

PAULO ROBERTO DA SILVA ABRAHÃO

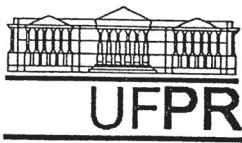
**OCORRÊNCIA DE *Listeria monocytogenes* E DE OUTROS
MICRORGANISMOS EM GELADOS COMESTÍVEIS
FABRICADOS E COMERCIALIZADOS NA REGIÃO
METROPOLITANA DE CURITIBA, PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia do Departamento de Patologia Básica - Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof. ^a Dr. ^a Cristina Leise Bastos Monteiro

Co-orientadora: Prof. Dr. ^a Wanda Moscalewski Abrahão

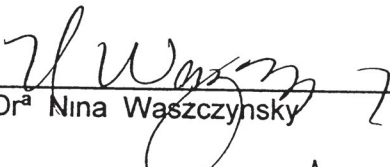
**CURITIBA
2005**

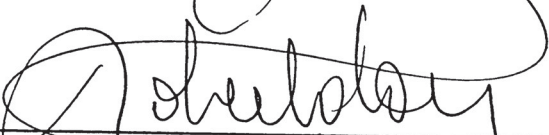



ATA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

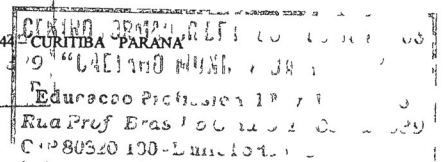
Aos vinte e nove dias do mês de abril de dois mil e cinco, às oito horas e trinta minutos, no Anfiteatro 10 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado de autona do Pos-Graduando em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, PAULO ROBERTO DA SILVA ABRAHÃO, intitulada "Ocorrência de *Listeria monocytogenes* e de outros microrganismos patogênicos em gelados comestíveis comercializados na região metropolitana de Curitiba, Paraná", sob a orientação da Profª Drª Cristina Leise Bastos Monteiro e a Banca Examinadora constituída pelos Professores Profª Drª Nina Waszczyński (Departamento de Tecnologia de Alimentos/UFPR), Dr Roberto Pontarolo (Departamento de Farmácia/UFPR) e Drª Wanda S Moscalewski (Departamento de Farmácia/UFPR) suplente. A Banca Examinadora iniciou os trabalhos. O candidato teve 60 (sessenta) minutos para expor oralmente seu trabalho, sendo em seguida arguido durante 30 (trinta) minutos por cada um dos membros da Banca Examinadora, e tendo 30 (trinta) minutos para responder a cada uma das arguições. No final o candidato foi APROVADO, segundo a avaliação da Banca Examinadora de Dissertação. Para a devida publicação, o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão, da qual foi lavrada a presente ata que será assinada pelo Presidente e pelos demais Membros da Banca Examinadora, em Curitiba, 29 de abril de 2005.

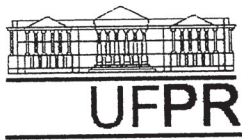

Profª Drª Cristina Leise Bastos Monteiro


Profª Drª Nina Waszczyński


Prof. Dr. Roberto Pontarolo


Profª Drª Wanda S Moscalewski - suplente





MINISTERIO DA EDUCAÇÃO
SETORES DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTOS DE PATOLOGIA BÁSICA E PATOLOGIA MÉDICA
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E
PATOLOGIA

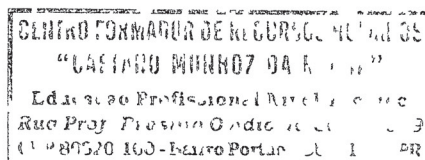
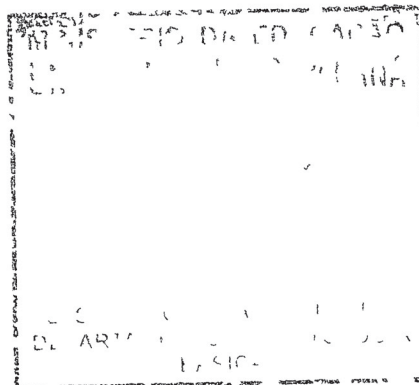
DECLARAÇÃO

Declaro que PAULO ROBERTO DA SILVA ABRAHÃO defendeu sua tese de dissertação de mestrado no dia 29 de abril deste ano, concluindo o Curso de Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, oferecido pelos Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná

E por ser verdade, firmo a presente declaração

Curitiba, 11 de agosto de 2005


Profª Drª Vanete Thomaz Soccol
Coordenadora



A Wanda
e
Paulo Henrique

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Paraná, por propiciar meios para freqüentar o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

À Secretaria de Estado da Saúde por permitir a realização da parte experimental nas instalações do Laboratório Central do Estado.

À amiga Prof.^a Dr.^a Cristina Leise Bastos Monteiro, nascente de inspiração e elevada espiritualidade que participou com a orientação, compreensão e amizade na elaboração e execução do projeto e em muitos momentos da execução dos trabalhos.

Aos Professores Drs. Roberto Pontarolo, Ana Leuch Lozovei e Nina Waszczynsky pela correção e sugestões para a realização deste trabalho e sua dedicação aos cursos de Pós-Graduação.

Aos servidores públicos e colegas da Secretaria de Estado da Saúde do Laboratório Central do Estado - LACEN, dos setores de Microbiologia de Alimentos, Meios de Cultura, Reativos e Esterilização.

Aos servidores das VISAs - Vigilâncias Sanitárias (estadual e municipal) que participaram das coletas de amostras para análise da presente pesquisa.

A minha esposa Wanda por seu amor, carinho, incentivo, apoio irrestrito e co-orientação.

RESUMO

Gelados comestíveis são derivados do leite que devido à composição oferecem ótimas condições para o desenvolvimento de patógenos. A literatura inclui a *Listeria monocytogenes* como causadora de surtos alimentares devido ao consumo de sorvetes a base de leite. Este patógeno não é objeto de pesquisa obrigatória legislação vigente para os gelados comestíveis. A RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) nº 12 de 02.01.2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária/MS definiu critérios de presença ou ausência dos gêneros *Salmonella*, Estafilococos coagulase positiva e Coliformes (fecais). A pesquisa fundamentou-se em delimitar-se à 2ª Regional de Saúde (Metropolitana Curitiba) da Secretaria de Estado da Saúde, especialmente os municípios Pinhais, Piraquara, São José dos Pinhais, Fazenda Rio Grande, Quatro Barras, Rio Branco do Sul, Itaperuçu, Campo Largo, Araucária, Lapa, Tijucas do Sul e Curitiba. Foram coletadas 60 amostras e processadas no Laboratório Central do Estado e no Laboratório de Controle de Qualidade II da UFPR. A metodologia de triagem utilizada para pesquisa do gênero *Listeria* spp. foi através de imunoprecipitação, enquanto para os outros gêneros seguiu-se cultura, isolamento e provas bioquímicas. Em 60 amostras processadas, não foi detectado o gênero *Listeria* spp. e estafilococos coagulase positiva. A pesquisa detectou a presença de coliformes ambientais, fecais e do gênero *Salmonella* spp.

Palavras chave: sorvete, gelados comestíveis, *Listeria monocytogenes*.

ABSTRACT

Frozen food milk derivatives, due to their composition, offer excellent conditions for the pathogen development. The literature includes *Listeria monocytogenes* as a cause of food poisoning outbreak due to the consumption of milk-based ice cream, however, this pathogen is not the object of current legally obligatory research for frozen foods in Brazil. The RDC (*Resolução da Diretoria Colegiada – Collegiate Directorate Resolution*) n° 12 of 02.01.2001 of the Health Ministry's National Agency for Sanitary Vigilance defined criteria for the presence or absence of the genera Salmonella, coagulase-positive Staphylococcus and Coliforms (fecal). The present research was based on the delimitation of the State Health Secretary's 2nd Regional Health Area (Curitiba Metropolitan Area), especially the municipalities Pinhais, Piraquara, São José dos Pinhais, Fazenda Rio Grande, Quatro Barras, Rio Branco do Sul, Itaperuçu, Campo Largo, Araucária, Lapa, Tijucas do Sul and Curitiba. Sixty samples were collected and processed in the State Central Laboratory and Quality Control Laboratory II of the Federal University of Paraná (UFPR). The triage methodology used to research the genus *Listeria* spp. was immunoprecipitation, while triage of the other genera was realized through culture growth, isolation and biochemical testing. Of the 60 processed samples, none revealed the detection of *Listeria* spp. and coagulase-positive Staphylococcus. The research detected the presence of environmental and fecal coliforms and the genus *Salmonella* spp.

Key words: ice cream, frozen foods, *Listeria monocytogenes*.

SUMÁRIO

	<i>p</i>
1. INTRODUÇÃO	01
1.2 JUSTIFICATIVA	03
1.3 OBJETIVO	04
1.3.1 Geral	04
1.3.2 Específicos	04
2 REVISÃO DA LITERATURA	05
2.1 GELADOS COMESTÍVEIS	05
2.1.1 Definição e Classificação	07
2.1.2 Estrutura	09
2.1.3 Composição	12
2.1.4 Processo de fabricação	12
2.1.4.1 Preparo da Mistura	12
2.1.4.2 Homogeneização	13
2.1.4.3 Pasteurização	13
2.1.4.4 Amadurecimento	13
2.1.4.5 Batimento	13
2.1.4.6 Congelamento	14
2.2 MICRORGANISMOS PESQUISADOS E AS DTAs	14
2.2.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	19

2.2.2	Características gerais do gênero <i>Listeria</i> spp.	24
2.2.3	Descrição e taxonomia de <i>Listeria monocytogenes</i>	27
2.2.4	Mecanismos de transmissão de <i>Listeria monocytogenes</i>	31
2.2.5	Manifestações clínicas causadas por <i>Listeria</i> spp.	32
2.2.6	Importância da <i>Listeria monocytogenes</i> para saúde pública e na contaminação dos alimentos	34
2.2.7	Efeito das condições ambientais e de processamento na sobrevivência e crescimento de <i>Listeria</i> spp.	40
2.2.8	Metodologias utilizadas para o isolamento de <i>Listeria</i> spp	41
2.2.9	Metodologias convencionais para o isolamento de <i>Listeria monocytogenes</i>	41
2.2.10	Métodos rápidos utilizados para detecção de <i>Listeria monocytogenes</i>	45
2.2.11	Métodos moleculares	49
2.3	GENERALIDADES SOBRE <i>Salmonella</i> spp.	52
2.4	GENERALIDADES SOBRE COLIFORMES TOTAIS E FECALIS	54
2.7	GENERALIDADES SOBRE <i>Staphylococcus</i> spp.	56
3	MATERIAIS E MÉTODOS	58
3.1	MATERIAL	58
3.1.1	Área de abrangência do estudo	58
3.1.2	Sorvetes a base de leite	59
3.1.3	Cepas padrões de referência	63
3.1.4	Equipamentos	64
3.1.5	Meios de cultura, sistema reagente, soluções reagentes e insumos	64
3.1.5.1	Meios de cultura	64

3.1.5.1.1	Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	64
3.1.5.1.2	Meios de pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	65
3.1.5.1.3	Número mais provável de coliformes a 35° C e 45 ° C	65
3.1.5.1.4	Contagem de estafilococos coagulase positiva	65
3.2	SISTEMA REAGENTE, SOLUÇÕES, REAGENTES E INSUMOS	66
3.2.1	Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	66
3.2.2	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	66
3.2.3	Número mais provável de estafilococos coagulase positiva	66
3.5	MÉTODO	67
3.5.1	Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> através da metodologia VIP (Método AOAC 997.03)	67
3.5.1.1	Enriquecimento seletivo primário	67
3.5.1.2	Enriquecimento seletivo secundário	68
3.5.1.3	Inoculação do sistema reagente	68
3.5.1.4	Leitura do sistema reagente	68
3.5.2	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	72
3.5.2.1	Confirmação bioquímica e sorológica	73
3.5.2.2	Reação típica de <i>Salmonella</i> em TSI	74
3.5.2.3	Reação típica de <i>Salmonella</i> em LIA	74
3.5.3	NMP de coliformes a 35° C e NMP de coliformes a 45° C	75
3.5.4	Contagem de estafilococos coagulase positiva	77
3.5.4.1	Teste de coagulase	78

3.5.4.2 Cálculo de Resultados	79
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
4.1 RESULTADOS	80
4.2 DISCUSSÃO	90
5 CONCLUSÃO	95
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01	INCIDÊNCIA DE LISTERIOSE NOS EUA	02
FIGURA 02	PROTÓTIPO MÁQUINA DE SORVETE	06
FIGURA 03 - A	COLÓIDE - GELADOS COMESTÍVEIS	10
FIGURA 03 - B	COLÓIDE - GELADOS COMESTÍVEIS	11
FIGURA 04	NUMERO DE POPULAÇÃO IDOSA ABRANGENDO A FAIXA ETÁRIA DE 65 ANOS EM DIANTE ATÉ 80 E ACIMA, DA 2ª RS NA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA, PARANÁ. 2004	21
FIGURA 05	<i>Listeria monocytogenes</i> – MICROSCOPIA OPTICA / COLORAÇÃO DE GRAM	28
FIGURA 06	ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE <i>Listeria monocytogenes</i> - MICROSCOPIA ELETRÓNICA	29
FIGURA 07	PROVA DE MOTILIDADE A 25° C	30
FIGURA 08	LISTERIOSE EM NEONATOS – LESÕES PUSTULARES	32
FIGURA 09 – A	SISTEMA API LISTERIA DEMONSTRANDO AS ETAPAS DO PROCESSO BIOQUÍMICO PAA DETECÇÃO DE <i>Listeria monocytogenes</i>	49
FIGURA 09 - B	REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA - PCR DEMONSTRANDO OS GENES <i>hly</i> , <i>prfA</i> e <i>iap</i> DA <i>Listeria monocytogenes</i>	51
FIGURA 10	MAPA DO ESTADO DO PARANÁ MOSTRANDO A DISTRIBUIÇÃO DAS REGIONAIS DE SAÚDE DA SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE E DESTACANDO A SEGUNDA REGIONAL DE SAÚDE	58
FIGURA 11	TECNICOS DA VISA MUNICIPAL DA SMS DE PIRAQUARA COLETANDO AMOSTRAS DE GELADOS COMESTÍVEIS	60
FIGURA 12	MAPA DA 2ª REGIONAL DE SAÚDE MOSTRANDO OS MUNICÍPIOS ONDE FORAM REALIZADAS AS COLETAS DE AMOSTRAS DE SORVETE	62
FIGURA 13	DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DAS AMOSTRAS COLETADAS EM FUNÇÃO DOS LOCAIS DE COLETAS NOS MUNICÍPIOS DA 2ª RS, REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA NO ANO DE 2004	63

FIGURA 14	PREPARAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOPRECIPITAÇÃO VISUAL PARA <i>Listeria</i> spp.	68
FIGURA 15	DETECÇÃO DE <i>Listeria</i> spp. ATRAVÉS DO ENSAIO VISUAL DE IMUNOPRECIPITAÇÃO (VIP) – RESULTADO POSITIVO NA CAVIDADE B	69
FIGURA 16	DETECÇÃO DE <i>Listeria</i> spp. ATRAVÉS DO ENSAIO VISUAL DE IMUNOPRECIPITAÇÃO (VIP) – RESULTADO POSITIVO NAS CAVIDADES B E C INDICANDO PROVA POSITIVA PARA <i>Listeria</i> spp.	70
FIGURA 17	DETECÇÃO DE <i>Listeria</i> spp. ATRAVÉS DO ENSAIO VISUAL DE IMUNOPRECIPITAÇÃO (VIP)	71
FIGURA 18	VIP (IMUNOPRECIPITADO VISUAL) MOSTRANDO A REAÇÃO ANTÍGENO - ANTICORPO	71
FIGURA 19	ESQUEMA DE DETECÇÃO DE <i>Listeria</i> spp. ATRAVÉS DO ENSAIO VISUAL DE IMUNOPRECIPITAÇÃO (VIP)	72
FIGURA 20	ESQUEMA DE DETECÇÃO DE <i>Salmonella</i> spp. ATRAVÉS DE MÉTODO BIOQUÍMICO E SOROLÓGICO	73
FIGURA 21 - A	ESQUEMA DEMONSTRADO A TÉCNICA DE NMP DE COLIFORMES A 35° C	76
FIGURA 21 - B	ESQUEMA DEMONSTRADO A TÉCNICA DE NMP DE COLIFORMES A 45° C	76
FIGURA 21 - C	ESQUEMA DEMONSTRADO A TÉCNICA DE CONTAGEM DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA	78
FIGURA 22	RESULTADO DA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE GELADOS COMESTÍVEIS COLETADAS EM FÁBRICAS DA 2ª RS NO ANO DE 2004 – CRITÉRIO SATISFATÓRIO PARA O CONSUMO OU INSATISFATÓRIO PARA O CONSUMO	80
FIGURA 23	PESQUISA <i>Salmonella</i> spp. - CRITÉRIO DE PRESENÇA OU AUSÊNCIA EM 25 g DE AMOSTRA INDICANDO UM RISCO EPIDEMIOLÓGICO PARA A POPULAÇÃO	83
FIGURA 24	PESQUISA DO NMP - COLIFORMES A 45° C. MÁXIMO 50 / g INDICANDO POLUIÇÃO SANITÁRIA NAS AMOSTRAS DE GELADOS COMESTÍVEIS	85
FIGURA 25	NMP COLIFORMES A 35° C INDICANDO A INTERFERÊNCIA EXTERNA NO ATO DE PRODUÇÃO DOS INGREDIENTES DA MISTURA	86

FIGURA 26	INSTALAÇÃO DE FÁBRICA - GELADOS COMESTÍVEIS EM SÃO JOSÉ DOS PINHAIS / 2º RS, REGIONAL METROPOLITANA DE CURITIBA, PARANÁ, 2004.	87
FIGURA 27	ESTOCAGEM DA MATÉRIA-PRIMA INDUSTRIALIZADA PARA CONFECCÃO DE SORVETES, 2ª RS, REGIONAL METROPOLITANA DE CURITIBA, PARANÁ, 2004	88

