de prateleira (VDP) e marcas comercializadas no município de São Paulo, 2006 e 2007.

VDP	Marca	Resultados de listéria			Total de amostras avaliadas
		Ausente	<i>Listeria spp</i> (em 25g)	<i>Listeria monocytogenes</i> (em 25g)	
Inicial	Ap	25 (100,0%)	-	-	25
	Bp	34 (97,1%)	1 (2,9%)	1 (2,9%)	35
	Cp	5 (100,0%)	-	-	5
	Total	64 (98,5%)	1 (1,5%)	1 (1,5%)	65
Final	Ap	25 (100,0%)	-	-	25
	Bp	34 (97,1%)	1 (2,9%)	-	35
	Cp	5 (100,0%)	-	-	5
	Total	64 (98,5%)	1 (1,5%)	-	65
Total	Ap	50 (100,0%)	-	-	50
	Bp	68 (97,1%)	2 (2,9%)	1 (1,4%)	70
	Cp	10 (100,0%)	-	-	10
	Total	128 (98,5%)	2 (1,5%)	1 (0,8%)	130

A Tabela 1 apresenta a distribuição das amostras de presunto, quanto à presença de listéria, segundo o estágio da vida de prateleira (VDP), marca analisada e identificação da *L.monocytogenes*.

Observou-se que em apenas duas amostras foi detectada a presença de listéria: uma amostra da marca Bp no início da vida de prateleira apresentou *Listeria spp*, que foi identificada como *L. monocytogenes*, enquanto que a outra amostra, também da marca Bp, apresentou *Listeria spp* no final da vida de prateleira.

Considerando o total de amostras analisadas (130), a ocorrência de *L. monocytogenes* no presunto foi de 0,8%, sendo que para *Listeria spp* a positividade foi de 1,5%.

4.2. Ocorrência de listéria no presunto versus Atividade de água

A Tabela 2 apresenta a distribuição das amostras de presunto segundo os resultados de listéria e as informações de Aa. Apenas duas amostras de presunto apresentaram positividade para listéria e uma delas não foi submetida a análise de Aa. Desta forma não foi possível aplicar nenhuma técnica estatística inferencial para a comparação dos níveis médios de Aa, segundo presença de listéria.

A análise de Aa não foi realizada na totalidade das amostras, em função da indisponibilidade do equipamento.

Tabela 2. Distribuição de medidas de posição da Atividade de Água (A_a), segundo os resultados de pesquisa de listéria em amostras de produto *ready-to-eat*, presunto fatiado, comercializadas no município de São Paulo, 2006 e 2007.

Resultados de Listeria	N	Aa Média	Aa Mediana	Aa Mínimo	Aa Máximo	Desvio-padrão
Ausente	99	0,954	0,949	0,911	0,983	0,020
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	0,933	0,933	0,933	0,933	-
Total	100	0,954	0,949	0,911	0,983	0,020

4.3. Ocorrência de *Listeria* spp e *Listeria monocytogenes* nas amostras de salame

A Tabela 3 apresenta a ocorrência de listéria nas amostras de salame, segundo o estágio da vida de prateleira, marca analisada e identificação da *L.monocytogenes*.

Tabela 3. Distribuição de freqüência de ocorrência de listéria, em amostras de produto *ready-to-eat*, salame fatiado, segundo vida de prateleira (VDP) e marcas comercializadas no município de São Paulo, 2006 e 2007.

VDP	Marca	Resultados de listéria			Total de amostras avaliadas
		Ausente	<i>Listeria</i> spp (em 25g)	<i>Listeria monocytogenes</i> (em 25g)	
Inicial	As	20 (100,0%)	-	-	20
	Bs	2 (40,0%)	3 (60,0%)	-	5
	Cs	16 (80,0%)	4 (20,0%)	3 (15,0%)	20
	Ds	7 (35,0%)	13 (65,0%)	2 (10,0%)	20
	Total	45 (69,2%)	20 (31,0%)	5 (7,7%)	65
Final	As	17 (85,0 %)	3 (15,0%)	1 (5,0%)	20
	Bs	5 (100,0%)	-	-	5
	Cs	14 (70,0%)	6 (30,0%)	1 (5,0%)	20
	Ds	17 (85,0%)	3(15,0%)	1 (5,0%)	20
	Total	53 (81,5%)	12 (18,5%)	3 (4,6%)	65
Total	As	37 (92,5%)	3 (7,5%)	1 (2,5%)	40
	Bs	7 (70,0%)	3 (30,0%)	-	10
	Cs	30 (75,0%)	10 (25,0%)	4 (10,0%)	40
	Ds	24 (60,0%)	16 (40,0%)	3 (7,5%)	40
	Total	98 (75,4%)	32 (24,6%)	8 (6,2%)	130

No início da vida de prateleira foi identificada a presença *Listeria* spp em vinte (20) amostras, sendo três (3) da marca Bs, quatro (4) da marca Cs

e treze (13) da marca Ds. No final da vida de prateleira, doze (12) amostras apresentaram *Listeria* spp, sendo três (3) da marca As, seis (6) da marca Cs e três (3) da marca Ds.