LISTA DE TABELAS

		<i>p</i>
TABELA 01	PRINCIPAL POPULAÇÃO DE RISCO: IDOSOS. 2ª RS METROPOLITANA	20
TABELA 02	ETAPAS DE SUBCULTURA, CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO E MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA ANÁLISE DE <i>Listeria</i> spp. EM ALIMENTOS PELOS MÉTODOS RECOMENDADOS POR	44

DIFERENTES ÓRGÃOS REGULADORES

TABELA 03	TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS E GENÉTICAS UTILIZADAS NA DETECÇÃO DE <i>Listeria</i> spp.	47
-----------	--	----

LISTA DE QUADROS

		p
QUADRO 01	PADRÃO MICROBIOLÓGICO VIGENTE PARA GELADOS COMESTÍVEIS E PRODUTOS PARA O PREPARO DE GELADOS COMESTÍVEIS	39
QUADRO 02	QUADRO DEMONSTRANDO O N° DA AMOSTRA, PRODUTO COLETADO E MUNICÍPIO DE COLETA - 2ª RS	61
QUADRO 03	RESULTADOS LABORATORIAIS DAS AMOSTRAS GELADOS COMESTÍVEIS COLETADAS ENTRE OS MESES DE MARÇO A DEZEMBRO DE 2004 NA 2ª RS – CURITIBA	82
QUADRO 04	ÍNDICE DE APROVAÇÃO - COMPARATIVO PESQUISA ANTERIOR (1998-2001) E PESQUISA ATUAL (2003/2005)	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido Desoxirribonucléico
RNA	Ácido Ribonucléico
BP	Ágar Baird- Parker
LPM	Ágar Cloreto de Lítio Feniletanol Moxalactam
LPM modificado	Ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam seletivo para Listéria, formulado segundo LOVETT & HITCHINS (1988) e suplementado com esculina 1 g/l, citrato férrico amoniacal 0,5 g/l
He	Ágar entérico de Hektoen
BHI agar	Ágar infusão cérebro coração
LIA	Ágar lisina ferro
OXA	Ágar Oxford
MOX	Ágar Oxford Modificado
OXA	Ágar Oxford seletivo para Listéria
PAL	Ágar Palcam
SS	Ágar Salmonella -Shiguella

SIM modificado	Ágar sulfito indol motilidade +0,05% de cloreto de trifeniltetrazolium
TSI	Ágar tríplice açúcar ferro
TSI	Ágar Tríplice Açúcar Ferro
TSA	Ágar tripticase soja sangue de carneiro
TSA – YE	Agar tripticase soja suplementado + 0,6 % de extrato de levedura
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
ADPT	Água peptonada tamponada
H	Antígenos flagelares
O	Antígenos somáticos
AOAC	Associação Oficial dos Analistas Químicos
a_w	Atividade de água
BAM	Bacteriological Analytical Manual
MM	Caldo de carne
LEB	Caldo de Enriquecimento de Listeria
BLED	Caldo de enriquecimento de <i>Listeria</i> tamponado
LEB	Caldo de enriquecimento para Listeria de acordo com o FDA
EC	Caldo EC
BHI	Caldo infusão cérebro coração
BHI	Caldo Infusão Cérebro Coração
VB	Caldo Lactosado Verde Brilhante Bile 2%
LST	Caldo Lauril Sulfato Triptose
RV	Caldo Rappaport-Vassiliadis Modificado
RVS	Caldo Rappaport -Vassiliadis Soja Peptona
SC	Caldo Selenito-Cistina
TSB-YE	Caldo tripticase de soja suplementado+0,6 % de extrato levedura
TSB – YE	Caldo tripticase soja suplementado com 0,6 % extrato de levedura
UVM	Caldo Universidade de Vermont
Caldo VM / VP	Caldo vermelho de metila/ Voges-Proskauer
CDC	Center Disease Control
CAMP	Christie, Atkins e Munch-Petersen
C	Citosina
NaCl	Cloreto de sódio
TTC	Cloreto de trifeniltetrazolium
pKa	Constante de dissociação
DVA	Doença Veiculada por Alimentos

DTAs	Doenças Transmitidas pelos Alimentos
VIP	Ensaio visual de imunoprecipitação
VIP	Ensaio visual de imunoprecipitação
Spp.	Espécies
Lag	Fase
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administratios
° C	Graus Centígrados ou Celsius (temperatura)
G	Guanina
h	horas
IAL	Instituto Adolfo Lutz
ISEP	Instituto de Saúde do Paraná
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ICMS	International Commission Microbiological Specifications Foods
LCR	Ligase Chain Reaction
log	logarítmo
LB	Luria Broth
>	maior
<	menor
µg	Microgramas
µl	Microlitros
µm	Micrômetro
ml	mililitro
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MS	Ministério da Saúde
nm	nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
%	Porcentagem
pH	Potencial hidrogeniônico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RMC	Região Metropolitana de Curitiba
RS	Regionais de Saúde
RNA _m	RNA mensageiro
SESA	Secretaria de Estado da Saúde do Estado

SMS	Secretaria Municipal de Saúde
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas,
RT-PCR	transcrição reversa por PCR
FDA	U. S. Food and Drug Administration
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFC/g	Unidade Formadora de Colônias/g
USDA	United States Department of Agriculture
UFPR	Universidade Federal do Paraná
VISA	Vigilância Sanitária
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana

1. INTRODUÇÃO

O Dicionário Aurélio (2004) descreve o vocábulo sorvete como oriundo do turco *xorbet*, do francês *sorbet* e do italiano *sorbetto*. A palavra sorvete é uma onomatopéia ao ato de sorver (FERREIRA, 2004).

Os alimentos conhecidos como sorvetes de massa possuem sua classificação no ordenamento jurídico brasileiro como “gelados comestíveis”. Os gelados comestíveis são obtidos através da emulsão de gorduras e proteínas, com ou sem adição de outros ingredientes e substâncias, ou de uma mistura de água, açúcares e outros ingredientes e substâncias, as quais tenham sido submetidas ao congelamento, em condições que garantam a conservação do produto no estado congelado ou parcialmente congeladas (ANVISA, 1999).

MARSCHALL e ARBUCKLE (1996) definiram sorvete como uma mistura pasteurizada e homogeneizada de leite e outros ingredientes, que pelo processo de agitação, incorpora ar proporcionando características de suavidade e maciez ao produto congelado.

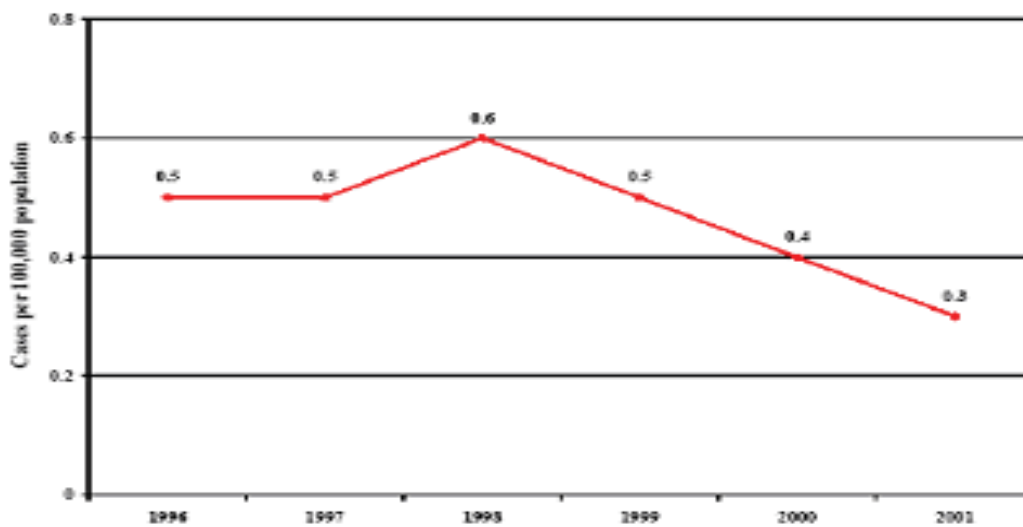
A microbiota dos sorvetes está diretamente relacionada com a procedência dos diversos ingredientes utilizados (ICMSF, 1991). No Brasil, a legislação sanitária obriga o tratamento térmico da mistura dos gelados comestíveis elaborados com produtos de laticínios e ovos. Este tratamento tem a finalidade de evitar a possível proliferação de patógenos, entre eles, a *Listeria monocytogenes* (ANVISA, 1999).

No Reino Unido, um surto de infecção alimentar por *Salmonella enteritidis* foi notificado no ano de 1996, quando trinta crianças participantes de uma festa de aniversário apresentaram sintomas como diarreia e febre. As investigações epidemiológicas revelaram que o alimento responsável foi o sorvete de produção

artesanal servido na ocasião, o qual havia sido fabricado com ovos frescos (DODHIA et al., 1998).

Dados do CDC (figura 01) indicam que a listeriose associada a alimentos nos Estados Unidos da América, oscilou entre 0,4 a 0,5 (para cada 100.000 habitantes), entre os anos de 1996 a 2001.

FIGURA 01: INCIDÊNCIA DE LISTERIOSE NOS EUA



FONTE: CDC - Center of Disease Control. 2003

No ano de 1998, a Secretaria de Estado da Saúde do Paraná - Laboratório Central do Estado, analisou 77 amostras de sorvete de massa revelando que 41 amostras (53%) se encontravam em desacordo com os padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação vigente (PARANA, 2001).

1.2 JUSTIFICATIVA

A pesquisa foi motivada pela existência na 2ª Regional de Saúde (Região Metropolitana de Curitiba) de 40 fábricas de gelados comestíveis. São pequenas empresas de produção sazonal. Pelo seu porte e estágio tecnológico, não apresentam todas as condições higiênico-sanitárias condizentes com as boas práticas de fabricação.

Considerando a situação supramencionada a presente pesquisa é justificada pela possível presença de bactérias patogênicas nos gelados comestíveis produzidos por essas microempresas da Região Metropolitana de Curitiba.

O Comitê para Higiene de Alimentos do Codex Alimentarius, entretanto, admite a existência de dificuldades para as pequenas empresas em adotar todas as recomendações apresentadas no guia para aplicação (FAO, 2001).

O ponto de partida da pesquisa foi a investigação da seguinte Hipótese:

“Se uma vez detectada a incidência de Listeria monocytogenes em gelados comestíveis e de outros microrganismos em gelados comestíveis, então medidas de rastreamento poderão ser implementadas objetivando a detecção da fonte de contaminação, dando suporte à Vigilância Sanitária e Epidemiológica para ações de orientação, controle e prevenção”.

1.3 OBJETIVO

1.3.1 Geral

- Conferir a possível contaminação microbiológica em gelados comestíveis produzidos por pequenas empresas de produção sazonal da Segunda Regional de Saúde composta pelos municípios da Região Metropolitana de Curitiba - RMC.

1.3.2 Específicos

1. Realizar através do método VIP (Ensaio Visual de Imunoprecipitação) a pesquisa do gênero *Listeria* spp. (pesquisa não obrigatória pela legislação vigente para gelados comestíveis) como método de triagem intermediário à pesquisa da espécie *Listeria monocytogenes*.
 - Detectar, subsidiariamente através de metodologia convencional (cultivo em placas e provas bioquímicas), o perfil da contaminação microbiana dos gelados comestíveis, em relação à RDC 12 de 02.01.2001 – ANVISA/MS.
 - Verificar através de ensaios microbiológicos para coliformes totais, as condições higiênico-sanitárias do local de fabricação dos gelados.
 - Comparar os dados obtidos das análises microbiológicas aos dados obtidos em banco de dados / pesquisas anteriores.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 GELADOS COMESTÍVEIS

Os gelados comestíveis não possuem uma data ou período de invenção, mas foram desenvolvidos através dos séculos, até chegar ao produto que se conhece atualmente (BACCARIN, 2000).

Indícios indicam que o surgimento do sorvete data de 2.300 anos atrás, sugerindo que os chineses misturavam polpa de frutas à neve para preparar uma bebida apreciada pelos Imperadores (IDFA, 2004; GOFF, 2003).

Consta que no ano de 62 da era Cristã, o imperador Nero, em Roma, enviava escravos às montanhas dos Alpes em busca de neve e gelo, estes seriam utilizados para resfriar bebidas e preparar um alimento a base de suco de frutas e mel (IDFA, 2003 e GOFF, 2003). No século XIII, por volta de 1292, Marco Pólo, ao retornar de sua viagem à China, teria trazido para a Itália receitas de bebidas com a mistura de gelo e suco de frutas (BACCARIN, 2000).

As lendas continuam com as receitas de sorvete que Catarina de Médici levou para a França, no século XVI em 1533, quando se casou com Henrique II (IDFA, 2002). Na Inglaterra, Carlos I foi presenteado com o cozinheiro De Mirco, vindo da corte francesa, o qual preparava sorvete cremoso a base de leite. O rei teria recompensado seu cozinheiro com uma pensão vitalícia, com a condição de que não divulgasse a receita. Assim, o sorvete se manteve como uma prerrogativa real (BACCARIN, 2000; GOFF, 2001).

Os italianos foram os primeiros europeus a desenvolver receitas de sorvetes sendo que, a partir de 1500, o produto começou a ser difundido por toda a Europa. Foi nos últimos dois séculos (anos 1800 e 1900) do segundo milênio que esse produto teve um grande avanço tecnológico e uma maior expansão de seu consumo (SIBÉR, 1999).

A primeira máquina de fabricar sorvetes surgiu em Nova Jersey – EUA, quando Nancy Johnson, em 1843, inventou um congelador manual (figura 02) revestido de gelo adicionado de sal, no qual a mistura era agitada até o congelamento (IDFA, 2002).

FIGURA 02: PROTÓTIPO DE MÁQUINA DE SORVETE DESENVOLVIDO POR NANCY JOHNSON EM 1843



FONTE: San Diego Historical Society Museum. Curatorial Collections. 2004

August Gaulin, em 1901, inventou o homogeneizador, destinado a aprimorar a textura suave do sorvete. Com o surgimento da refrigeração mecânica, o primeiro congelador horizontal surgiu em Canton, Ohio – EUA, em 1926. Os equipamentos contínuos foram desenvolvidos por Clarence Vogt, em Louisville, Kentucky - EUA (IDFA, 2002). Em 1896, em New York – EUA, o imigrante italiano Ítalo Marchiony inventou o cone de *waffle* para sorvete (IDFA, 2002).

No Brasil, em 1834, o sorvete surgiu quando um navio norte-americano aportou na Baía de Guanabara, carregando duzentas toneladas de gelo. Essa carga foi adquirida pelos comerciantes Derche e Fallas, que a revenderam em suas confeitarias, na forma de sorvetes e refresco a base de frutas tropicais. Em 1941 foi inaugurada a Kibon, a primeira indústria de sorvetes do Brasil (COSTA e LUSTOZA, 2000).

2.1.1 Definição e Classificação

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, os gelados comestíveis são produtos alimentícios obtidos de uma emulsão de gordura e proteínas, com ou sem a adição de outros ingredientes e substâncias, ou de uma mistura de água, açúcares e outros ingredientes e substâncias que tenham sido submetidas ao congelamento, em condições tais que garantam a conservação do produto no estado congelado ou parcialmente congelado, durante a armazenagem, o transporte e a entrega ao consumo (ANVISA, 1999).

Esses produtos são obtidos por congelamento, sob contínua agitação, a partir de uma mistura básica pasteurizada e homogeneizada antes do congelamento, composta de ingredientes lácteos ou não, açúcares, corantes, aromatizantes, estabilizantes, emulsificantes, entre outros aditivos, visando atender aos padrões definidos para sólidos totais com a incorporação de ar e assegurar a conservação do produto (MARSHALL e ARBUCKLE, 1996).

Do ponto de vista da tecnologia, os gelados comestíveis podem assim ser definidos: uma emulsão de óleo em água que, mediante de um processo de batimento e congelamento, incorpora ar, gerando um produto cremoso no estado semi - sólido (SIBÉR, 1999).

Segundo a ANVISA (1999), os gelados comestíveis são classificados de acordo com o processo de fabricação e apresentação ou pela sua composição e considerados como:

- a. Sorvetes de massa ou cremosos: misturas homogêneas ou não de ingredientes batidas e resfriadas até o congelamento, resultando em massa aerada;
- b. Picolés - porções individuais de gelados comestíveis de várias composições, geralmente suportadas por uma haste ou palito obtido por resfriamento até o congelamento, de mistura homogênea ou não de ingredientes, com ou sem batimento;
- c. Produtos especiais gelados - gelados mistos, constituídos por quaisquer das modalidades de gelados comestíveis, em combinação com alimentos não gelados, representados por porções situadas interna ou externamente ao conjunto, tais como sanduíche de sorvete, bolo de sorvete e torta gelada.

Ainda, segundo a ANVISA (1999), considerando-se a composição do produto, os gelados comestíveis se classificam em:

- a. Sorvetes de creme - produtos elaborados basicamente com leite e/ou derivados lácteos e/ou gorduras comestíveis, podendo ser adicionados de outros ingredientes alimentares;
- b. Sorvetes de leite - produtos elaborados basicamente com leite e/ou derivados lácteos, podendo ser adicionados de outros ingredientes alimentares;
- c. Sorvetes - produtos elaborados basicamente com leite e/ou derivados lácteos e/ou outras matérias-primas alimentares, nos quais os teores de gordura e/ou proteína são total ou parcialmente de origem não láctea, podendo ser adicionados de outros ingredientes alimentares;

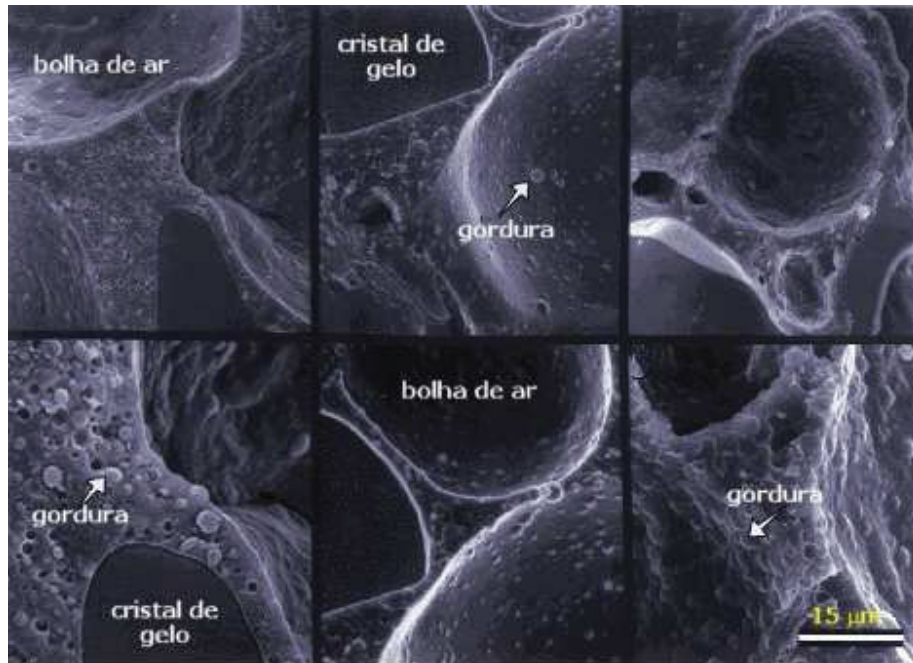
- d. *Sherbets* - produtos elaborados basicamente com leite e/ou derivados lácteos e/ou outras matérias-primas alimentares e que contêm apenas uma pequena proporção de gorduras e proteínas, as quais podem ser total ou parcialmente de origem não láctea, podendo ser adicionados de outros ingredientes alimentares;
- e. Gelados de frutas - produtos elaborados basicamente com polpas, sucos ou pedaços de frutas e açúcares, podendo ser adicionados de outros ingredientes;
- f. Gelados - produtos elaborados basicamente com açúcares, podendo ou não conter polpas, sucos ou pedaços de frutas e outras matérias-primas, podendo ser adicionados de outros ingredientes.

2.1.2 Estrutura

A forma com que o consumidor percebe o sabor e a textura do sorvete está baseada na estrutura desse alimento, considerada como um dos seus principais atributos. O sorvete possui a estrutura de um colóide complexo (figura 03), formado por bolhas de ar, glóbulos de gordura, cristas de gelo e por uma fase aquosa não congelada. A fase contínua é a água onde está dissolvida a maioria dos ingredientes. A fase descontínua é composta por ar e gordura (GOFF, 1997).

Nas figuras 03-A e 3-B, obtida pela técnica de Microscopia de Varredura Eletrônica (SEM), pode-se observar dispersos na solução de açúcar, as várias fases do sorvete: bolhas de ar, glóbulos de gordura e os cristais de gelo.

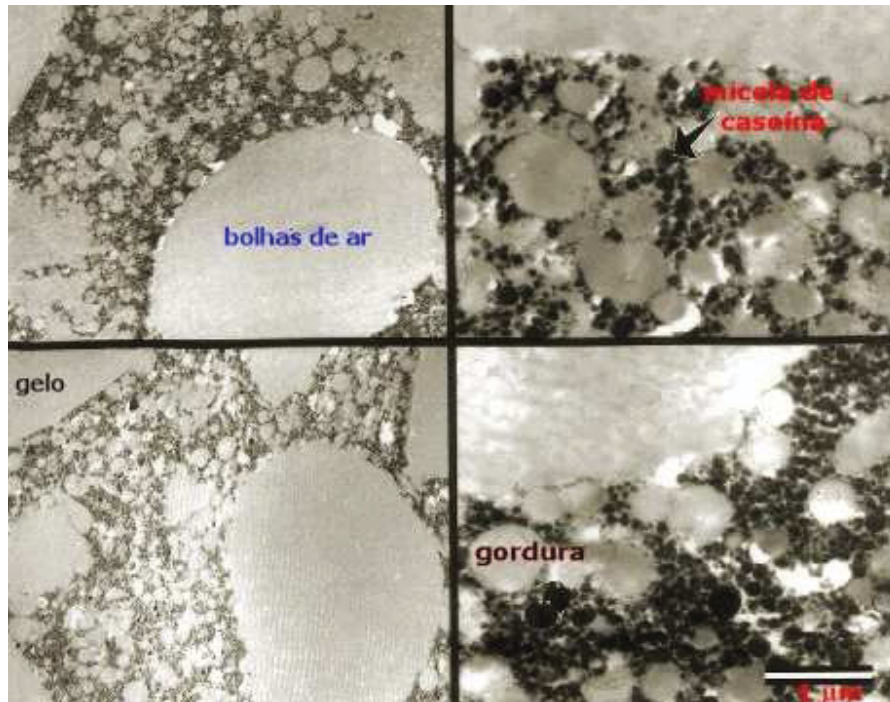
FIGURA 03 - A: COLÓIDES – GELADOS COMESTÍVEIS



Fonte: International Dairy Journal 9 (1999) 817-819

Através de outra técnica (figura 03-B), (*TEM, Microscopia de Transmissão Eletrônica*) é possível ver as micelas de caseína próximas aos glóbulos de gordura.

FIGURA 03 -B: COLÓIDES – GELADOS COMESTÍVEIS



Fonte: International Dairy Journal nº 9 (1999).

Os cristais de gelo e as bolhas de ar possuem dimensões em torno de 20 a 50 μm . As bolhas de ar encontram-se revestidas por glóbulos de gordura e esses cobertos por camadas de proteínas e emulsificantes. A fase aquosa consiste de açúcares e polissacarídeos de alto peso molecular em uma solução concentrada congelada. A estrutura do sorvete também pode ser definida como uma espuma parcialmente congelada. Cristais de gelo e bolhas de ar ocupam a maior parte do espaço. Os finos glóbulos de gordura, alguns deles floculados e rodeando as bolhas de ar, também formam a fase dispersa. Proteínas e emulsificantes encontram-se em torno dos glóbulos de gordura. A fase contínua consiste de uma solução não congelada de alta concentração de açúcares (GOFF, 1997).

2.1.3 Composição

GOFF (1997) ressalta que a proporção dos componentes se faz por peso tanto da mistura como do sorvete congelado. Quando congelado, cerca da metade do volume do produto se constitui de ar, ao passo que a proporção dos componentes por volume pode se reduzir pela metade. A formulação dos gelados comestíveis está na dependência dos ingredientes utilizados para suprir seus componentes. Inicialmente, os ingredientes para fabricação de sorvetes eram leites, cremes, açúcares e estabilizantes. Atualmente é utilizada uma grande gama de ingredientes, considerando características como custo, propriedades de manipulação (viscosidade, ponto de congelamento e aeração), aroma, corpo, textura, valor nutricional, cor e palatabilidade do produto final.

2.1.4 Processo de fabricação

GOFF (1997) classifica, resumidamente, o processo de fabricação de sorvetes nas seguintes etapas:

- Preparo de mistura;
- Homogeneização;
- Pasteurização;
- Amadurecimento;
- Batimento;
- Congelamento (sorvete pronto).

2.1.4.1 Preparo de mistura

Todos os ingredientes são dissolvidos em grandes tanques de aço inoxidável, providos de agitação. Em ordem de adição, são colocados no tanque: água,

leite, açúcar, manteiga e outros ingredientes de pequenas quantidades como estabilizantes e corantes alimentícios. Durante a adição dos ingredientes, aquece-se a mistura a 70° C.

2.1.4.2 Homogeneização

Consiste em bombear a mistura ainda quente, em alta velocidade através de uma fina malha de aço. A mistura é homogeneizada com a finalidade de diminuir o tamanho das partículas, o que permite produzir um sorvete homogêneo.

2.1.4.3 Pasteurização

A mistura é aquecida e resfriada rapidamente em poucos segundos. O choque térmico provoca a destruição de toda e qualquer bactéria que possa fazer mal à saúde. A mistura chega a 80°C é mantida nessa temperatura por 20 segundos, depois é resfriada para 2°C.

2.1.4.4 Maturação

A mistura de sorvete homogeneizada e pasteurizada é acondicionada em grandes tanques sob agitação constante para manter a mistura uniforme. Nesta fase, completa-se o processo de fabricação do sorvete, adicionado quando necessário: suco de frutas, essências e corantes. Nesses tanques a mistura é resfriada a temperatura de 2°C.

2.1.4.5 Batimento

É a etapa em que o sorvete é produzido e adquire consistência cremosa. Através de tubulações, a mistura é levada até as bateadeiras que incorporam ar e congelam parcialmente a mistura, proporcionando consistência e cremosidade à massa de sorvete.

2.1.4.6 Congelamento

As embalagens cheias de sorvetes são colocadas em caixas de papelão e armazenadas em câmaras frias, com temperatura entre -30 e -35° C, até o congelamento total. Em seguida, o sorvete é carregado em frigoríficos e distribuído para pontos de venda.

2.2 MICRORGANISMOS PESQUISADOS E AS DTAs

No período de transição entre os séculos XX e XXI, a economia se globalizou, acarretando rápido movimento de pessoas e incorporação de novos valores aos hábitos alimentares. Da mesma forma, houve um aumento significativo na contaminação dos alimentos, tanto de ordem química quanto bacteriana. As contaminações têm extrapolado fronteiras transnacionais na ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (DTAs). Entre essas doenças se destacam as gastroenterites agudas de ocorrências isoladas ou em surtos epidêmicos.

A demanda aumentada de viajantes, turistas, migrações, implicou na elevação significativa no risco de transmissão de DTAs. Com milhares de pessoas cruzando países, diariamente, não é de se estranhar o incremento de disseminação de diversos patógenos contaminantes de produtos alimentares. Doenças emergentes e re-emergentes também acompanharam esse grave problema sanitário mundial (CAMARGO, 1999).

A estimativa anual sobre gastroenterites na América Latina, África e Ásia, com exceção da China, atingiu um bilhão de crianças com idade inferior a cinco anos, resultando em mais de cinco milhões de óbitos, sendo a maioria causada pelo consumo de alimentos contaminados (BECKERS, 1988). Mesmo na Europa, a mortalidade causada por doenças veiculadas por alimentos é apenas superada pelas

doenças respiratórias. Anualmente, ocorrem 50 mil casos de gastroenterite aguda, por milhão de habitantes. A cada ano, os Estados Unidos da América experimentam várias DTAs, mas somente uma pequena fração delas (menos de 10%) é registrada ou reconhecida. Desde 1980, inúmeros estudos têm mostrado que em torno de 6 a 80 milhões de casos ocorreram anualmente em todo o país, evidenciando-se 10.000 óbitos. O custo envolvido nesse processo é de cinco bilhões de dólares (NOTERMANS e GIESSEN, 1993).

No Brasil, apesar de tardiamente, está sendo implantado desde o ano de 1999 o Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica de Doenças Transmitidas por Alimentos e Água através do Centro Nacional de Epidemiologia do Ministério da Saúde. Com isso, pretende-se que todos os estados brasileiros passem a ter conhecimento dos principais problemas relacionados com os alimentos no tocante à saúde do consumidor. Existe uma necessidade em conhecer quais os principais locais, alimentos e contaminantes de alimentos causadores de danos à saúde, bem como, os fatores contribuintes para que esses agravos sejam dirimidos através de orientações dos manipuladores de alimentos visando a prevenção de surtos de DTAs (ANVISA, 1999).

A Secretaria de Estado da Saúde do Paraná vem estudando as DTAs desde 1978. Nesse período, aproximadamente 1700 surtos já foram notificados em todo o Estado. Essa informação permite orientar adequadamente os estabelecimentos alimentares, principalmente os que servem refeições coletivas, no sentido de manipular corretamente os alimentos para evitar a ocorrência de surtos de DTAs (CAMARGO, 1999). No Paraná, entre 1978 e 1999, foram identificados os seguintes agentes etiológicos em ordem de frequência: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* (CAMARGO, 1999).

O aprimoramento das investigações de DTAs é fundamental para orientar e assegurar a qualidade higiênico-sanitária na produção de alimentos, a qual teve sua importância ressaltada em virtude da queda de inúmeras barreiras comerciais entre as nações (NOTERMANS e GIESSEN, 1993).

O aumento da incidência de surtos epidêmicos produzidos por alimentos contaminados ou infectados demonstra que, a respeito dos avanços tecnológicos, este problema ocorre em nível mundial, implicando em mortalidade e perdas econômicas (GRAY e MOSSEL, 1992).

Uma combinação de fatores contribui para aumentar a incidência das toxinfecções, como as mudanças na produção, na distribuição e no consumo dos alimentos, associada à capacidade de adaptação dos microrganismos a um micro habitat, até então desconhecido, provocando surtos por novos agentes patogênicos. O diagnóstico laboratorial de DTAs visa o esclarecimento de ocorrências de natureza epidemiológica e sanitária relacionada com o consumo de alimentos. É do interesse das Políticas Públicas de Saúde à implementação combinada de ações tanto em nível governamental quanto na rede produtora e distribuidora de alimentos, beneficiando diretamente o público consumidor. Como as DTA são de alta incidência no país e como os respectivos agentes causais são multi-variados (bactérias, vírus, fungos), é de fundamental importância o domínio de técnicas específicas de diagnóstico laboratorial, de rápida aplicação na direção do diagnóstico, e ainda, preferencialmente, de baixo custo (BAIRD-PARKER, 1994).

Os gelados comestíveis são produtos derivados do leite, assim como é um ótimo meio para o crescimento microbiano com elevado valor nutricional, pH quase neutro (6,0 - 7,0) e de longo período de armazenamento (HONG KONG, 2001).

A microbiota dos sorvetes, antes do tratamento térmico a que deve ser submetida à mistura, está diretamente relacionada com a procedência dos diversos ingredientes utilizados (ICMSF, 1991).

Considerando seus ingredientes principais (leite, gorduras, açúcares, frutas e aditivos), associados ao estágio tecnológico dos locais de fabricação, os gelados comestíveis tornam-se alimentos de alto risco epidemiológico para o consumidor. No Brasil, a legislação sanitária determina como obrigatório o tratamento térmico da mistura dos gelados comestíveis elaborados com produtos de laticínios ou ovos. O método indicado é a pasteurização que pode ser feita de maneira rápida (temperatura alta / tempo curto), usando-se temperaturas superiores a 70° C por alguns segundos, ou de maneira lenta (temperatura baixa / tempo longo), com temperaturas entre 58° C e 70° C por alguns minutos (ANVISA, 1999).

Estudos de FALCÃO et al., (1983) com 24 amostras de sorvete não pasteurizadas evidenciaram que 66,6% dos produtos examinados se encontravam em condições sanitárias insatisfatórias, em razão da presença de coliformes totais acima dos limites permitidos. A presença de *Staphylococcus aureus* em 16,6% amostras tornava os produtos potencialmente perigosos à saúde do consumidor.

HOFFMANN et al., (1995) analisaram 9 amostras de diferentes sorvetes comercializados na cidade de São José do Rio Preto - SP. Os resultados obtidos indicaram que todas as amostras apresentaram-se em desacordo com um ou mais padrões da legislação brasileira, sendo constatada a presença de *Salmonella* sp em 100% das amostras. Os mesmos autores, repetindo a pesquisa no ano de 2000, com doze amostras de sorvete de uma mesma empresa, detectaram a presença de *Salmonella* spp. em 75% das amostras analisadas. Os produtos foram classificados

como potencialmente capazes de causar enfermidades transmitidas por alimentos e, portanto, impróprios para o consumo.

Estudos recentes promovidos por órgãos estaduais governamentais de controle sanitário dos alimentos, demonstram a necessidade de estabelecer ações de melhoria da qualidade sanitária dos gelados comestíveis. No Paraná, dados da Secretaria de Estado da Saúde revelaram que, das 77 amostras analisadas dessa categoria de produto, no ano de 1998, 41 (53%) encontravam-se em desacordo com um ou mais padrões microbiológicos estabelecidos pela Portaria nº 451/97-MS, que vigorava até janeiro de 2001. Dessas, 78% foi evidenciada a presença de coliformes totais e 46% de contagem padrão em placas acima dos limites. Ressalta-se que duas amostras revelaram a presença de *Staphylococcus aureus* e de *Escherichia coli* acima dos padrões permitidos, correspondendo a sorvetes envolvidos em surto de intoxicação alimentar. Naquele ano, 56 % das amostras foram classificadas como inaceitáveis para o consumo (PARANÁ, 2001).

No Estado de Minas Gerais, o serviço em Vigilância Sanitária da Secretaria de Estado da Saúde analisou 45 amostras de sorvetes coletadas em diversos estabelecimentos, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2001 (24 meses). Deste total, 9% das amostras foram condenadas por apresentarem coliformes fecais e estafilococos coagulase positiva acima dos limites permitidos (ORNELAS et al., 2002).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária em 2001 monitorou 863 amostras de gelados comestíveis. Detectou-se 199 amostras (23%) em desacordo com os padrões microbiológicos, 118 (14%) com rotulagem irregular e 36 (4%) que se encontravam tanto em desacordo com os padrões microbiológicos como com a rotulagem irregular (ANVISA, 2002).