Quando se avaliou a ocorrência de *Listeria* spp, comparativamente ao total de amostras de salame, avaliado em cada estágio da vida útil, foi observada maior ocorrência da referida bactéria nos salames analisados no início da vida de prateleira, porém não houve diferença estatística significativa ($p= 0,153$) entre o grupo de amostras analisadas no início da vida de prateleira ($20/65=31,0\%$ positividade) quando comparado com as do final ($12/65=18,5\%$ positividade).

Ainda considerando o grupo em que houve presença de *Listeria* spp versus o grupo total, observou-se diferença estatística significativa ($p<0,001$) para a ocorrência de *Listeria* spp nas diferentes marcas avaliadas no início da vida de prateleira, sendo que a marca Ds apresentou maior frequência de positividade de *Listeria* spp ($p<0,001$). Uma marca (As), dentre as quatro avaliadas, não apresentou nenhuma amostra positiva para *Listeria* spp no início da vida de prateleira.

A presença de *Listeria* spp no salame, no final de vida de prateleira, não apresentou diferença estatística para as marcas analisadas ($p=0,516$).

Considerando o resultado de positividade total, início e final da vida de prateleira e o total de amostras avaliadas, a ocorrência de *Listeria* spp foi de 24,6% (32/130). Foi observada diferença estatística significativa ($p=0,009$) entre as marcas analisadas, sendo que as marcas Cs e Ds apresentaram maior frequência de positividade da bactéria ($p=0,011$).

A presença de *L. monocytogenes*, no início da vida de prateleira foi confirmada em cinco (5) amostras de salame, sendo três (3) da marca Cs e duas (2) da marca Ds. No final da vida de prateleira, apenas três (3) amostras de salame apresentaram *L. monocytogenes*, sendo uma (1) da marca As, uma (1) da marca Cs e uma (1) da marca Ds.

Considerando o grupo em que houve presença de *L. monocytogenes* com o total de amostras avaliadas, não existe diferença estatística significativa ($p=0,718$) para a ocorrência de *L. monocytogenes*, entre o grupo de amostras analisadas no início da vida de prateleira ($5/65=7,7\%$ positividade) quando comparadas com as do final ($3/65=4,6\%$ positividade)

A ocorrência de *L. monocytogenes* entre as diferentes marcas analisadas, no início ($p=0,140$) e no final ($p>0,999$) da vida de prateleira, foi estatisticamente a mesma entre elas. Duas das marcas (As e Bs), dentre as quatro avaliadas, não apresentaram nenhuma amostra positiva para *L. monocytogenes*, no início da vida de prateleira, sendo que a marca Bs também apresentou ausência da referida bactéria no final da vida de prateleira.

No total de amostras avaliadas (130), a ocorrência de *L. monocytogenes* foi de 6,2% (8/130), sendo que não se observou diferença estatística significativa ($p=0,574$) entre as marcas analisadas.

4.4. Ocorrência de listéria no salame versus Atividade de água

A Tabela 4 apresenta a distribuição das amostras de salame, segundo resultados de listéria, com as respectivas espécies identificadas e as informações da Aa.

Tabela 4. Distribuição de medidas de posição da Atividade de Água (Aa), segundo os resultados de pesquisa de listéria, em amostras de produto *ready-to-eat*, salame fatiado, comercializadas no município de São Paulo, 2006 e 2007.

Resultado de Listeria	N	Aa Média	Aa Mediana	Aa Mínimo	Aa Máximo	Desvio-padrão
Ausente	80	0,853	0,845	0,786	0,937	0,037
<i>Listeria</i> spp	11	0,852	0,853	0,806	0,889	0,026
<i>Listeria monocytogenes</i>	4	0,833	0,832	0,819	0,850	0,013
Total	95	0,852	0,847	0,786	0,937	0,035

Os resultados da comparação entre os valores médios da Aa segundo a presença de listéria revelaram que amostras sem listéria apresentaram, em média, valores iguais ($p=0,429$) de Aa, quando comparadas às amostras positivas para listéria (*Listeria* spp ou *L. monocytogenes*).

A análise de Aa não foi realizada no total das amostras, em função da indisponibilidade do equipamento.

4.5. Ocorrência de *Listeria monocytogenes*: presunto versus salame

A comparação da ocorrência de *L. monocytogenes*, entre as amostras de presunto e salame foi o objeto principal desta pesquisa. A Tabela 5 apresenta as distribuições das amostras de presunto e salame, segundo a presença de *L. monocytogenes* e vida de prateleira.

Tabela 5. Distribuição da freqüência de ocorrência de *Listeria monocytogenes*, segundo tipo de produtos *ready-to-eat* e vida de prateleira (VDP), em amostras de produtos comercializados no município de São Paulo, 2006 e 2007.

VDP	Produto	Resultados de <i>Listeria monocytogenes</i> (em 25g)		Total de amostras avaliadas
		Ausente	Presente	
Inicial	presunto	64 (98,5%)	1 (1,5%)	65
	salame	60(92,3%)	5 (7,7%)	65
	Total	124 (95,4%)	6 (4,6%)	130
Final	presunto	65 (100,0%)	-	65
	salame	62 (95,4%)	3 (4,6%)	65
	Total	127 (97,7%)	3 (2,3%)	130
Total	presunto	129 (99,2%)	1 (0,8%)	130
	salame	122 (93,8%)	8 (6,2%)	130
	Total	251 (96,5%)	9 (3,5%)	260

Os resultados inferenciais revelaram que a frequência de *L. monocytogenes* é, estatisticamente, a mesma entre as amostras de salame e presunto, tanto no início da vida de prateleira ($p=0,208$) quanto no final da vida de prateleira ($p=0,244$).

Quando as amostras foram agrupadas (início e final da vida de prateleira), as amostras de salame apresentaram frequência, estatisticamente, maior de *L. monocytogenes* que as amostras de presunto ($p=0,036$).

4.6. Quantificação e sorotipagem da *Listeria monocytogenes* nas amostras de presunto e salame

As quantificações da *L. monocytogenes* nas amostras de presunto e salame, bem como os resultados de sorotipagem estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6. Distribuição de amostras positivas para *Listeria monocytogenes*, segundo vida de prateleira, marca, número de UFC/g e resultados de sorotipificação, em amostras de produtos fatiados do tipo *ready-to-eat*, presunto e salame, comercializados no município de São Paulo, 2006 e 2007.

n=9

Produto	VDP	Marca	UFC/g	Sorotipagem
Presunto	inicial	Bp	<10	3b
Salame	inicial	Cs	3,0x10	4b
	inicial	Cs	5,0x10	4b
	inicial	Cs	2,0x10	4b
	inicial	Ds	<10	1/2b
	inicial	Ds	1,9x10 ³	3b
	final	As	<10	Não realizada (cepa contaminada com bolor)
	final	Cs	<10	1/2b
	final	Ds	<10	1/2c

É importante ressaltar que apenas uma amostra de salame, da marca Ds, no início da vida de prateleira, apresentou contagem superior a 100 UFC/g (1900 UFC/g). Os demais resultados foram todos menores que 100 UFC/g, sendo que o segundo maior valor, no início da vida de prateleira, foi de 50 UFC/g. As contagens de *L. monocytogenes* no final da vida de prateleira apresentaram resultados menores que 10 UFC/g.

No salame, o sorotipo mais freqüente foi o 4b, seguido pelo 1/2b, enquanto o sorotipo 3b foi identificado tanto no presunto (1 amostra) como no salame (1 amostra).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho foi identificada uma baixa ocorrência de *L. monocytogenes* e *Listeria* spp nas amostras de presuntos. Nas amostras de salames, as ocorrências detectadas foram significativamente maiores para os dois tipos de listéria estudados e os sorotipos mais freqüentemente identificados foram o 4b e o 1/2b.

A baixa ocorrência de *L. monocytogenes* e também de *Listeria* spp nos presuntos comprova a efetividade do processamento térmico ao qual o produto foi submetido. Conforme VITAS & GARCIA-JALON (2004) a listéria é sensível aos tempos e temperaturas praticados para a cocção e a pasteurização dos alimentos. Esta afirmação é corroborada por MATARAGAS e DROSINOS (2007) que citam temperaturas entre 72 e 74°C para a eliminação da bactéria. Os mesmos autores sugerem que a presença da *L. monocytogenes* em produtos cozidos seja resultante de uma contaminação após o tratamento térmico.

Entre as possíveis fontes de contaminação, GANDHI e CHIKINDAS, (2007) citam: ingredientes crus não processados e adicionados aos produtos finais, superfícies de contato com alimentos e ambientes, falhas na manipulação e na embalagem.

Face ao exposto, tal ocorrência comprova não somente a efetividade do processamento térmico, mas também as condições de controle no ambiente de manipulação, após o processamento. Para obtenção do produto

presunto fatiado, os grandes processadores cozinham o produto em embalagens “*cook in*”, ou seja, o produto é embalado cru e submetido ao cozimento dentro da embalagem. Após o cozimento o produto pode receber uma embalagem adicional para ser comercializado inteiro e, posteriormente ser fracionado ou ser fatiado na própria indústria e, nesse caso, é feita a remoção da embalagem em que o produto foi cozido. O presunto é exposto ao ambiente, onde é manipulado, fatiado e embalado. Nessa etapa do processo, existe o risco de re-contaminação com a listéria, visto que a bactéria está presente no ambiente. Para minimizar este risco, faz-se necessária a adoção de rigorosas práticas de higiene e controle, tais como Boas Práticas de Manufatura, Procedimento Padrão de Higiene Operacional e, também, a pesquisa de listéria no ambiente e nos equipamentos. Usualmente, a *Listeria* spp é utilizada como indicador para o controle das condições ambientais.

As amostras de salame apresentaram ocorrências significativamente maiores para os dois tipos de listéria: *L. monocytogenes* 6,2% (8/130) e *Listeria* spp 24,6% (32/130). Entretanto, GOUNADAKI e colaboradores (2007) citam que o salame pode ser enquadrado no grupo dos alimentos seguros, porque sua produção envolve uma combinação de barreiras para a sobrevivência e para o crescimento da *L. monocytogenes*. Tal fato é corroborado por JAY (2005), quando cita que os produtos de carne fermentada possuem uma longa história de segurança no mundo. Dentre as possíveis barreiras, pode-se citar o baixo pH, a baixa Aa, presença de microflora competitiva e adição de sais de cura.