2.2.1 *Listeria monocytogenes*

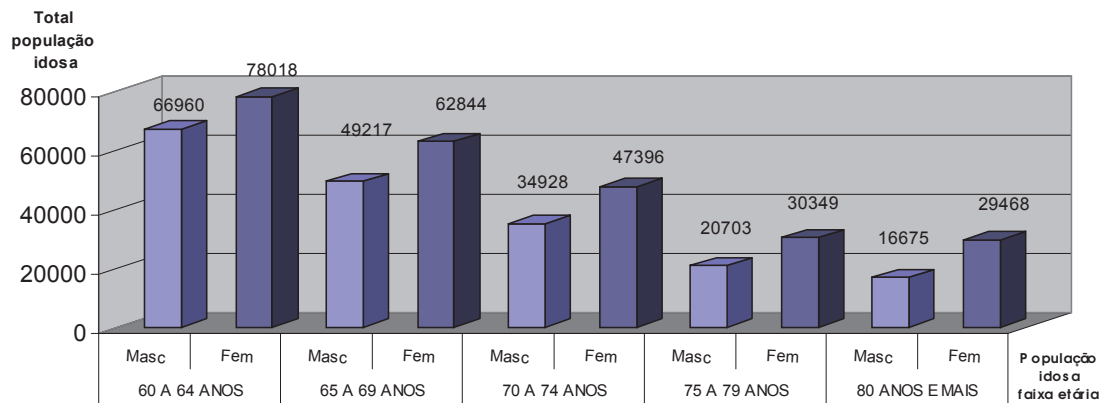
O segmento da população considerado de maior risco de desenvolver listeriose de origem alimentar é constituído por crianças, mulheres grávidas, imunodeprimidos e idosos. Este último grupo de risco é composto por um expressivo universo de 225.279 habitantes na região Metropolitana de Curitiba. Dados da Secretaria de Estado da Saúde referentes ao ano de 2004 (tabela 01 e figura 04) representa a mesma área geográfica elegida para a coleta das 60 amostras de gelados comestíveis para esta pesquisa durante o ano de 2004. Com o aumento da expectativa de vida, o grupo dos idosos tende a ser o mais suscetível devido ao envelhecimento da população brasileira. Existem ainda outros grupos de risco menores como indivíduos debilitados por outras doenças como cirrose, hepatite e câncer (OBLINGER, 1988). A susceptibilidade individual depende de vários fatores como imunodeficiência, estado nutricional e fisiológico, infecções concorrentes ou recentes e da condição do trato gastrointestinal (BAIRD - PARKER, 1994).

TABELA 01: PRINCIPAL POPULAÇÃO DE RISCO LISTERIOSE - IDOSOS. 2^a RS METROPOLITANA

MUNICÍPIOS	60 A 64 ANOS		65 A 69 ANOS		70 A 74 ANOS		75 A 79 ANOS		80 ANOS E MAIS		TOTAL	TOTAL	TOTAL
	MASC	FEM	MASC	FEM	MASC	FEM	MASC	FEM	MASC	FEM	MASC	FEM	GERAL
Adrianópolis	120	115	101	80	67	72	48	46	46	44	382	357	739
Agudos do Sul	131	123	97	81	65	70	62	39	30	25	385	338	723
Almirante Tamandaré	867	922	637	687	378	463	236	262	176	217	2.294	2.551	4.845
Araucária	1.011	1.033	755	822	506	588	266	345	239	330	2.777	3.118	5.895
Balsa Nova	159	172	105	93	92	97	46	61	40	40	442	463	905
Bocaiúva do Sul	152	131	134	105	78	94	63	48	50	38	477	416	893
Campina Grande do Sul	391	402	308	285	175	200	101	105	84	94	1.059	1.086	2.145
Campo do Tenente	86	71	80	66	43	48	30	14	25	29	264	228	492
Campo Largo	1.264	1.295	905	987	548	747	397	466	287	389	3.401	3.884	7.285
Campo Magro	266	244	174	186	110	119	81	65	57	69	688	683	1.371
Cerro Azul	254	217	198	178	147	131	89	68	83	87	771	681	1.452
Colombo	1.933	2.029	1.227	1.518	874	1.046	495	595	411	516	4.940	5.704	10.644
Contenda	184	182	141	155	102	120	71	86	47	87	545	630	1.175
Curitiba	20.525	25.618	15.151	21.082	11.042	16.330	6.461	10.729	5.227	10.747	58.406	84.506	142.912
Doutor Ulysses	102	83	73	56	49	26	32	22	22	15	278	202	480
Fazenda Rio Grande	607	600	430	485	304	301	157	168	111	159	1.609	1.713	3.322
Itaperuçu	207	189	149	127	96	99	90	72	54	59	596	546	1.142
Lapa	552	636	457	504	353	401	216	263	171	188	1.749	1.992	3.741
Mandirituba	271	256	235	215	158	167	93	89	67	72	824	799	1.623
Piên	117	108	89	90	69	81	48	42	35	36	358	357	715
Pinhais	1.110	1.205	817	962	514	645	291	412	296	408	3.028	3.632	6.660
Piraquara	756	762	522	596	382	414	202	229	160	266	2.022	2.267	4.289
Quatro Barras	203	187	150	164	98	96	47	62	32	57	530	566	1.096
Quitandinha	258	240	218	205	137	133	74	81	63	66	750	725	1.475
Rio Branco do Sul	363	332	298	237	195	148	121	114	97	100	1.074	931	2.005
Rio Negro	389	437	286	327	207	309	140	171	99	185	1.121	1.429	2.550
São José dos Pinhais	2.163	2.426	1.586	1.854	1.116	1.294	661	840	535	689	6.061	7.103	13.164
Tijucas do Sul	208	192	162	158	113	113	65	68	61	56	609	587	1.196
Tunas do Paraná	51	50	38	51	39	38	29	13	23	13	180	165	345
TOTAL	34.700	40.257	25.523	32.356	18.057	24.390	10.712	15.575	8.628	15.081	97.620	127.659	225.279

FONTE: Secretaria de Estado da Saúde. 2004

FIGURA 04 NÚMERO DE POPULAÇÃO IDOSA ABRANGENDO A FAIXA ETÁRIA DE 65 ANOS EM DIANTE ÁTE 80 E ACIMA, DA 2ª RS NA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA, PARANA. 2004



FONTE: Secretaria de Estado da Saúde. 2004

WINDRANTZ e ARIAS (2000) avaliaram a presença de *Listeria monocytogenes*, coliformes totais e fecais *Escherichia coli*, *Listeria spp.* y *Salmonella spp.* em 65 amostras de gelados comestíveis caseiros e de origem comercial. A análise revelou que 37,1% dos gelados caseiros e 20% dos comerciais não cumpriam normas internacionais higiênico-sanitárias para coliformes totais, assim como ainda evidenciou que 82,9% dos gelados caseiros e 56,7% dos comerciais apresentaram coliformes fecais. *Escherichia coli* foi isolada em 51,4 % dos gelados caseiros e 26,7 % dos comerciais. Foram realizados 16 isolamentos de *Listeria spp.* 50% correspondeu a *Listeria monocytogenes* e 50 % a *Listeria innocua*. A presença total de *Listeria monocytogenes* nas amostras de gelado foi de 12,3% que em todos os casos foi isolada a partir de gelados caseiros. Não foi encontrada *Salmonella spp.* nas amostras analisadas.

MONGE (1994) pesquisou a presença de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em amostras de sorvetes pasteurizados em 20 amostras de queijo suave. As amostras foram adquiridas em dez sorveterias e 20 supermercados de San José, Costa Rica, selecionados aleatoriamente. O processamento das amostras e da identificação bacteriológica se realizou segundo a metodologia recomendada pela International Dairy Federation. Foi identificada *Listeria monocytogenes* em 2% e 45% das amostras de sorvete e de queijo, respectivamente. *Escherichia coli* foi evidenciada em todas as amostras de queijo, o que evidencia uma alta contaminação com matéria fecal.

Listeria monocytogenes é um patógeno que causa doença em indivíduos imunodebilitados. Mesmo havendo probabilidade de risco para todos os consumidores, este patógeno é potencialmente patogênico para neonatos, prematuros, idosos, gestantes e pacientes imunodeprimidos, isto é, indivíduos com a imunidade comprometida ou propensa (LOGUERCIO et al., 2001).

Em geral, a listeriose causa sintomas típicos de gripe. Em recém-natos e idosos, pode desenvolver meningite, septicemia e óbito (KLIMA e MONTVILLE, 1995). Isto fez com que as indústrias alimentícias, as autoridades de Saúde Pública e pesquisadores em vários países redobrassem a atenção quanto à presença da *Listeria monocytogenes* (LOGUERCIO et al., 2001).

Considerando a sua ampla distribuição no ambiente e a sua presença no trato intestinal de vários animais, esse patógeno pode contaminar o leite e derivados, carnes, aves e vegetais. Os surtos descritos na literatura estão geralmente associados ao leite, ao queijo tipo mexicano e ao repolho (GILBERT, 1994).

Provavelmente, os hábitos alimentares contemporâneos contribuíram para aumentar a listeriose, já que a sua natureza psicrotrófica permite o crescimento durante o armazenamento e distribuição sob refrigeração (DOYLE, 1988).

Segundo FRANCO (1996), *Listeria monocytogenes* apresenta crescimento na faixa de 2,5° C a 44° C, embora existam relatos sobre seu crescimento a 0° C. Este microrganismo suporta repetidos congelamentos e descongelamentos. Por isso, a preocupação se tornou ainda maior, pois o risco de listeriose aumenta na proporção direta da produção crescente de alimentos frescos e processados prontos para o consumo e que usualmente são conservados à temperatura de refrigeração (LOGUERCIO et al., 2001).

Os métodos tradicionais para a detecção de *Listeria monocytogenes* em alimentos, baseiam-se na utilização de meios de cultivos específicos para o isolamento e contagem dos microrganismos viáveis, seguidos por testes confirmativos bioquímicos e sorológicos. Essa metodologia é extremamente trabalhosa, além de requerer condições rígidas de biossegurança em virtude da virulência deste microrganismo, bem como o tempo para sua realização que dura em média de 5 a 10 dias (KLEIN e JUNEJA, 1997).

O desenvolvimento de novas metodologias para a identificação de *Listeria monocytogenes* e outros patógenos emergentes ou re-emergentes, causadores de doenças de origem alimentar como *Yersinia enterocolítica*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* e *E coli* O157 H7, fornece subsídios para o desenvolvimento de medidas políticas, legislativas, priorização de áreas de pesquisa e avaliação de programas de controle de surtos epidêmicos (NOTERMANS e GIESSEN, 1993).

2.2.2 Características gerais do gênero *Listeria*

Listeria spp. é um microrganismo que está amplamente disseminado na natureza (ubiquidade microbiológica). É um organismo anaeróbio facultativo e tem a tendência a se dispor em paliçada, fato evidenciado em esfregaços comuns (PICCHI et al., 1999).

Listeria spp. foi descrita pela primeira vez no ano de 1926 por MURRAY e colaboradores como a causadora de doenças entre cobaias de laboratório e coelhos do Departamento de Patologia da Universidade de Cambridge. Os mesmos autores propuseram o nome de *Bacterium monocytogenes* para o novo microrganismo devido à elevação característica nos valores sanguíneos de leucócitos mononucleares.

O nome do gênero foi escolhido em honra ao cirurgião Lord Lister. A partir de 1940, o gênero foi modificado para *Listeria*. O vocábulo *Listeria* era a denominação de um grupo protozoa (MURRAY et al., 1926; PIRIE, 1940; LOVETT, 1989; DONNELL et al., 1992). Por outro lado, a literatura relata que, entre 1891 e 1911, tinha sido descrito um organismo muito semelhante à *Listeria monocytogenes* (BAHK e MARTH, 1990).

A relação entre *Listeria* e outras bactérias permaneceu obscura até a década de 1970. A bactéria não era citada nas três primeiras edições do Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey, publicadas em 1923, 1925 e 1930. Na edição de 1934, *Listeria* foi incluída na tribo Kurthia, da família *Corynebacteriaceae* (ROCOURT, 1999). A partir da oitava edição desse Manual, *Listeria* foi considerada como um gênero com afiliação incerta e classificada juntamente com *Erisipelothrix* e *Cayophanon*, e em seguida na família *Lactobacillaceae* (LOVETT, 1989; ROCOURT, 1999). Por fim, em 1986, no Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey, *Listeria* foi classificada na seção de bacilos gram-positivos, regulares e não esporulados,

juntamente com *Lactobacillus*, *Erysipelothrix*, *Brochothrix*, *Renibacterium*, *Kurthia* e *Cayophanon* (SEELINGER e JONES, 1986; HOLT et al., 1994; ROCOURT, 1999).

Por vários anos, o gênero *Listeria* continha apenas uma espécie: *Listeria monocytogenes*. Posteriormente, foram incluídas as espécies *Listeria denitrificans*, em 1948, *Listeria grayi*, em 1966, *Listeria murrayi*, em 1971, *Listeria innocua*, em 1981, *Listeria welshimeri* e *Listeria seeligeri*, em 1983, e *Listeria ivanovii*, em 1985 (ROCOURT, 1999).

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

Análises filogenéticas e métodos de biologia molecular permitiram uma melhor observação da diversidade dentro do gênero *Listeria*, que atualmente contém seis espécies: *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*, *Listeria ivanovii* e *Listeria grayi*, como evidenciado pelos valores de homologia de DNA, seqüência 16rRNA, propriedades quimiotaxonômicas, análise de enzima multilocus (McLAUHLIN, 1997; ROCOURT, 1999; DONNELL, 2001).

Listeria denitrificans foi reclassificada para *Jonesia denitrificans*, e *Listeria murrayi* foi reclassificada como uma subespécie de *Listeria grayi* (JAY, 1996).

Além da *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri* e *Listeria ivanovii* são as espécies já detectadas em alimentos e no ambiente (JAY, 1996; MCLAUHLIN, 1997).

As espécies *Listeria ivanovii* e *Listeria seeligeri* foram associadas a quatro casos de listeriose humana. Entretanto, *Listeria seeligeri* é freqüentemente considerada

como microrganismo não patogênico (KLIMA e MONTVILLE, 1995). Entretanto, a única espécie, “consistentemente” patogênica para o homem é a *Listeria monocytogenes*. Existem 13 sorotipos de *Listeria monocytogenes* causadores de doença (PICCHI et al., 1999).

Quando *Listeria* spp. é inoculada por picada em ágar semi-sólido e incubada à temperatura de 20 a 25°C, desenvolve uma migração típica espalhando-se na parte superior do meio, 3 a 5 mm abaixo da superfície, e mantendo-se restrita à picada no fundo do tubo. Este tipo de migração produz um crescimento característico lembrando um guarda-chuva. A bactéria possui movimentos característicos em forma de tombamento ocorrendo somente em uma faixa estreita de temperatura de 20 a 25°C (SILVA et al., 1997).

Listeria spp. é catalase positiva e oxidase negativa. Fermenta a glicose produzindo, principalmente, ácido láctico. Apresenta teste positivo para vermelho de metila e Voges-Proskauer. Não utiliza citrato exógeno e não produz indol. Hidrolisa hipurato de sódio e esculina. Não hidroliza uréia, gelatina e caseína (SEELIGER e JONES, 1986).

A diferença entre as espécies baseia-se em testes de fermentação de carboidratos, produção de hemólise em ágar sangue, incluindo o teste Camp, e o teste de patogenicidade a camundongos (SEELIGER e JONES, 1986). Segundo DALLAS et al., (1995), *Listeria seeligeri* é menos hemolítica do que *Listeria monocytogenes*. Isto pode servir de diferenciação entre as espécies.

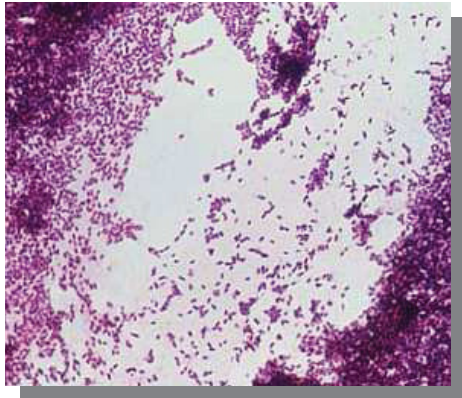
Em estudos sobre fermentação de carboidratos foi observado que *Listeria* spp. em condições anaeróbias utilizam somente hexoses e pentoses como substrato para seu crescimento. O crescimento rápido de *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* ocorre na presença de carboidratos, especialmente, quando é usada a glicose

como fonte de carbono. *Listeria murray* utiliza galactose, já a *Listeria ivanovii* e *Listeria seeligeri* são as únicas que fermentam xilose (SEELIGER e JONES, 1986, FARBER e PERTERKIN, 1994).

2.2.3 Descrição e taxonomia de *Listeria monocytogenes*

O agente etiológico da maioria dos casos de listeriose em humanos é *Listeria monocytogenes*, bacilo Gram-positivo, pequeno, curto, de 0,4-0,5 µm de diâmetro e 0,5-2 µm de comprimento, com extremidades arredondadas, que pode apresentar forma cocóide ou filamentosa, em culturas com 2-3 dias (figura 05) (FARBER; PETERKIN,1991; PHAN-THANH et al., 2000; LOVETT, 1989), podendo ser observados isolados ou em cadeias curtas (ROCOURT, 1999; RYSER e MARTH,1991; DONELLY,2001). Assemelha-se a cocos em culturas velhas e perde a habilidade em reter corantes de Gram, o que leva freqüentemente a erros de identificação (SEELIGER e JONES, 1986). Conseqüentemente, os membros do gênero *Listeria* têm sido algumas vezes classificados como *Corynebacterium* spp., *Haemophilus influenza*, *Erysipelothrix* spp, pneumococos, estreptococos ou estafilococos (RYSER e MARTH,1991; DONELL, 2001).