A despeito de o salame apresentar barreiras para a sobrevivência e para o crescimento da *L. monocytogenes*, estudo realizado por VORST e colaboradores (2006) demonstrou que o processo de fatiamento do salame pode implicar em maior risco de presença de *L. monocytogenes*. Os autores avaliaram a transferência de *L. monocytogenes* durante o fatiamento de peito de peru, embutido do tipo mortadela Bologna e salame, e mencionam que a escolha desses produtos para o estudo teve como base a diferença entre os percentuais de umidade e gordura dos mesmos. Os mesmos autores referem que o alto percentual de gordura e baixa umidade, no caso do salame, resultaram em uma camada de gordura na lâmina do fatiador que poderia propiciar a dispersão e a proteção da listéria, enquanto baixos teores de gordura e altos de umidade, no caso do peito de peru, teriam um efeito de lavagem da lâmina do fatiador, pelo fato de restarem poucos resíduos visíveis após uso contínuo. Lin e colaboradores, citados por VORST e colaboradores (2006), também associaram a formação da camada de gordura nos fatiadores e esteiras, com altas contagens de listéria no produto, visto que o mesmo permanecerá estocado sob condições de refrigeração com o conseqüente crescimento da bactéria durante estocagem prolongada. Segundo VORST e colaboradores (2006), os resultados do estudo sugeriram a possibilidade da transferência de listéria, através dos fatiadores mecânicos, com alto risco de exposição no consumo das primeiras fatias processadas em fatiador contaminado.

Não houve associação entre os resultados de Aa e a presença ou ausência de *L. monocytogenes* e, diferentemente do esperado, o produto

com menor atividade de água, o salame, apresentou maior ocorrência de *L. monocytogenes*. Um aspecto que não havia sido questionado, quando do planejamento do estudo, refere-se ao quanto a umidade e a gordura, presentes no produto, poderiam constituir um fator para o aumento do risco, de contaminação por *L. monocytogenes*, durante o fatiamento, em função do acúmulo de resíduos. No que concerne ao quesito umidade, a legislação atual permite 40% para os salames e estabelece uma relação umidade/proteína de 5,35 para os presuntos, o que representa um valor de umidade máximo de 75% (BRASIL, 2000 b e a), enquanto para a gordura o valor máximo para o salame é de 35% e não existe padrão para o presunto (BRASIL, 2000 b). Considerando os resultados obtidos por VORST e colaboradores (2006), os processadores devem prever controles mais rigorosos nos procedimentos de fatiamento de salames do que aqueles estabelecidos para os produtos com menores teores de gordura, visto ter sido demonstrado que o acúmulo de gordura pode propiciar a dispersão e a proteção da listéria.

Um importante aspecto a ser considerado no controle da listéria diz respeito à sua presença no ambiente. Dessa forma, pode atingir diversas superfícies de contato com o alimento através de aerossóis. Em pesquisa realizada utilizando aerossóis que continham cepas de *L. innocua* e *L. monocytogenes* introduzidas, respectivamente, em uma planta piloto de processamento e em uma câmara de bioaerosol, constatou-se que a maioria das listérias estava depositada na primeira hora em que foram liberadas no ar, sendo que sobreviveram por, pelo menos, duas horas e trinta minutos,

tanto na câmara de bioaerossol como na planta piloto. O estudo também sugeriu que a contaminação por aerossol, em planta de processamento, pode ocorrer em alimentos que estejam de 1,0 a 2,5 metros de distância da fonte de contaminação, independente de ventiladores ligados ou não (ZHANG e col., 2007).

Quanto à adesão das células de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo, pesquisa sobre o tema evidenciou que a adesão da bactéria independe do tipo de cepa e do tipo de alimento cárneo. FONG e DICKSON (2004) citam que alguns estudos indicaram diferenças na adesão de diferentes cepas quanto a superfícies, alimentos ou equipamentos. Ressaltaram ainda que o tempo que a bactéria fica em contato com a superfície até a adesão irreversível, no caso de carnes, é de cinco minutos. Outro aspecto para o qual chamam a atenção refere-se ao fato de que o número inicial da contaminação é diretamente proporcional ao número de bactérias aderidas (FOONG e DICKSON, 2004).

A observação dos resultados da contagem da *L. monocytogenes* nas amostras positivas de salame evidenciou que uma das amostras apresentou resultado de 1900 UFC/g, o que caracterizou risco à saúde, considerando o preconizado pela Legislação Européia e, também, pelo Comitê Científico da Comissão Européia (*European Commission Scientific Committee*), que consideram que uma concentração de *L. monocytogenes* que não exceda 100 UFC/g do alimento pronto, no momento do consumo, pode ser considerada como de baixo risco aos consumidores (EUROPEAN COMMISSION SCIENTIFIC COMMITTEE, 1999).