FIGURA 05: *Listeria monocytogenes* – MICROSCOPIA OPTICA / COLORAÇÃO DE GRAM



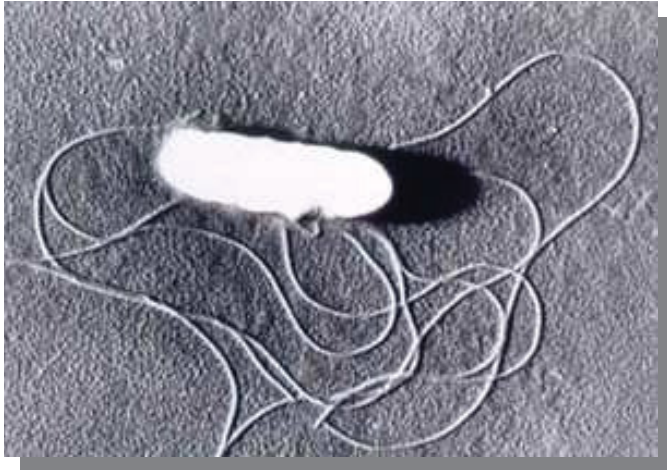
Fonte: Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology (2004).

É um microrganismo desprovido de cápsula, não formador de esporos (LOGUERCIO et al., 2001). *Listeria monocytogenes* multiplica-se tanto em aerobiose ou anaerobiose, mas prefere ambientes microaerofílicos (ROCOURT, 1999). Possui rápida multiplicação na maioria dos meios bacteriológicos, crescendo bem em caldo infusão cérebro coração (BHI), caldo soja tripticase e caldo tripticase (JAY, 1996). Requer biotina, riboflavina, tiamina e aminoácidos como cisteína, glutamina, isoleucina e valina. Em ágar nutriente, as colônias típicas de *Listeria* são cinza azuladas, apresentando de 0,2 a 0,8 mm de diâmetro após 24 horas de incubação (DONELL, 2001). As colônias, quando visualizadas a luz transmitida, em direção oblíqua, apresentam brilho azul-esverdeado (JAY, 1996; ROCOURT, 1999).

Listeria monocytogenes é um patógeno psicotrófico que se multiplica geralmente em temperaturas que variam de -0,4 °C a 50 °C, com multiplicação ótima entre 30 e 37 °C (DONELLY, 2001). Cresce bem em temperatura de refrigeração de 4 a 5 °C. Tem como características peculiares à relativa resistência térmica e capacidade

de multiplicação em temperatura de refrigeração. Possui flagelos peritríquios (figura 06) os quais dão ao microrganismo a característica de motilidade (PICHI et al., 1999).

FIGURA 06: ASPECTO MORFOLÓGICO DE *Listeria monocytogenes* – MICROSCOPIA ELETRÔNICA



FONTE: University Of Wisconsin-Madison Dep. Bacteriology. Kenneth Todar(2005).

Este comportamento ocorre somente em faixas restritas de temperatura (20° C a 25° C). Nessa temperatura, a colônia segue a linha de picada e em seguida distribuindo-se sobre o meio, lembrando o formato de um guarda-chuva (figura 07) (FARBER e PETERKIN, 1991; HOLT et al., 1994; ROCOURT, 1999). Pode tolerar concentrações de 10% a 30% de cloreto de sódio e crescer a uma atividade de água de 0,90, dependendo de fatores que influenciam a multiplicação, como pH e temperatura (LOVETT, 1989). Estudos com *Listeria monocytogenes* demonstram que o patógeno multiplica-se em valores de pH que variam de 4,4 a 9,6 com pH ótimo de crescimento de 7,0 (SCHUCHAT et al., 1991).

O patógeno apresenta reação catalase positiva e oxidase negativa; expressa Beta - hemolisina, produzindo uma zona de clareamento em ágar sangue (FARBER e PETERKIN, 1991; HOLT et al., 1994). Produz ácido por fermentação de glicose, frutose, manose, galactose, celobiose, maltose, melezitose, trealose e ramnose, sem

formação de gás; hidrolisa esculina, salicina, amigdalina e hipurato de sódio; apresenta teste vermelho metil positivo; produz amônia a partir da arginina; reage negativamente para produção de sulfeto de hidrogênio, indol e nitrato redutase; liquefaz gelatina; hidrolisa amido e uréia; reduz telurito; e é parcialmente inibido por 0,02% de azida e cianida (JAY, 1996).

FIGURA 07: PROVA DE MOTILIDADE A 25 ° C



FONTE: Instituto Pasteur. 2004.

Apesar das espécies de *Listeria* spp. serem fenotipicamente similares, elas podem ser diferenciadas pela produção de hemolisina, incluindo teste CAMP (Christie, Atkins e Munch-Petersen) e análise de patogenicidade em ratos (HOLT et al., 1994; ROCOURT, 1988; SEELINGER e JONES, 1986; SCHUCHAT et al., 1991), e pela produção de ácido a partir de *D*-xilose, *L*-ramnose e manitol. A atividade hemolítica é a característica mais importante e a mais difícil na identificação de *Listeria monocytogenes* (HOLT et al., 1994).

2.2.4 Mecanismos de transmissão de *Listeria monocytogenes*

PEARSON e MARTH (1980) sugerem que *Listeria monocytogenes* pode infectar o homem e outros animais pelas seguintes vias: oral, ocular, cutânea, respiratória ou urogenital. O trato intestinal é local de entrada para *Listeria monocytogenes* no organismo através das células epiteliais no ápice das microvilosidades. Então se difunde, não só pelo interior da célula, como também de uma célula para outra. Na fase seguinte, são ingeridas por macrófagos, mas não induzem uma resposta inflamatória significativa. As células de *Listeria monocytogenes*, uma vez dentro dos macrófagos, encontram-se protegidas dos leucócitos polimorfo nucleares (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

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

Listeria monocytogenes, bactéria intracelular facultativa, é um patógeno invasivo que penetra as células endoteliais decisiva para a patogenicidade de listeriose (KAYAL, et al., 1999).

Segundo PANDIRIPAILY et al., 1999, o aspecto chave para patogenicidade de *Listeria monocytogenes* é sua habilidade de invadir e multiplicar-se em fagócitos e não fagócitos. A adesão da *Listeria monocytogenes* presume-se que seja mediado por

moléculas na superfície da célula com receptores complementares presente na célula eucariótica.

2.2.5 Manifestações clínicas causadas por *Listeria* spp.

Listeriose, doença causada pelo gênero *Listeria*, já foi observada em animais por Hulphers em 1911, quando o gênero era chamado de *Listerella* (JAY, 1996).

A doença foi relatada em humanos pela primeira vez em 1929. A partir de então, a correlação entre *Listeria monocytogenes* e meningite em humanos (BAHK, 1990). Em 1933, foi associada com doença perinatal (JAY, 1996).

Em humanos, as manifestações associadas à *Listeria monocytogenes* incluem: meningoencefalite, sintomas de gripe, baixo grau de septicemia no período pré-natal, síndrome de mononucleoses, septicemia em adultos, pneumonia, endocardites, abscessos localizados, lesões cutâneas papular ou pustular (figura 08), conjuntivites, uretrites e ocorrência de abortos. Também pode causar danos cerebrais e retardamento mental (PEARSON e MARTH, 1980).

FIGURA 08: LISTERIOSE EM NEONATOS – LESÕES PUSTULARES



FONTE: Hospital Materno Infantil Madrid. Félix Omeñaca Teres.2004.

Os indivíduos preferencialmente atingidos são os neonatos, as gestantes, indivíduos na faixa etária acima de 60 anos e os imunodeprimidos. O índice de mortalidade nesses casos pode variar de 20 a 30% (RAINALDI et al., 1991; ICMSF, 1991; MCLAUCHLIN, 1996; ROCOURT, 1997).

As mulheres grávidas pertencem a um grupo de alto risco, uma vez que a infecção pode ser transmitida para o feto e causar aborto, natimorto ou parto prematuro. As gestantes geralmente não apresentam sintomatologia característica, podendo ocorrer em alguns casos sintomas semelhantes a um resfriado, com febre, mialgia e cefaléia. Através da corrente sangüínea da mãe, o microrganismo atinge o feto (infecção transplacentária) causando aborto geralmente no terceiro trimestre de gestação, ou doença no neonato. O período de incubação é de 10-20 dias, com desenvolvimento posterior de meningite. Cerca de 10% dos neonatos acometidos por meningite podem apresentar seqüelas (ROCOURT, 1996). A ocorrência de listeriose em mulheres gestantes e imunocomprometidas levaram a sugestão de que a listeriose pode ser uma importante doença não reconhecida em mulheres gestantes com imunidade deficiente (SCHLECH, 1996).

OJENIYI et al., (1996) ressaltam que *Listeria monocytogenes* é um patógeno oportunista de intoxicação alimentar que pode infectar a todos, mas as manifestações da doença são mais comuns em homens com o sistema imunológico comprometido. No rol destes, entram os que receberam tratamento como radioterapia, quimioterapia, diálises e corticóides.

Nos indivíduos imunossuprimidos ou idosos, geralmente pode ocorrer meningite ou meningoencefalite, devido ao tropismo do microrganismo pelo sistema nervoso central. Os casos de meningite apresentaram letalidade de 43,8%. Esta alta mortalidade que variou de 20 a 30%, para alguns autores resulta do fato de que

indivíduos com o sistema imunológico comprometido são mais suscetíveis a estas doenças (PEARSON e MARTH, 1980; DAVIES et al., 1984; LOVETT, 1989; TWEDT, 1994). Outra forma comum da doença nesses indivíduos é a septicemia. Também tem sido relatada a forma gastroentérica, em decorrência ao consumo de alimentos contaminados (DALTON et al., 1997).

A incidência de listeriose em gestantes varia, de acordo com relatos, de 4,7-30 casos por 100.000 nascimentos. Em pacientes transplantados, este valor sobe para 200 casos/100.000; pacientes com câncer, 13 casos/100.000; indivíduos com mais de 65 anos, 1,4 casos/100.000 e em indivíduos aidéticos a incidência varia de 52-115 casos/100.000. Considerando o conjunto dos indivíduos citados, em torno de 30% pode apresentar seqüelas. A taxa de portadores assintomáticos é de 5%, variando de 1 a 10%. Parece provável que em indivíduos saudáveis ocorram infecções auto-curáveis que não são diagnosticadas como listeriose (DAVIES et al., 1984, LOVETT 1989; TWEDT, 1994).

2.2.6 Importância da *Listeria monocytogenes* para saúde pública e na contaminação dos alimentos

A importância da *Listeria monocytogenes* para a saúde pública está no fato dela causar uma severa infecção em humanos e nos animais caracterizada por meningite, septicemia ou aborto. Vários surtos da enfermidade têm sido descritos pelo mundo. Na Europa e nos EUA diversos surtos de listeriose foram atribuídos ao consumo de leite pasteurizado e produtos de laticínio (FARBER e PETERKIN, 1991), vegetais crus e queijos de alta umidade (TOBIA et al., 1997).

Listeria monocytogenes de sorogrupo 4 está mais relacionada a surtos clínicos, enquanto que o sorogrupo 1/2 é o mais detectado em alimentos e o mais envolvido em casos esporádicos (JAY, 1996; SCHLECH, 1996).

Baseado nos casos de listeriose já diagnosticados estima-se que nos EUA exista uma incidência anual de 1600 casos, com aproximadamente 400 óbitos (SHANK et al., 1996). Já pelos dados do CDC, estima-se que anualmente ocorram 2493 casos de listeriose de origem alimentar com 499 óbitos, o que evidencia a *Listeria monocytogenes* como um dos cinco patógenos que mais causam óbitos nos EUA, sendo responsável por 28% do total de óbitos causados por doenças de origem alimentar (MEAD et al., 1999).

Apesar da magnitude da sintomatologia com possibilidades de seqüelas e da alta mortalidade, a incidência de listeriose é considerada baixa. Na Inglaterra em 1996 ocorreram 116 casos (DUGGAN e PHILLIPS, 1998).

Na Alemanha, avalia-se que ocorram 200 casos de listeriose/ano para uma população de 80 milhões. Isso resulta em aproximadamente três casos por um (3:1.10⁶) milhão de habitantes. Nos EUA, estes valores são de 4 a 5 casos por milhão. Esses dados mostram, segundo BUCHANAN et al., (1997) que a listeriose é uma doença relativamente rara.

Recentes estudos epidemiológicos têm indicado uma diminuição da incidência de listeriose humana em alguns países. Ao contrário, em outros países, o número de casos de listeriose tem aumentado. Isso pode ser devido ao aumento de detecções e interesse nas pesquisas desse patógeno ou pode ser decorrente de uma real modificação na prevalência da *Listeria monocytogenes* no ambiente e alimentos e conseqüentemente maior freqüência de exposição humana. O aumento da incidência nesses países também pode ser devido ao aumento da população susceptível, por exemplo, pessoas que sofrem de câncer, aidéticos, idosos ou pacientes transplantados (TAPPERO et al., 1995).

A quantidade de bactérias mínima infectante para causar a listeriose ainda não foi estabelecida, mas acredita-se que se fosse baixa, maior número de casos seriam relatados frente aos casos observados. Porém, segundo a *Food and Agriculture Organization* - FAO, a partir da análise de alimentos envolvidos em surtos e casos esporádicos de listeriose, encontraram-se tanto contagens elevadas (acima de 10^3 UFC/g) quanto contagens baixas (inferiores a 10^2 UFC/g). Partindo-se destes achados, pode-se dizer que quantidades de bactérias iguais ou maiores a 10^2 UFC/g de *Listeria monocytogenes*/g poderiam causar quadro de toxinfecção alimentar (FAO, 1999).

A quantidade de bactérias infectante dos patógenos de origem alimentar está relacionada, entre outros fatores, com as condições do hospedeiro, o nível de contaminação do alimento pelo patógeno, a quantidade ingerida de alimento e a virulência das cepas (FAO, 1999). Segundo DESEO (1999), a contaminação de alimentos com níveis acima de 10^3 UFC/g é considerada alta para a *Listeria monocytogenes*. Experimentos feitos com animais saudáveis indicaram que a ingestão de quantidades de *Listeria monocytogenes* entre 10^3 e 10^6 UFC seria suficiente para causar dano à saúde (MADDEN, 1992).

O habitat primário de *Listeria monocytogenes* é o solo e a água. Vegetais podem contaminar-se pelo solo ou adubos usados como fertilizantes. Animais podem carrear a bactéria sem apresentar doença, e assim contaminar os alimentos como carne e leite (CDC, 2003).

Não é de se duvidar que todos os alimentos ingeridos pelos humanos estejam contaminados pela *Listeria monocytogenes*. Ela também pode ser encontrada nos equipamentos e utensílios empregados pela indústria de processamento de alimentos (JEONG e FRANK, 1994; MANERU e GARCIA-JALÓN, 1995; RODRIGUES, 1999).

Convém ressaltar ainda a grande capacidade de a *Listeria monocytogenes* formar biofilme. Este fato torna ainda mais preocupante a presença desse microrganismo para a indústria de alimentos (ARCHER, 1990). Baseado nessas informações, a Organização Mundial de Saúde concluiu que a eliminação total de *Listeria monocytogenes* de todos os alimentos é impraticável e pode ser impossível. A maior importância da *Listeria monocytogenes* para a indústria de alimentos talvez seja o fato dela poder sobreviver e se multiplicar em temperatura de refrigeração. Este fator constitui num obstáculo para a maioria dos patógenos. Esse dado é relevante principalmente para os alimentos refrigerados prontos para consumo em caso de serem insuficientemente processados e/ou contaminados após o processamento (McCARTHY, 1997).

Segundo (McLAUHLIN, 1997), os alimentos implicados nos surtos de listeriose que causaram maior número de casos são aqueles produtos que permitem a multiplicação da *Listeria monocytogenes* em elevado nível antes do consumo. Fatores tais como pH, atividade de água, presença de conservantes e vida de prateleira, são utilizados como parâmetros para avaliar se um determinado alimento suporta ou não a multiplicação da *Listeria monocytogenes* (FARBER e PETERKIN, 1996). Com base nos dados obtidos com os surtos e casos esporádicos de listeriose ocorridos nas últimas décadas, pode-se afirmar que alguns alimentos são mais importantes que outros na veiculação do agente. Os alimentos de maior risco são:

- a) Os prontos para consumo, estocados sob refrigeração, com vida longa de prateleira;
- b) Os alimentos contaminados com populações elevadas de *Listeria monocytogenes* 100 UFC/g (ou ml). Deve-se ressaltar que alimentos prontos para consumo são aqueles que não necessitam de nenhum tipo de preparo antes do consumo.

Os alimentos prontos para consumo vêm tendo a sua produção aumentada em resposta à demanda por produtos de fácil consumo, com maior vida de prateleira, e também por serem mais práticos (JUNEJA et al., 1997). Isso tem contribuído para tornar a *Listeria monocytogenes* um aspecto de Saúde Pública ainda mais preocupante, pois por não requererem cocção antes do consumo e serem armazenados por vários dias em temperaturas de refrigeração, esses alimentos favorecem a multiplicação de *Listeria monocytogenes* (QVIST et al., 1994).

Os países apresentam condutas diferentes com relação aos limites toleráveis de *Listeria monocytogenes* por grama de alimento. Nos Estados Unidos da América se estabeleceu a chamada "Tolerância Zero", onde não é permitida a presença do patógeno em 25 gramas de qualquer tipo de alimento (SHANK et al., 1996). No Brasil, a RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA/MS (Quadro 01), determina a ausência de *Listeria monocytogenes* em 25g em vários tipos de queijo, porém, para os gelados comestíveis, não há exigência legal à pesquisa do referido patógeno.

Conforme a metodologia para amostragem, de acordo com a RDC 12, a coleta, o acondicionamento e o transporte para análise microbiológica de amostras de produtos alimentícios devem obedecer ao disposto pelo Codex Alimentarius; "International Commission on Microbiological Specifications for Foods" (ICMSF); "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" e "Standard Methods for the Examination of Dairy Products" da American Public Health Association (APHA); "Bacteriological Analytical Manual" da Food and Drug Administration, editado por Association of Official Analytical Chemists (FDA/AOAC), em suas últimas edições e ou revisões, assim como outras metodologias internacionalmente reconhecidas.