Nos resultados obtidos no presente estudo, as maiores contagens de *L. monocytogenes*, de 20 a 1900 UFC/g foram obtidas no início da vida de prateleira. As amostras que apresentaram resultados positivos para *L. monocytogenes*, no final da vida útil, apresentaram valores de contagens <10 UFC/g.

GOUNADAKI e colaboradores (2007) referem que alguns pesquisadores atribuem a inibição da *L. monocytogenes* durante a estocagem de produtos fermentados à competição do patógeno com as altas concentrações de lactobacilos. Este fato pode justificar os resultados de contagens obtidos no presente estudo.

Outro aspecto a ser considerado relaciona-se à temperatura (4°C) que os produtos foram mantidos durante o estudo. Os dados da literatura indicam essa temperatura como ideal para prevenir o crescimento da *L. monocytogenes*. MATARAGAS E DROSINOS (2007) citam que a curva de crescimento da *L. monocytogenes* tende a ser igual a zero em temperaturas inferiores a 4°C. Relatam que esse fato foi comprovado em estudo onde amostras de presunto fatiado foram inoculadas e mantidas em estocagem por 45 dias a uma temperatura de 3,5°C; todavia observou-se que foi possível um pequeno crescimento, aumento de 0,5 log UFC/g em 45 dias, em temperaturas abaixo de 4°C. Relataram que o período de estocagem superior a 45 dias e a manutenção da temperatura constituíram-se aspectos mais influentes para o crescimento da bactéria do que a contagem da população inicial. O CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (2007) orienta que, nas etapas de estocagem, transporte e manutenção em geladeira pelo

consumidor, a temperatura do produto esteja, preferencialmente, entre 2°C a 4°C, e que não deve exceder 6°C.

Quanto aos tipos de sorotipos identificados na presente pesquisa, considerando os dois tipos de produtos, as respectivas freqüências foram: 4b (37,5%), 1/2b (25%), 3b (25%) e 1/2c (12,5%)

KATHARIOU (2002) relatou que são doze os sorotipos de *L. monocytogenes* que podem causar doenças, entretanto, 95% das cepas isoladas de casos de listeriose humana envolvem três sorotipos: 1/2a, 1/2b e 4b. A ocorrência desses sorotipos, em casos de doença, tem sido documentada em pesquisas de diferentes países. Vários casos de listeriose indicam o sorotipo 4b como o mais freqüente, variando de 50 a 70%. Por outro lado, o autor cita que estudos sugerem que o 4b não é o principal sorotipo isolado dos alimentos, e infere que essa discrepância entre a ocorrência no alimento e nos casos de listeriose pode sugerir que o sorotipo 4b é mais virulento que os demais sorotipos.

TOMPKIN (2002) relata que no mundo três sorotipos (4b, 1/2a e 1/2b) respondem por 89 a 96% dos casos de listeriose humana. Outros autores também citam os sorotipos 4b, 1/2a e 1/2b como os mais prevalentes nos casos de listeriose humana. (CAMPOS 2005; JAY 2005).

São poucos os estudos publicados, com dados relativos ao Brasil, sobre sorotipos identificados em material clínico. HOFER, REIS e HOFER (2006) analisaram 245 amostras de *L. monocytogenes*, isoladas de material clínico humano no período de 1969 a 2000, provenientes de várias regiões do Brasil. Foram identificados sete sorotipos com as seguintes freqüências:

4b (60,3%), 1/2a (29,0%), 4ab (2,7%), 1/2b (2,4%), 4a (0,8%), 1/2c (0,4%) e 3a (0,4%). Em investigação de três casos de meningite por *L. monocytogenes* no Distrito Federal, no ano de 1989, também houve a predominância do sorotipo 4b (HOFER, NASCIMENTO e OLIVEIRA, 1998). Considerando os trabalhos disponíveis, verificou-se que os sorotipos identificados nas amostras de salame estão entre os sorotipos identificados nos casos de listeriose humana no Brasil.

Os resultados obtidos no presente trabalho e os estudos citados reforçam que os desafios são grandes para o controle da *L. monocytogenes*, nos produtos onde não há um efetivo tratamento listericida, ou mesmo nos processos em que este tratamento está presente, mas com posterior exposição do produto.

Entre os aspectos abordados para a dificuldade no controle da *L. monocytogenes*, destaca-se a resistência que a bactéria apresenta para sanitizantes. Sugere-se a rotação entre dois tipos diferentes de sanitizantes na higienização das instalações de processamento de alimentos, a fim de prevenir o desenvolvimento de resistência das cepas (GANDHI e CHIKINDAS, 2007).

Os tratamentos, após a embalagem dos produtos, tais como: pasteurização, radiação, vapor e alta pressão, têm aumentado. Tem sido introduzido o uso de aditivos nos produtos onde o crescimento da *L. monocytogenes* possa ocorrer. Os aditivos mais comumente utilizados são lactato de sódio, diacetato de sódio e a combinação entre os dois. Outros métodos, tais como adição de peptídeos e culturas de bactérias lácticas,

também, estão sendo investigados como formas adicionais de prevenir o crescimento da bactéria durante a estocagem em temperatura de refrigeração. Entretanto, para os alimentos onde possa haver a multiplicação da listéria, o primeiro aspecto a ser considerado é a prevenção da contaminação do produto, e os aditivos inibidores devem ser vistos como uma garantia adicional.

O CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (2007) estabeleceu o Guia de Aplicação de Princípios Gerais de Higiene para o Controle de *L. monocytogenes* em Alimentos. O referido guia conta com seções que abordam desde a produção primária, características de layout e fluxo dos estabelecimentos, equipamentos, controle das operações, manutenção e sanitização, higiene pessoal, transporte e informação até a conscientização do consumidor, ou seja, o controle da bactéria envolve toda a cadeia e deve ser estendido até o consumidor.

Bryan, citado por GANDHI E CHIKINDAS (2007), reitera a necessidade do monitoramento das DTAs pelas agências governamentais, rotina de amostragens e testes dos alimentos, estabelecimento do APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle), inspeção das instalações processadoras de alimentos, treinamentos dos operadores e conscientização dos consumidores sobre inocuidade dos alimentos.

Observando cada um desses aspectos, no Brasil, ainda tem-se um longo caminho a percorrer, desde a legislação do produto final, onde não ficam claramente estabelecidos os critérios para a *L. monocytogenes*, passando pela carência de resultados de análises de produtos, visto que não

há um programa oficial para fiscalização dos produtos prontos para o consumo, além da pouca disponibilidade de dados clínicos que possam ter associação com a bactéria. Adicionalmente, a esses aspectos, a fiscalização dos produtores quanto à aplicação das Boas Práticas de Manufatura e do Sistema APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) e a fiscalização do varejo quanto ao atendimento às Boas Práticas de Estocagem e Exposição, com principal enfoque em manutenção adequada das temperaturas também apresentam limitações. Finalmente, não existem ações consistentes no tocante à educação e conscientização dos consumidores sobre os riscos e os cuidados a serem observados na aquisição e consumo de alimentos que não serão submetidos a cozimento.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo sobre a ocorrência da *L. monocytogenes*, onde foi avaliada, também, a ocorrência da *Listeria* spp, permitiram concluir que:

1. A ocorrência de *L. monocytogenes* foi significativamente maior no produto maturado (salame) quando comparada ao produto cozido (presunto).
2. A *Listeria* spp apresentou ocorrência significativamente maior no salame comparativamente ao presunto cozido.
3. Não existiu diferença significativa para a ocorrência de *Listeria* spp nas amostras de salame analisadas no início e no final da vida de prateleira.
4. No total de amostras avaliadas, foi observada diferença estatística significativa para *Listeria* spp entre as marcas analisadas, sugerindo que podem existir diferenças no controle higiênico aplicado aos processos envolvidos.
5. Foi detectada diferença estatística significativa de *L. monocytogenes* para as amostras de salame analisadas, no início e no final da vida de prateleira. Porém, as maiores contagens ocorreram no início da vida de prateleira, não respaldando, para este produto, que o decorrer da vida útil intensifique o risco.
6. Não houve diferença estatística significativa para a presença de *L. monocytogenes* entre as quatro marcas de salame avaliadas, o que pode

indicar que não existem grandes discrepâncias no controle aplicado nas indústrias para esse tipo de produto.

7. A quantificação de *L. monocytogenes* apresentou valores mais elevados no salame, inclusive com contagem acima do tolerado para os casos em que existem limites de referência.
8. Os sorotipos mais freqüentemente associados à listeriose humana foram identificados nas amostras de salame.
9. Não houve correlação entre produtos com maior Aa e a presença de listéria.
10. A baixa ocorrência de *L. monocytogenes* no presunto cozido indica efetividade das condições de controle do ambiente na indústria, na manipulação do produto após o tratamento térmico ou utilização de tratamento após manipulação, como pasteurização.
11. Os resultados encontrados permitem inferir, para os produtos analisados, que o risco de listeriose decorrente do consumo de salame é maior do que o associado ao consumo de presunto cozido.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

ACNielsen Global Services. Os produtos mais quentes do mundo. Relatório executivo de notícias, 2004.

Disponível em:

<URL:http://www.acnielsen.com.br/publicacoes/alimentos_e_bebidas_2004.pdf>[2006 Jan 20].

Agresti A. **Categorical data analysis**. New York: Wiley Interscience; 1990.

Aguado V, Vitas AI, Garcia-Jalon I. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. **Int J Food Microbiol** 2004; 90(3):341-7.

Araújo PCC, Franco RM, Oliveira LAT, Carvalho, JCAP. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em produtos de carne de peru comercializados na cidade de Niterói-RJ- Brasil. **Act Scient Vet** 2002; 30(1):19-25.

Arruda GA, Germano PML, Matté MH, Oliveira CJR. **Listéria e listeriose: Perigo para as gestantes**. 2ª ed. São Paulo: Ponto Crítico; 2007.

Berquó ES, Souza JMP, Gotlieb SLD. **Bioestatística**. São Paulo: Editora Pedagógica Universitária; 1980.

*Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. Biblioteca/CIR. **Guia de Apresentação de Teses**. São Paulo; 1998.

Borges MF, Siqueira RS, Bittencourt AM, Vanetti MCD, Gomide LAM. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em salame. **Rev Microbiol** 1999; 30(4): 362-364.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Resolução - RDC 12, de 2 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 de jan de 2001. Seção 1, p. 45-53.

Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretária de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N° 20, de 31 de julho de 2000a. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Presunto Cozido**. Anexo VI (a).

Disponível em:

<URL:<http://extranet.agricultura.gov.br/consultasislegis/Imagem?codArquivo=1686>> [2006 Jan 20]

Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretária de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N° 22, de 31 de julho de 2000b. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Salames**. Anexo X (b).

Disponível em:

<URL:<http://extranet.agricultura.gov.br/consultasislegis/Imagem?codArquivo=1572>> [2006 Jan 20]

Brasil. Secretária de Vigilância em Saúde. Portaria N° 5, de 21 de fevereiro de 2006. **Inclui doenças na relação nacional de notificação compulsória, define doenças de notificação imediata, relação de resultados laboratoriais que devem ser notificados pelos Laboratórios de Referência Nacional ou Regional e normas para notificação de casos.**

Disponível em: <URL:

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portaria_5_2006.pdf> [2008 Jun 22] .

Bussab WO, Morettin PA. **Estatística básica**. 5^a ed. São Paulo: Saraiva; 2006.

Campos LC. *Listeria monocytogenes*. In: Trabulsi LR, Alterthum F. **Microbiologia**. 4^a ed. São Paulo: Atheneu; 2005.p.235-242

Chen Y, Ross WH, Scott VN, Gombas DE. *Listeria monocytogenes*: low levels equal low risk. **J Food Protect** 2003; 66(4):570-7.

Codex Alimentarius Commision. Joint FAO/WHO Food Standard Programme. **Guidelines on the Application of General Principles of Food Hygiene to the Control of *Listeria monocytogenes* in foods**. 2007.

Cohen J. **Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences**. New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates; 1988.

Cordano AM, Rocourt J. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. **Int J Food Microbiol** 2001; 70(1-2):175-8.

Doyle MP, Glass KA, Berry JT, Garcia GA, Pollard DJ, Schultz RD. Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization. **Appl Environ Microbiol** 1987; 53 (7): 1433-1438.

European Commission Scientific Committee. Health & Consumer Protection Directorate-General. **Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health on *Listeria monocytogenes***. Directorate B – Scientific Health Opinions. Unit B3 – Management of scientific committees II., September, 1999.

Fleming DW, Cochi SL, MacDonald KL, Brondum J, Hayes PS, Plikaytis BD, Holmes MB. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. **N Engl J Med** 1985; 312 (7): 404-407.

Foong SCC, Dickson JS. Attachment of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat meats. **J Food Protect.** 2004; 67 (3): 456-462.

Forsythe, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar.** Porto Alegre: Artmed; 2002. p. 169-170.

Francescato RF, Sebastião PCA, Santos HHP. Frequência de patógenos emergentes relacionados com doenças transmitidas por alimentos em áreas selecionadas no estado de São Paulo - julho de 1998 a julho de 2000. **Revista NET – DTA.** 2002; 2. Disponível em <URL: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/revp02_vol2n1.pdf > [2008 Jun 22]

Gandhi M, Chikindas ML. Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. **Int J Food Microbiol** 2007; 113: 1-15.

Garaybazal JFF, Rodriguez LD, Boland JAV, Rodriguez EFF, Briones VD, Cancelo JLB, Fernandez GF. Survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk treated in a pilot plant size pasteurizer. **J Appl Microbiol** 1987; 63 (6): 533-537.

Germano PML, Germano MIS. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos.** 3^a ed. Barueri, São Paulo: Manole; 2008. Agentes bacterianos de toxinfecções; p.277- 356.

Gianfranceschi M, Gattuso A, Tartaro S, Aureli P. Incidence of *Listeria monocytogenes* in food and environmental samples in Italy between 1990

and 1999: Serotype distribution in food, environmental and clinical samples. **Europ J Epidemiol** 2003; 18: 1001 – 1006.

Gombas DE, Chen Y, Clavero RS, Scott VN. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. **J Food Protect** 2003; 66(4):559-69.

Gounadaki AS, Skandamis PN, Drosinos EH e Nychas GJE. Effect of Packing and storage temperature on the survival of *Listeria monocytogenes* inoculated postprocessing on slice salami. **J Food Protect** 2007; 70 (10): 2313-2320

Guerra MM, McLauchlin J, Bernardo FA. *Listeria* in ready to eat and unprocessed foods produced in Portugal. **Food Microb** 2001; 18:423-29.

Goulet V, Hedberg C, Monnier AL, Valk H. Increasing of Listeriosis in France and other European Countries. **Emerg Infect Diseases**. 14(5): 734-40.

Disponível em:

<URL: <http://www.cdc.gov/eid/content/14/5/734.htm> [2008 Jun 22].

Health Canada. Health Products and Food Branch. Food Directorate. **Policy on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods**. 2004.

Disponível em:

<URL:http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/hpfb dgpsa/pdf/legislation/policy_listeria_monocytogenes_politique_toc-eng.pdf

Hofer E, Nascimento RS, Oliveira MA. Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. **Rev Soc Bras de Med Trop** 1998; 31 (2): 174-177.