QUADRO 01: PADRÃO MICROBIOLÓGICO VIGENTE PARA GELADOS COMESTÍVEIS E PRODUTOS PARA O PREPARO DE GELADOS COMESTÍVEIS

	MICROORGANISMO	Tolerância para Amostra INDICATIVA	n	C	m	M
a) gelados comestíveis e produtos especiais gelados a base de leite e produtos lácteos (sorvetes e picolés com ou sem cobertura, sanduíche e bolo de sorvete) e similares; Preparados e concentrados para o preparo de gelados comestíveis	Coliformes a 45°C/g	50	5	2	10	50
	Estaf.coag.positiva/g	50 ²	5	2	10 ²	500
	<i>Salmonella</i> spp./25g	Ausência	5	0	Ausência	-
b) gelados comestíveis e produtos especiais gelados, de base não láctea (água, suco de fruta) e similares	Coliformes a 45°C/g	50	5	2	10	50
	<i>Salmonella</i> spp./25g	Ausência	5	0	Ausência	-
c) base, em pó ou líquida, para o preparo de gelados comestíveis.	Coliformes a 45°C/g(mL)	10	5	2	5	10
	<i>Salmonella</i> spp./25g (mL) (específico para os que contém ovos)	Ausência	5	0	Ausência	-

FONTE: ANVISA.2002

Notas: m: é o limite que, em um plano de três classes, separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável.

M: é o limite que, em plano de duas classes, separa o produto aceitável do inaceitável. Em um plano de três classes, M separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável. Valores acima de M são inaceitáveis.

n: é o número de unidades a serem colhidas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente. Nos casos nos quais o padrão estabelecido é ausência em 25g, como para *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* e outros patógenos, é possível a mistura das alíquotas retiradas de cada unidade amostral, respeitando-se a proporção p/v (uma parte em peso da amostra, para 10 partes em volume do meio de cultura em caldo).

c: é o número máximo aceitável de unidades de amostras com contagens entre os limites de m e M (plano de três classes). Nos casos em que o padrão microbiológico seja expresso por "ausência", c é igual a zero, aplica-se o plano de duas classes.

Inúmeros fatores físicos e químicos contribuem para essas diferenças de populações de *Listeria monocytogenes*, mas a falta de padronização de uma metodologia para enumeração de *Listeria monocytogenes* em alimentos, deve ser considerada (JAY, 1996).

2.2.7 Efeito das condições ambientais e de processamento na sobrevivência e crescimento de *Listeria* spp.

A presença de *Listeria* spp. em ambientes de processamento de alimentos ocorre devido à sobrevivência em aerossol ou em células aderindo às superfícies de contato. Desta forma, proliferando-se em micro colônias formando biofilme pela inadequada limpeza e higienização (SASAHARA e ZOTTOLA, 1993).

Listeria monocytogenes é um halo tolerante de altas concentrações de NaCl, sendo capaz de crescer em 10% de NaCl e a_w (atividade água) de 0,93. Algumas linhagens podem tolerar ambientes de 20% de NaCl e a_w de 0,83. Estudos mostraram que *Listeria monocytogenes* em ambientes com 25,5% de NaCl, sobrevive por 132 dias a 4° C, 32 dias à 22° C e 5 dias a 37° C (SEELIGER e JONES, 1986).

A atividade de água ideal para o crescimento de *Listeria* spp. é próxima de 0,97. Foi constatada a sobrevivência desse microrganismo em alimentos desidratados, indicando sua capacidade de tolerar atividade de água inferior a 0,93 (DOYLE et al., 1985).

2.2.8 Metodologias utilizadas para o isolamento de *Listeria* spp.

As metodologias para o isolamento de *Listeria monocytogenes* ainda estão em fase de aperfeiçoamento (HITCHINS e TRAN, 1990), tendo em vista os esforços de vários pesquisadores em aumentar as chances de recuperação e detecção da bactéria nos diversos alimentos e os resultados variados obtidos nos diferentes trabalhos realizados. Estas metodologias utilizadas são de suma importância devido à população do patógeno ser geralmente encontrada em baixos níveis quando comparada à microbiota natural. Assim, a metodologia aplicada deve possibilitar a detecção de pelo menos uma célula viável de *Listeria monocytogenes* em produtos prontos para o consumo ante o potencial de multiplicação do patógeno durante longos períodos de estocagem em temperatura de refrigeração, a esses produtos eventualmente serem consumidos sem o reaquecimento e a serem objeto de estudos microbiológicos na presença de qualquer nível de contaminação (KNABEL, 2002).

2.2.9 Metodologias convencionais para o isolamento de *Listeria monocytogenes*

As primeiras tentativas para isolar *Listeria* spp. em alimentos apresentaram relativo insucesso, uma vez que foi utilizada a metodologia de plaqueamento direto em meio ágar convencional (ágar sangue). As metodologias utilizadas para o isolamento de *Listeria monocytogenes* dos alimentos pelo plaqueamento direto não têm tido sucesso, particularmente no que se refere aos alimentos com grandes populações de microflora competidora. Porém, foi considerado que o plaqueamento direto possa ser utilizado para recuperar células injuriadas ou não de *Listeria monocytogenes*, a partir de alimentos que contenham baixas populações da microflora do alimento. De qualquer forma, os meios de isolamento que têm sido desenvolvidos para a recuperação do patógeno, envolvem a combinação com um prévio procedimento de enriquecimento.

(BAYLEY et al.,1990)

No plaqueamento direto, o alimento testado é homogeneizado com solução tampão, e diluições desta mistura são plaqueadas em meios seletivos. As placas são incubadas por 24-48 horas a 30° C. Após a incubação, colônias suspeitas de *Listeria* são contadas e confirmadas usando testes bioquímicos apropriados. Vários estudos têm sido realizados com o intuito de avaliar os meios sólidos, quanto à recuperação e contagem de *Listeria monocytogenes* em alimentos, utilizando-se o método de plaqueamento direto (LOESSNER et al., 1988; GOLDEN et al., 1988; CASSIDAY et al., 1989). Foi observado que a eficiência dos meios de cultura depende do tipo de alimento analisado, da população de *Listeria monocytogenes* e da microbiota acompanhante.

Pesquisa realizada por SMITH e ARCHER (1988) indicou que muitos meios usados no plaqueamento direto não são satisfatórios para recuperar células de *Listeria monocytogenes* que sofreram danos pelo aquecimento, devido à presença de agentes seletivos. Resultado semelhante foi obtido por GOLDEN et al., (1988) que compararam seis meios sólidos destinados à recuperação de células de *Listeria monocytogenes* danificadas pelo aquecimento e congelamento. Embora a recuperação de *Listeria monocytogenes*, injuriada pelo congelamento, não foi afetada pelo meio de cultura utilizado, a recuperação da bactéria, injuriada pelo aquecimento, variou significativamente entre os meios testados (GOLDEN et al., 1988).

Métodos tradicionais e métodos rápidos de detecção de *Listeria* utilizam uma etapa de enriquecimento da amostra para aumentar o microrganismo alvo, que pode estar em baixos níveis, injuriado ou sub-letalmente danificado (DONNELL, 2001; SILK et al., 2002). Logo, a detecção do patógeno em produtos alimentares pode ser limitada

pelo desempenho do meio de enriquecimento utilizado para a recuperação do microrganismo (SILK et al., 2002).

Entre os primeiros métodos utilizados para a recuperação de *Listeria monocytogenes* de amostras ambientais e de alimentos foi por enriquecimento a temperatura baixa (4° C). Essa técnica melhorou muito o índice de isolamento da bactéria. Esta técnica tem comprovado sucesso na recuperação de *Listeria monocytogenes* em amostras com elevada carga de microrganismos e alimentos (DOMINGUEZ et al., 1985). O método consiste na inoculação das amostras, suspeitas de contaminação, em caldo nutriente e armazenamento a 4° C. Uma porção da amostra é plaqueada em meio ágar seletivo e incubado por 24 horas. Se colônias de *Listeria* não forem isoladas, novas porções da amostra mantida em refrigeração são repicadas em placa semanalmente (GRAY e KILLINGER, 1966). O método tem como fundamento a natureza psicotrófica da bactéria e inoculação desta em caldo nutriente. Apesar de eficiente, este procedimento tem a desvantagem de requerer um período de incubação prolongado (podendo chegar a três meses, não sendo adequado para situações onde se necessita de resultados rápidos, como em investigações epidemiológicas de surtos, análise de alimentos suspeitos, e monitoramento de rotina de alimentos perecíveis e não-perecíveis (SWAMINATHAN et al., 1988).

Mais recentemente, a incorporação de agentes seletivos e diferenciais a base de lítio aos meios de enriquecimento, os quais devem inibir o crescimento de outros microrganismos que não a *Listeria*, mostrou-se vantajosa em relação ao enriquecimento a temperaturas baixas. O período de enriquecimento pode ser reduzido a poucos dias e a temperatura de incubação pode ser a ótima de crescimento do microrganismo. Durante as diversas etapas no processamento de alimentos, visando à eliminação de *Listeria monocytogenes*, como tratamento térmico, congelamento,

descongelamento, desidratação, irradiação, sanitização ou uso de aditivos alimentares como ácidos orgânicos ou seus sais, pode não haver a eliminação total do patógeno, resultando em células injuriadas (WARBURTON et al., 1992; SMITH e ARCHER, 1988; KNABEL, 2002; SILK et al., 2002).

A Tabela 02 demonstra a relação entre as etapas de subcultura, condições de incubação e meios de cultura utilizados na análise de *Listeria* spp. em alimentos pelos métodos recomendados por diferentes órgãos reguladores.

TABELA 02: ETAPAS DE SUBCULTURA, CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO E MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA ANÁLISE DE *Listeria* spp. EM ALIMENTOS PELOS MÉTODOS RECOMENDADOS POR DIFERENTES ÓRGÃOS REGULADORES

Órgão Regulador	Primeiro Enriquecimento	Segundo Enriquecimento	Plaqueamento Diferencial
FDA	LEB - 30°C/ 24 e 48 h	-	OXA 35°C/24 e 48 h LPM 30°C/24 e 48 h
USDA	UVM - 30°C / 24 h	Fraser 35°C/ 24 e 48 h	MOX - 35°C/24 e 48 h

FONTE: SILVA E JUNQUEIRA, 1995

Nota:

LEB = Caldo de Enriquecimento de *Listeria*
 UVM = Caldo Universidade de Vermont
 OXA = Placas de Ágar Oxford
 LPM = Placas de Ágar Cloreto de Lítio Feniletanol Moxalactam
 MOX = Placas de Ágar Oxford Modificado

Outros procedimentos de enriquecimento têm sido usados como, o caldo de enriquecimento para *Listeria* da Merck (MERCK, 1982), o caldo de enriquecimento para *Listeria* spp. (LEB), contendo ácido nalidíxico e acriflavina como agentes seletivos, o caldo triptose adicionado de 2 % de citrato de sódio, utilizado por YOUSEF et al., (1988). Para a análise de amostras de queijo, o caldo de enriquecimento L-PALCAMY contendo os agentes seletivos polimixina B, cloreto de lítio, acriflavina e moxalactam (ou ceftazidima ou latamoxef) (LUND et al., 1991).

Segundo BAILEY et al., (1990), as metodologias mais adequadas para

detectar *Listeria monocytogenes*, dependendo do grau de contaminação do alimento, são aquelas que empregam um ou dois estágios de enriquecimento anterior ao plaqueamento. Os métodos convencionais para identificação das colônias isoladas e a diferenciação das espécies de *Listeria* são realizados através do exame de morfologia colonial e celular, coloração de Gram, provas bioquímicas, produção de hemolisina em ágar sangue e teste CAMP.

A identificação dos isolados é realizada através das características morfológicas e pela coloração da colônia de acordo com o meio de isolamento, coloração de Gram, motilidade celular, produção de indol, H₂S, urease, catalase, e ácidos a partir de glicose, lactose e sacarose; redução do nitrato, fermentação de xilose, rhamnose e manitol com e produção de hemolisina, sendo que os resultados obtidos são comparados às características clássicas do microrganismo. Testes bioquímicos clássicos para a identificação de *Listeria monocytogenes*, têm sido descritos sistemas de identificação rápida como o cartão de identificação de Gram positivos Vitek, Mast ID, Micro ID, API 50 CH, API 20 STREP, API-Zym (1986). (SEELIGER e JONES, 1986).

2.2.10 Métodos rápidos utilizados para detecção de *Listeria monocytogenes*

Os métodos rápidos surgiram a partir da década de 70, como consequência da necessidade de se abreviar o tempo para a obtenção de resultados analíticos e de se melhorar a produtividade laboratorial. Esses métodos visam também à simplificação do trabalho, a redução de custos e o aumento da sensibilidade e especificidade em relação aos métodos convencionais (FRANCO, 1996).

Atualmente, a grande maioria dos métodos em uso, detecta todas as espécies de *Listeria* e os fabricantes apresentam isso como uma vantagem, uma vez

que outras espécies além de *Listeria monocytogenes* são patogênicas para o homem. Entretanto, *Listeria monocytogenes* é considerada um patógeno clássico, e sob muitas circunstâncias a capacidade de detectar somente esta espécie poderia ser útil (VARNAM e EVANS, 1991).

Avanços no campo da imunologia e da genética microbiana têm levado ao desenvolvimento de novas metodologias para detectar *Listeria* spp. (tabela 03) (FRANCO, 1996).

TABELA 03 TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS E GENÉTICAS UTILIZADAS NA DETECÇÃO DE *Listeria spp*

TÉCNICAS	PRINCÍPIOS	TESTES
Técnicas Imunoenzimáticas	A reação é baseada na ligação do antígeno com o anticorpo específico, preso a uma matriz fixa. E ao antígeno fixo se liga outro anticorpo específico marcado por uma enzima	Assurance Listeria Listeria – TeK Listeria Visual Immunoassay Listeria Rapid Test (Clearview) Listeria VIA VIDAS LIS VIDAS LMO
Técnica de Imunocaptura	Baseada na capacidade dos microrganismos aderirem à superfícies de partículas metálicas superparamagnéticas revestidas de anticorpos específicos	Lister Test ListerScreen
Testes de Imunoprecipitação	Baseada na capacidade dos microrganismo aderirem à superfícies revestidas de anticorpos específicos que posteriormente se precipitam	Listeria VIP
Testes de Hibridização	São realizados com sondas genéticas específicas, que são segmentos de DNA de fita simples, capazes de reconhecer e formar híbridos com fitas complementares de DNA ou RNA. Os sistemas comerciais trabalham com sondas de DNA sintéticas, oligonucleotídicas, marcadas com enzimas, e baseiam-se em reações de hibridização em base líquida.	Genetrak Accuprobe <i>Listeria monocytogenes</i>
Técnica PCR Reação de Polimerase em Cadeia	Baseada na multiplicação exponencial de DNA, através da ação de uma enzima (DNA polimerase) que, tendo um segmento de DNA de fita simples como molde, é capaz de construir a fita complementar a esse segmento, através da polimerização de nucleotídios adicionados ao sistema.	

Fonte: Franco, 1996. Potential Food Safety Hazard, 1997

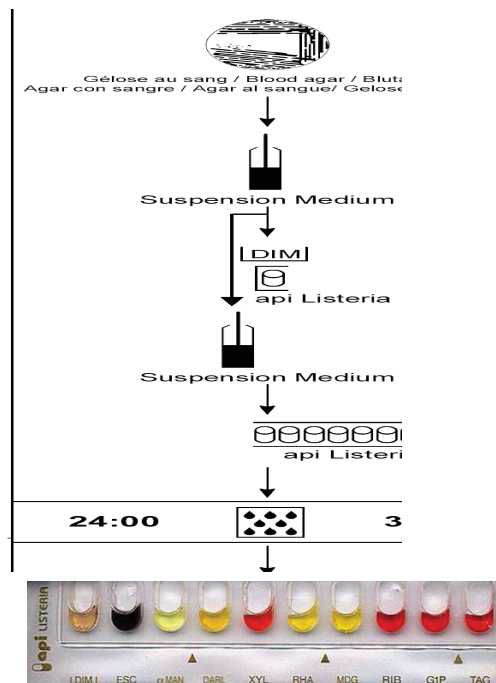
O método imunológico é à base da maioria dos sistemas de triagem para microrganismos patogênicos em alimentos e as técnicas mais utilizadas são imunoenzimática, imunocaptura, imunoimobilização, imunoprecipitação, co-aglutinação

e de imunofluorescência. Destas técnicas a imunoenzimática, imunocaptura e de imunoprecipitação apresentem testes de detecção para *Listeria* (FRANCO, 1996).

O uso de técnicas miniaturizadas para identificação rápida de microrganismos começou em 1940, (RYSER E MARTH, 1991) e desde então vários sistemas para identificar *Listeria spp.* Começaram a ser produzidos, tais como: identificação rápida como o cartão de Gram positivos Vitek, Mast ID, Micro ID, APPI 20 strep , API –SYM, látex teste e provas de DNA (FARBER, 1991).

Um dos sistemas amplamente utilizado para identificar *Listeria monocytogenes* é o API Listeria (Analytab Products INC) da Bio-Mérieux (figura 09 – A), que consiste de dez microtubos contendo substratos desidratados que permitem realizar testes enzimáticos e de fermentação de açúcares (figura 09). A diferenciação entre *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* é baseada na presença ou na ausência de arylamidase (teste DIM), hidrólise da esculina, presença de α manosidase e produção de *D*-arabitol, *D*-xilose, *L*-ramnose, α - mwtl-*D*-glicose, *D*- ribose, glicose- 1 – fosfato e *D*- tagatose. Com este kit os testes de atividade hemolítica e ou reação de CAMP podem ser omitidos, reduzindo-se assim, consideravelmente, o tempo necessário para a identificação. Deste modo os resultados estão disponíveis entre 18 e 24 horas (BILLE et al., 1992).

FIGURA 09 – A SISTEMA API LISTERIA DEMONSTRANDO AS ETAPAS DO PROCESSO BIOQUIMICO PARA DETECÇÃO DE *Listeria monocytogenes*



Fonte: Instituto Pasteur. 2004

2.2.11 Métodos moleculares

Produtos alimentícios associados à listeriose epidêmica demonstram a necessidade de metodologias rápidas e sensíveis para monitorar a incidência de *Listeria monocytogenes*. As técnicas convencionais de isolamento e identificação de *Listeria* spp. envolvem etapas trabalhosas de longa duração e consumindo semanas de enriquecimento e de cultivo em meios seletivos. Nas últimas décadas, vários trabalhos têm demonstrado o sucesso da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) na detecção e identificação de *Listeria monocytogenes*.

A Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* ou PCR) é um método de amplificação de DNA(figura 09 – B), aumentando o número de cópias do

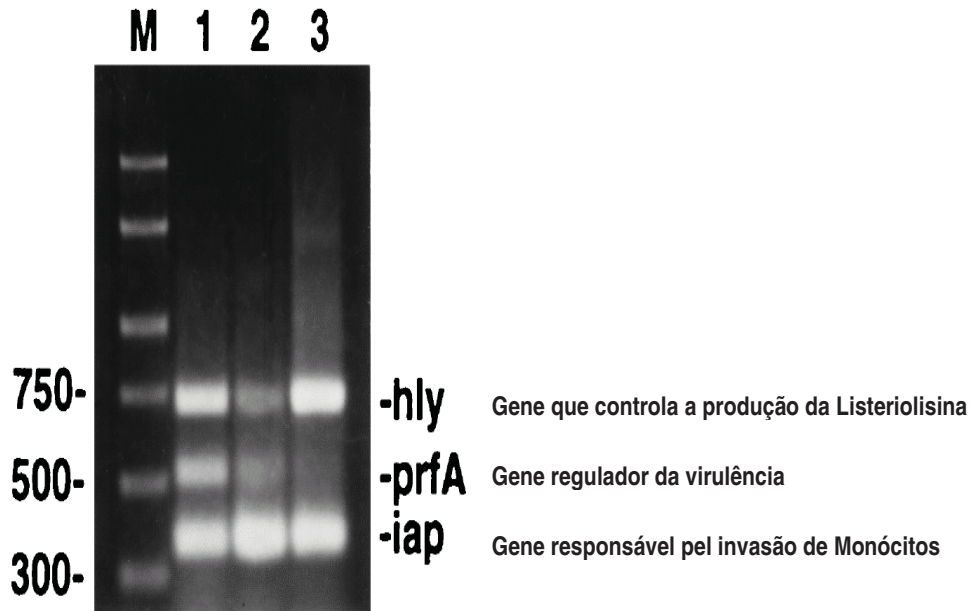
segmento-alvo. Este procedimento conceitualmente simples foi descrito por Kary Mullis no início da década de 80, e em 1993 recebeu o Prêmio Nobel de Química por este trabalho. A PCR baseia-se na amplificação de um segmento de DNA flanqueado por dois *primers*, oligonucleotídeos iniciadores com a extremidade 3'OH livre, que hibridizam as regiões flanqueadoras da seqüência alvo permitindo o início da amplificação pela enzima DNA polimerase. Atualmente, são utilizadas DNA polimerases termoestáveis, que resistem à alta temperatura necessária para desnaturação da dupla-fita do DNA. Ciclos repetidos de desnaturação do DNA, hibridização dos *primers* e síntese enzimática resultam numa amplificação exponencial da seqüência alvo. A PCR (figura 10) é um procedimento rápido, eficaz e sensível para a detecção e identificação de microrganismos. Diversos autores relatam o sucesso da utilização da PCR na análise microbiológica, mesmo quando o microrganismo pesquisado encontra-se sob estresse ou em quantidades mínimas, tornando difícil ou impossível o isolamento em meio de cultura tradicional (BUBERT et al., 1999).

O gene *iap* codifica a proteína p60, encontrada em todas as espécies de *Listeria*. Análises da seqüência de DNA demonstram que este gene apresenta regiões conservadas entre as espécies e região espécie específica. Em *Listeria monocytogenes*, o gene *iap* codifica os domínios extracelulares da proteína p60, que atua como uma murein-hidrolase necessária para a separação do septo ao final da divisão celular (MANZANO et al., 1998). Estudos demonstram que a proteína p60 de *Listeria monocytogenes* está associada com o processo invasivo do patógeno, consistindo um fator de virulência (BUBERT et al., 1999).

MANZANO et al., (1998) desenvolveram *primers* a partir de seqüências conservadas do gene *iap* em *Listeria monocytogenes*. Estes *primers*, Mar1 e Mar2, estão localizados nas posições 635 até 653pb e 1069 até 1085pb respectivamente, e

permitted the amplification of a fragment with 453pb exclusive of *Listeria monocytogenes*.

FIGURA 9 - B: REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA - PCR DEMONSTRANDO OS GENES *hly*, *prfA* e *iap* DA *Listeria monocytogenes*



FONTE: Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by Real-Time PCR: Assessment of *hly*, *iap*, and *lin02483* Targets and AmpliFluor Technology. David Rodríguez-Lázaro. Applied and Environmental Microbiology, March 2004.

As cepas patogênicas de *Listeria monocytogenes* são reconhecidas hemolíticas. A listeriolisina O, uma hemolisina *sulphydryl-activated*, é um importante fator de virulência desse patógeno. O gene *hlyA*, que codifica esta proteína, foi identificado e seqüenciado permitindo o desenvolvimento de *primers* para a detecção de *Listeria monocytogenes* por PCR (BESSESEN et al, 1990). FITTER et al., (1992) desenvolveram *primers* a partir do gene *hlyA* que permitem a amplificação de um fragmento de 417pb, exclusivo de *Listeria monocytogenes*.

A PCR é uma técnica altamente sensível que permite a detecção de células não cultiváveis ou estressadas. Contudo, deve-se levar em consideração que a

presença de células mortas do patógeno pode levar a um falso resultado positivo de contaminação da amostra do alimento investigada. KLEIN e JUNEJA (1997) empregaram a RT-PCR (transcrição reversa por PCR) para amplificar o RNAm dos genes *hlyA*, *prfA* e *iap*, permitindo assim a detecção apenas de células viáveis de *Listeria monocytogenes*. HERMAM et al., (1997) utilizaram a RT-PCR para amplificar o RNAm do gene *hlyA*, possibilitando deste modo a determinação das células viáveis mas não cultiváveis de *Listeria monocytogenes*, após a pasteurização de amostras de queijo.

2.3 GENERALIDADES SOBRE *Salmonella* spp.

Salmonella spp. pertence à família Enterobacteriaceae e compreende bacilos gram-negativos não esporulados, anaeróbios facultativos, produtores de gás a partir da glicose, com exceção de *Salmonella typhi* que não produz gás. A maioria dos sorovares apresenta motilidade pela presença de flagelos peritríquios com exceção de *S. pullorum* e *S. gallinarum*. A denominação do gênero *Salmonella* foi criada por Lignières, em homenagem ao patologista Daniel Salmon, que descreveu juntamente com Theobald Smith, em 1885, *Salmonella cholerae-suis*. Deste então, sua classificação taxonômica tem sido bastante estudada e caracterizada por quatro etapas distintas baseadas, inicialmente, em conhecimentos clínicos e epidemiológicos e, posteriormente, respaldada em análises fenotípicas e genotípicas (Le MINOR e POPOFF, 1997).

O habitat natural de *Salmonella* é o trato intestinal de animais homeotermos e heterotermos, com ciclos de infecção entre os animais, os seres humanos e o meio ambiente. As infecções causadas por *Salmonella* spp. ocorrem, geralmente, devido ao consumo de alimentos ou água contaminados com células viáveis. As doenças

causadas por *Salmonella* são subdivididas em febre tifóide, causada por *Salmonella typhi*, febres entéricas, causadas pela *Salmonella paratyphi* A, B e C e gastroenterites ou salmoneloses, causadas pelos outros sorovares. Essas últimas têm sido relatadas como as mais freqüentes (FRANCO e LANDGRAF, 1996)

Os sintomas da gastrenterite incluem dores abdominais, diarréia, náuseas, vômito, febre moderada e dores de cabeça. O período de incubação é de 6 a 72 horas, com uma média de 12 a 36 horas. A febre tifóide caracteriza-se clinicamente por febre contínua, diarréia, esplenomegalia, erupção de manchas rosa no abdome e septicemia (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

As febres entéricas são bastante semelhantes à febre tifóide, mas os sintomas clínicos são geralmente mais brandos, não entanto pode ocorrer bacteremia. A febre entérica se manifesta com febre, dores corporais e abdominais, calafrios, náuseas, vômito e diarréia. A febre tifóide pode durar de uma a oito semanas, enquanto, as febres entéricas duram no máximo três semanas (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

A gastrenterite pode ser grave em crianças com idade inferior a três meses, em idosos e em pessoas imunocomprometidas. A maioria dos óbitos ocorre em pacientes idosos, porém a doença pode ser fatal em pacientes saudáveis dependendo da virulência da linhagem e do inóculo ingerido. Os principais alimentos responsáveis pela toxinfecção por *Salmonella* spp. são: carne de aves, saladas elaboradas com carne de aves, ovos e derivados, carne e produtos cárneos e outros alimentos protéicos. A transmissão pode ocorrer diretamente por via oral através de fezes. A gastrenterite causada pela ingestão de ovos contaminados com *Salmonella enteritidis* aumentou na maioria dos países a partir da metade da década de 1980. Em 1990, o

FDA declarou que os ovos eram produtos de risco, e deveriam estar sujeitos ao controle de temperatura (SALYERS e WHITT, 1994).

Na Europa, KOVATS et al., (2004) evidenciaram uma associação linear entre a temperatura ambiental e a incidência de salmonelose em dez países europeus (Dinamarca, Escócia, Espanha, Estônia, Inglaterra, Noruega, Polônia, República Checa, República Eslovaca e Suíça), com registro de maior número de surtos nos meses de verão

2.4 GENERALIDADES SOBRE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS

O grupo dos coliformes totais inclui as bactérias na forma de bastonetes Gram negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35° C. O grupo inclui cerca de 20 espécies, dentre as quais se encontram tanto bactérias originárias do trato gastrointestinal de humanos e outros animais de sangue quente, como também diversos gêneros e espécies de bactérias não entéricas, como *Serratia* e *Aeromonas*, por exemplo. Por essa razão, sua enumeração em água e alimentos é menos representativa, como indicação de contaminação fecal, do que a enumeração de coliformes fecais ou *E.coli*. Porém, sua presença em alimentos processados é considerada uma indicação útil de contaminação pós-sanitização ou pós-processo (principalmente no caso da pasteurização), evidenciando práticas de higiene e sanitização aquém dos padrões requeridos para o processamento de alimentos (SILVA, 2001).

A definição para coliformes fecais é a mesma de coliformes totais, porém, restringindo-se aos membros capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24h a 44,5 - 45,5° C. Esta definição objetivou, em princípio, selecionar apenas os

coliformes originários do trato gastrointestinal. Atualmente sabe-se, entretanto, que o grupo dos coliformes fecais inclui pelo menos três gêneros, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, dos quais dois (*Enterobacter* e *Klebsiella*) incluem cepas de origem não fecal. Por esse motivo, a presença de coliformes fecais em alimentos é menos representativa, como indicação de contaminação fecal, do que a enumeração direta de *E.coli*. Essa bactéria é reconhecidamente de habitat fecal, dentro do grupo dos coliformes fecais. *E.coli* é a mais conhecida e a mais facilmente diferenciada dos membros não fecais. Todos os demais membros do grupo têm uma associação duvidosa com a contaminação fecal e *E.coli*, embora também possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais, é o melhor indicador de contaminação fecal conhecido até o momento (SILVA, 2001).

2.5 GENERALIDADES SOBRE *Staphylococcus* spp.

Dentre os microrganismos envolvidos em intoxicações alimentares e na produção de metabólitos capazes de causar moléstias ao homem, as bactérias do gênero *Staphylococcus* têm se destacado (GENIGEORGIS, 1989).

A presença de *Staphylococcus aureus* em alimentos pode sugerir condições de manipulação inadequadas e deficientes de limpeza e desinfecção. Sua incidência em produtos crus é reduzida devido à competição entre os microrganismos presentes. Um pequeno número destes microrganismos é previsto em todos os produtos alimentares em que houve manipulação humana (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

O *Staphylococcus aureus* apresenta características de crescimento em presença de 15% de NaCl, relativa resistência ao calor e ambiente seco, e requer atividade de água mínima de 0,86 para seu desenvolvimento (HALPIN-DOHNALEK et al., 1989).

A presente pesquisa foi efetivada e motivada pela existência na Região Metropolitana de Curitiba (RMC) de 40 pequenas fábricas de gelados comestíveis, consideradas como pequenas empresas de produção sazonal que, em consequência do seu porte e do estágio tecnológico, não apresentam todas as condições higiênico-sanitárias condizentes com as Boas Práticas de Fabricação. O intuito que direcionou esta investigação foi a constatação de *Listeria monocytogenes* em amostras de queijo, requeijão e ricota, em pelo menos, 16 Regionais de Saúde da Secretaria de Estado da Saúde/Paraná.

Em 1998 ocorreram 200 surtos provocados por DTAs notificados à Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, mas a investigação epidemiológica e laboratorial levou a não concretizou a identificação da grande maioria dos agentes etiológicos. A falta destes referenciais tem dificultado o direcionamento do controle de alimentos, assim como uma educação sanitária com maior eficácia (PARANÁ, 2001).

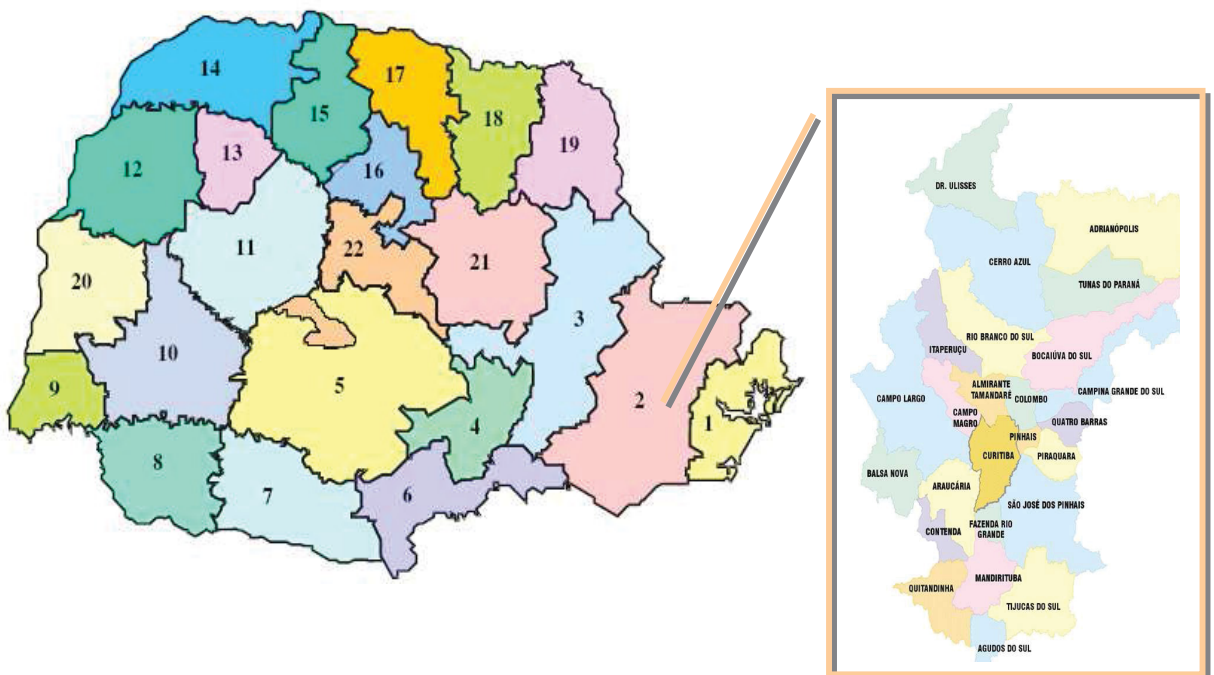
3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Área de abrangência do estudo

A Divisão Administrativa da Secretaria de Estado da Saúde está subdividida em 22 Regionais de Saúde a fim de exercer o papel de apoio, cooperação técnica e investimento nos municípios e nos consórcios e de executar ações e serviços de saúde (figura 10). A Região Metropolitana de Curitiba corresponde à 2ª Regional de Saúde.

FIGURA 10: MAPA DO ESTADO DO PARANÁ MOSTRANDO A DISTRIBUIÇÃO DAS REGIONAIS DE SAÚDE DA SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE E DESTACANDO A SEGUNDA REGIONAL DE SAÚDE



FONTE: Secretaria de Estado da Saúde. 2004

Este trabalho foi desenvolvido nos municípios integrantes da 2ª Regional de Saúde onde foi identificada a presença de 40 fábricas artesanais de gelados

comestíveis. O perfil dessas empresas é de pequeno e médio porte e, segundo a Vigilância Sanitária, os riscos higiênico-sanitários são consideráveis e ainda persistem.

3.1.2. Sorvetes a base de leite

Foram coletadas 60 amostras de sorvetes à base de leite em fábricas e locais de comercialização instalada na Região Metropolitana de Curitiba – RMC. As coletas foram realizadas entre os meses de março a dezembro de 2004. Os produtos coletados estavam prontos para o consumo e dentro do prazo de validade. A coleta foi realizada com o auxílio de técnicos da Vigilância Sanitária da 2ª RS e do Município onde se efetuou a coleta (figura 11).

As amostras foram acondicionadas, identificadas e transportadas sob refrigeração segundo os procedimentos estabelecidos pelo Laboratório Central do Estado – LACEN/PR. As amostras foram analisadas imediatamente após a chegada ao laboratório.