Hofer E, Reis CMF, Hofer CB. Sorovares de *Listeria* e espécies relacionadas isoladas de material clínico humano. **Rev Soc Bras de Med Trop** 2006; 39 (1): 32-37

Inoue S, Nakama A, Arai Y, Kokubo Y, Maruyama T, Sito A, et al. Prevalence and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in retail foods in Japan. **Int J Food Microbiol** 2000; 59(1-2):73-7.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Micro-organisms in Foods 5. **Microbiological Specifications of Food Pathogens**. Blackie Academic & Professional, 1996. *Listeria monocytogenes*; p. 141-182.

International Standard ISO-11290-1:1996 and 11290-2:2004 - **Microbiology of food and animal feeding stuffs** - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: Detection method (a).

International Standard ISO-11290-2:2004- **Microbiology of food and animal feeding stuffs** - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 2: Enumeration method (b).

Jay JM. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.

Jemmi T, Stephan R. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. **Rev Sci Tech Off Int Epiz** 2006; 25 (2): 571-580.

Kathariou, S. *Listeria monocytogenes* Virulencia e Pathogenicity, a Food Safety Perspective. **J Food Protect**. 2002; 65 (11) 1811-1829.

Koch R, Stark K. **Significant increase of listeriosis in Germany – Epidemiological patterns 2001-2005**. Eurosurveillance. 2006, 11 (6):

Disponível em:

<URL: <<http://www.eurosurveillance.org/viewarticle.aspx?articleId=631>
[2008 Jun 22] .

Lenhart J, Kendall P, Medeiros L, Doorn J, Schroeder M, Sofos J. Consumer Assessment of Safety and Date Labeling Statements on Ready-to-eat Meat and Poultry Products Designed to Minimize Risk of Listeriosis. **J Food Protect** 2008; 71 (1):70-76

Mataragas M, Drosinos EH. Shelf life Establishment of Sliced, Cooked, Cured meat Product Basead on Qualit and Safety Determinants. **J Food Protect** 2007; 70 (8):1881-89.

Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. **Applied linear statistical models**. 4th ed. Irwin, Boston; 1996.

Norrung B, Andersen JK, Schlundt J. Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. **Int J Food Microbiol** 1999; 53(2-3):195-203.

Regulamento (CE) N° 2073/05 de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Européia**.

Regulamento (CE) N° 1441/07 de 05 de Dezembro de 2007, que altera o Regulamento (CE) 2073/05 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Européia**.

Rocourt J, BenEmbarek P, Toyofuku H, Schlundt J. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach. **FEMS- Immunol Med Microbiol** 2003; 35 (3): 263-7.

Sakate RI, Aragon LC, Raghianti F, Landgraf M, Franco BDGM, Destro MT. Quantificação de *Listeria monocytogenes* em salames fatiados embalados a vácuo. **ALAN** 2003; 53(2):184-87.

Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica – CVE. Informe – **Net DTA**. Manual das Doenças Transmitidas por alimentos, 2003.

Disponível em <URL:

ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/listeria.pdf> [2008 Jun 22]

Seeliger HPR, Höhne K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In: Bergan T, Norris JR (ed) **Methods in Microbiology**. London: Academic Press; 1979. vol 13, p. 31-49.

Schwab, JP, Edelweiss, MIA. Identificação imuno-histoquímica de *Listeria monocytogenes* em placentas fixadas em formol e embebidas em parafina. **Rev Bras Ginec Obstetr** 2003; 25 (7) 2003.

Disponível em <URL:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032003000700006&lng=en&nrm=iso> [2008 Jun 22] .

Tompkin RB. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. **J Food Protect** 2002; 65(4): 709-725.

Uboldi-Eiroa MN. *Listeria monocytogenes* características, ocorrência e desenvolvimento em alimentos. **Col Inst Tec Alim** 1990; 20 (1): 13-22.

United States Department of Agriculture – USDA. 4^a revision. Washington, DC: 2004. **Food Safety and Inspection Service - FSIS Directive 8080. Recall of Meat and Poultry Products.**

Disponível em:

<[URL:http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FSISDirectives/8080.1Rev4.pdf](http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FSISDirectives/8080.1Rev4.pdf)> [2008 Mai 19]

United State Departament of Agriculture – USDA, 2008. Disponível em:
<[URL:http://www.fsis.usda.gov/fsis_recalls/Recall Case Archive 2007/index.asp](http://www.fsis.usda.gov/fsis_recalls/Recall_Case_Archive_2007/index.asp)>[2008 Mai 19]

Vitas AI, Garcia-Jalon VA. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **Int J Food Microbiol** 2004; 90(3):349-56.

Vorst KL, Todd ECD, Ryser ET. Transfer of *Listeria monocytogenes* during mechanical slicing of Turkey Breast, Bologna and Salami. **J Food Protect** 2006; 69 (3): 619-626.

Zhang G, Ma L, Oyarzabal OA, Doyle MP. Aerosol Studies with *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. **J Food Protect** 2007; 70 (8):1857-1865.