FIGURA 11 TECNICOS DA VISA MUNICIPAL DA SMS DE PIRAQUARA COLETANDO AMOSTRAS DE GELADOS COMESTÍVEIS



FONTE: Foto original da pesquisa. 2004

As coletas foram realizadas conforme programação anual da Vigilância Sanitária e foram realizadas com a finalidade de análise de rotina não fiscal. A apreensão das amostras se destinou unicamente para a verificação microbiológica dos gelados comestíveis, assim como a qualidade das condições higiênico-sanitárias dos locais de fabricação. O Quadro 02 apresenta os locais, indústria e tipo da amostra:

QUADRO 02: QUADRO DEMONSTRANDO O N° DA AMOSTRA, PRODUTO COLETADO E MUNICÍPIO DE COLETA - 2ª RS

Amostra	Produto	Local de coleta
1.	Sorvete de flocos	Fazenda Rio Grande
2.	Sorvete tutti frutti	Fazenda Rio Grande
3.	Sorvete abacaxi	Fazenda Rio Grande
4.	Sorvete de morango	Fazenda Rio Grande
5.	Sorvete de Pina colada	Fazenda Rio Grande
6.	Sorvete de flocos	Fazenda Rio Grande
7.	Sorvete leite condensado	Rio Branco do Sul
8.	Sorvete de abacaxi	Rio Branco do Sul
9.	Sorvete Leite condensado	Rio Branco do Sul
10.	Sorvete de nata	Rio Branco do Sul
11.	Sorvete de flocos	Rio Branco do Sul
12.	Sorvete de leite condensado	Rio Branco do Sul
13.	Sorvete de leite condensado	Piraquara
14.	Sorvete de leite sabor abacaxi	Piraquara
15.	Sorvete de leite sabor morango	Piraquara
16.	Sorvete de leite sabor coco	Piraquara
17.	Sorvete de Flocos	Campo Largo
18.	Sorvete de Côco	Campo Largo
19.	Sorvete de Morango	Campo Largo
20.	Sorvete de Côco	Pinhais
21.	Sorvete de Chocolate Branco	Pinhais
22.	Sorvete de Creme	Colombo
23.	Sorvete de Nata-Amendoin	Colombo
24.	Sorvete de Creme	Colombo
25.	Sorvete de Flocos	Almirante Tamandaré
26.	Sorvete de Leite Condensado	Almirante Tamandaré
27.	Sorvete de Morango-Flocos	Piraquara
28.	Sorvete de Flocos	Piraquara
29.	Sorvete de Flocos	São José dos Pinhais
30.	Sorvete de Flocos (torta alemã)	Curitiba
31.	Sorvete de Nata	Fazenda Rio Grande
32.	Sorvete de Creme	Fazenda Rio Grande
33.	Sorvete de Flocos	Fazenda Rio Grande
34.	Sorvete de Cereja	Fazenda Rio Grande
35.	Sorvete de Côco	Fazenda Rio Grande
36.	Sorvete de Chocolate com Creme	Pinhais
37.	Sorvete de Coco-Morango	Pinhais
38.	Sorvete de Leite condensado	Pinhais
39.	Sorvete de Creme	Mandirituba
40.	Sorvete de Côco	Mandirituba
41.	Sorvete de Flocos	Campo Largo
42.	Sorvete de Côco	Campo Largo
43.	Sorvete de Chocolate	Campo Largo
44.	Sorvete de Creme	Campo Largo
45.	Sorvete de Morango	Campo Largo
46.	Sorvete de Passas ao Rum	Quatro Barras
47.	Sorvete de Morango	Rio Branco do Sul
48.	Sorvete de Côco	Rio Branco do Sul
49.	Sorvete de Leite Condensado	Lapa
50.	Sorvete de Côco	Lapa
51.	Sorvete de Flocos	Lapa
52.	Sorvete de Banana	Quatro Barras
53.	Sorvete de Leite-Abacaxi	Quatro Barras
54.	Sorvete de Maracujá	Quatro Barras
55.	Sorvete de Blue Ice	Quatro Barras
56.	Sorvete de Milho Verde	Quatro Barras
57.	Sorvete de Flocos	Itaperuçu
58.	Sorvete de Passas ao Rum	Itaperuçu
59.	Sorvete de Bom bom	Campo Magro
60.	Sorvete de Passas	Campo Magro

Fonte: Quadro original da pesquisa. 2004

Procurou-se atender a totalidade dos municípios integrantes da 2ª Regional de Saúde Metropolitana, porém o deslocamento até os locais de coleta dependeu de transporte e equipe técnica especializada. Os municípios mais visitados foram os que se encontrava em área limítrofe ao município de Curitiba (figuras 12 e 13), assim como se procurou visitar estabelecimentos com histórico higiênico-sanitário deficitário (ausência de pasteurização) detectado em visitas anteriores nos anos de 2003 e 2002.

FIGURA 12 MAPA DA 2ª REGIONAL DE SAÚDE MOSTRANDO OS MUNICÍPIOS ONDE FORAM REALIZADAS AS COLETAS DE AMOSTRAS DE SORVETE

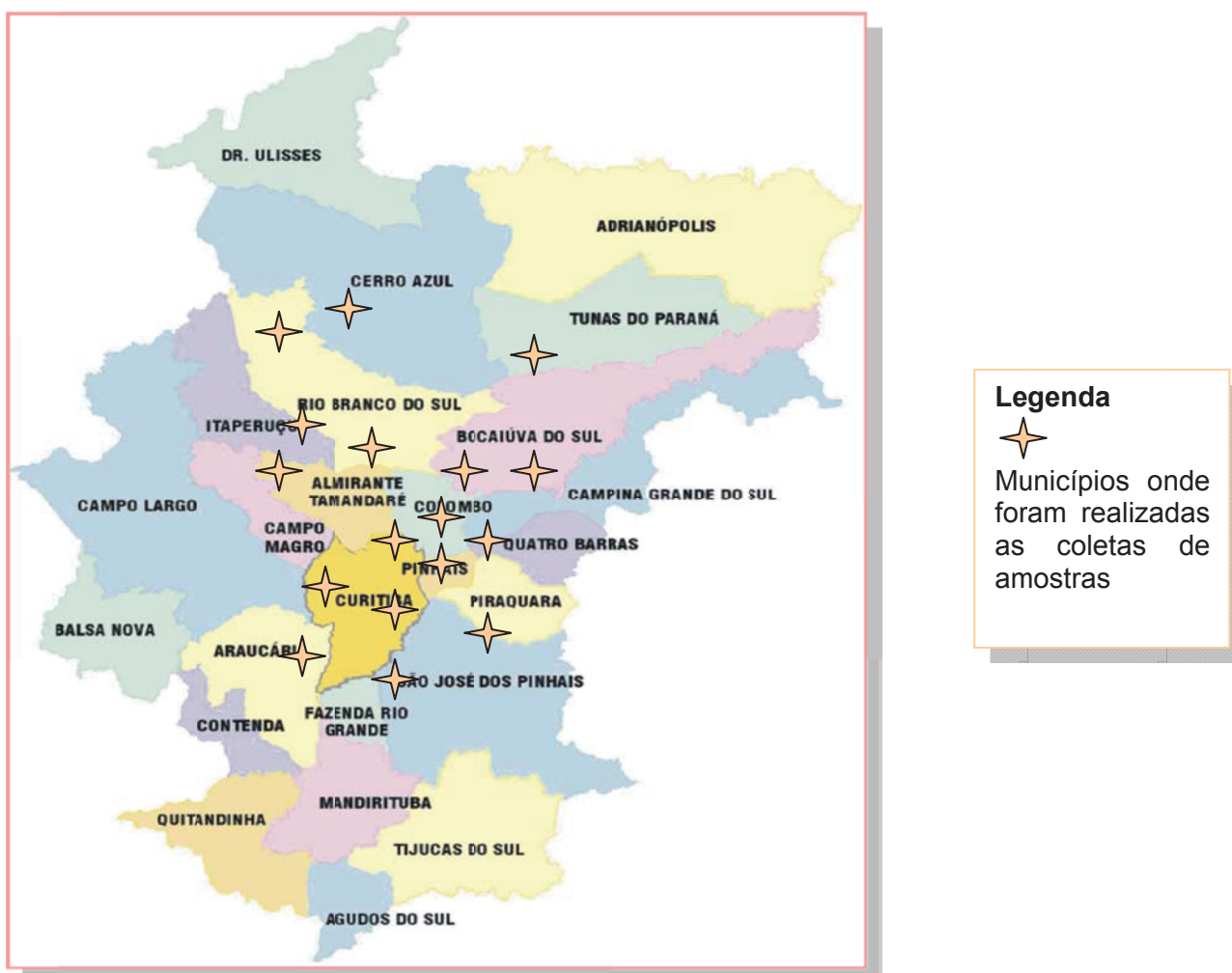
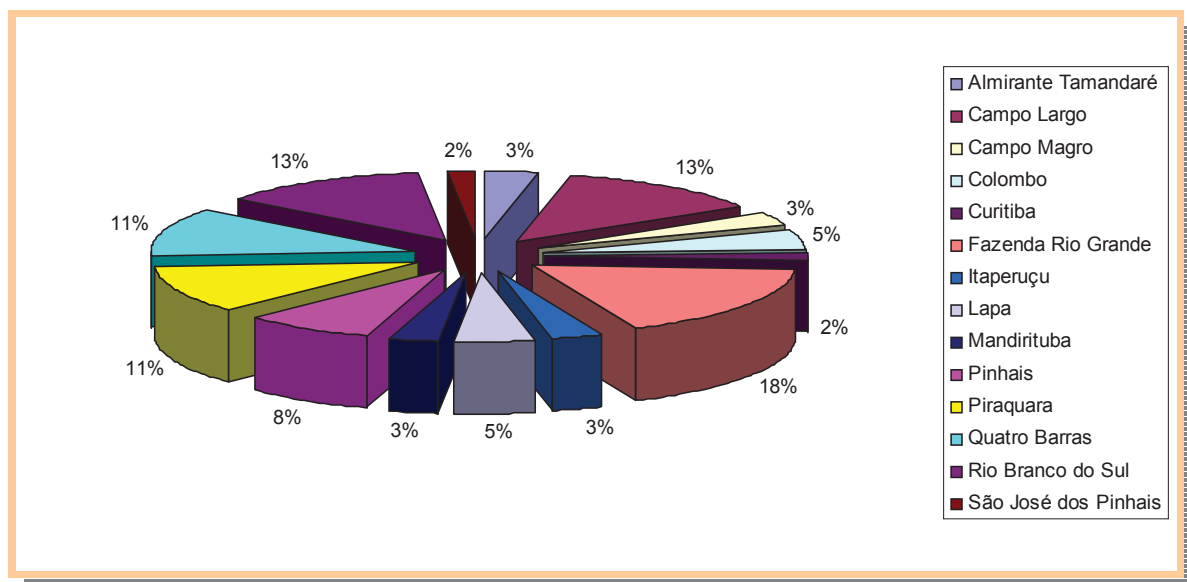


FIGURA 13 DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DAS AMOSTRAS COLETADAS EM FUNÇÃO DOS LOCAIS DE COLETAS NOS MUNICÍPIOS DA 2ª RS, REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA NO ANO DE 2004.



FONTE: Gráfico original da pesquisa. 2004.

3.1.3 Cepas Padrões de Referência

Os microrganismos utilizados, no presente trabalho, para a padronização da metodologia e controle de qualidade foram fornecidas pelo Dr. Ernesto Hofer, do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz), Estado do Rio de Janeiro e pela Dra. Dilma Scala Gelli, do Instituto Adolfo Lutz (IAL), Estado de São Paulo, na forma de ágar conservação. As cepas disponibilizadas foram as seguintes:

Listeria innocua CIP 12612

Listeria monocytogenes L 46 - F 4555 CDC

Listeria ivanovii 19199 ATCC

Listeria seeligheri 9529 CIP

Listeria welshimeri 11633 CIP

Listeria monocytogenes L 1 / 2 A ATCC 19111-1

Staphylococcus aureus CIP 5710

Escherichia coli ATCC 12229

Enterobacter Aerogenes ACC 13048

3.1.4 Equipamentos

Cabine de segurança Classe II

Homogenizador de amostras tipo *stomacher*

Estufa bacteriológica

Estufa tipo BOD

Banho-Maria com agitação

Bico de Bunsen

Contador de Colônias tipo Quebec

Autoclave

3.1.5 Meios de Cultura, sistema reagente, soluções, reagentes e insumos

3.1.5.1 Meios de cultura

Os meios foram obtidos dos Laboratórios Difco Ltda, Oxoid e Merck, na forma desidratada e foram preparados conforme indicação do fabricante.

3.1.5.1.1 Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Ágar Trypticase Soja Sangue de Carneiro (TSA)

Caldo Fraser Base modificado

Agar cloreto de lítio feniletanol moxalactam seletivo para Listéria e suplementado com esculina 1 g/l, citrato férrico amoniacal 0,5 g/l (LPM modificado)

Ágar Oxford seletivo para Listéria (OXA)

Ágar Palcam (PAL)

Ágar Trypticase de soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSA - YE)

Caldo Trypticase de soja suplementado com 0,6 % de extrato de levedura (TSB - YE)

Ágar Infusão Cérebro Coração (BHI ágar)

Ágar sulfito indol motilidade com adição de 0,05% de cloreto de trifeniltetrazolium
Caldo Vermelho de Metila/Voges Proskauer (Caldo VM / VP)
Ágar tríplice açúcar ferro (TSI)
Ágar sangue nº 2 suplementado com sangue desfibrinado de carneiro / cavalo
Caldo nitrato
Caldo púrpura de bromocresol para carboidratos
Caldo púrpura de bromocresol com 0,5% de rhamnose
Caldo púrpura de bromocresol com 0,5% de manitol
Caldo púrpura de bromocresol com 0,5% de xilose
Ágar bile esculina inclinado

3.1.5.1.2 Meios de pesquisa de *Salmonella spp.*

Água peptonada tamponada - ADPT (frasco de boca larga com 225 ml)
Caldo Selenito-Cistina (10 ml em tubos 16x160 com tampa de aço-inox)
Caldo Rappaport-Vassiliadis soja peptona (10 ml em tubos 16x160 tampa de aço-inox)
Placas com ágar Salmonella -Shiguella (SS)
Placas com Ágar entérico de Hektoen (He)
Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) (tubos 15 x 150 com tampa de baquelite)
Agar lisina ferro (LIA) (tubos 15 x 150 com tampa de baquelite)

3.1.5.1.3 Número mais provável de coliformes a 35° C e 45° C

Caldo Lauril Sulfato Tryptose (LST)
Caldo Lactosado Verde Brilhante Bile 2% (VB)
Caldo EC (EC)
Agar Eosina Azul de Metileno (EAM)

3.1.5.1.4 Contagem de estafilococos coagulase positiva

Frascos com 225 ml de água Peptonada 0,1% (diluente)
Tubos com 9 ml de água Peptonada 0,1% (diluente)
Placas com Ágar Baird - Parker (BP)
Tubos de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI)
Tubos com agar tripticase de Soja (TSA) inclinados

3.2 Sistema reagente, soluções, reagentes e insumos

3.2.1 Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

VIP (Método visual de imunoprecipitação) para Listéria (Biocontrol 600120)

Reagente para redução de nitrato (Sol A): ácido sulfanílico 0,8% em ácido acético 5N

Reagente para redução de nitrato (Sol B): alfa naftol 0,5% em ácido acético 5 N

Zinco em pó livre de nitrato ou nitrito

Reagente de Barrit para prova de VP: solução alcoólica a 5% de alfa naftol

Solução de KOH a 40%

Creatina em cristais

Solução desinfetante de álcool iodado

Peróxido de hidrogênio a 3%

Água destilada estéril.

3.2.2 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Soro polivalente somático

Soro fisiológico 0,85%

3.2.3 Número Mais Provável de Estafilococos coagulase positiva

Coagulase plasma-EDTA

Peróxido de hidrogênio 3%

3.5 MÉTODO

Nas amostras coletadas foram avaliados os parâmetros preconizados na RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 (contagem de estafilococos coagulase positiva, NMP de coliformes a 45°C e Pesquisa de *Salmonella* spp. em 25 g) e a pesquisa de *Listeria monocytogenes* e NMP de coliformes a 35° C. Estes dois últimos não são preconizados pela legislação vigente (ANVISA, 2001).

As amostras foram analisadas em relação à pesquisa de *Listeria monocytogenes* através do método visual de imunoprecipitação (VIP) método AOAC 997.03 (2002) (figuras 14, 15, 16, 17 e 18). Neste item, utilizou-se o critério de presença e ausência em 25 gramas da amostra. Para a detecção, isolamento e identificação de contaminantes microbianos foram utilizados os protocolos dos métodos preconizados pelo Bacteriological Analytical Manual (BAM), elaborado pelo Food and Drug Administration (FDA) (1995) utilizando critério de contagens por grama e pesquisa em 25 gramas da amostra.

3.5.1 Pesquisa de *Listeria monocytogenes* pela metodologia VIP (Método AOAC 997.03)

3.5.1.1 Enriquecimento seletivo primário

Vinte e cinco gramas de cada amostra (alíquotas da superfície) foram pesadas assepticamente em sacos plásticos estéreis para “Stomacher” e acrescidos de 225 ml do caldo Fraser Modificado com Cloreto de Lítio 8M, homogeneizado a seguir em digestor tipo stomacher por 30 segundos e incubados a 30° C por 28 horas (enriquecimento primário) (AOAC, 2002)

3.5.1.2 Enriquecimento seletivo secundário

Agita-se delicadamente o frasco contendo o enriquecimento seletivo primário e transfere-se 1 ml deste homogeneizado para um tubo de ensaio com 9 ml de Caldo de enriquecimento de *Listéria* tamponado (BLED), incubando-se a 30°C por 24 horas.

3.5.1.3 Inoculação do sistema reagente

Conforme recomendação do manual da BioControl (figura 14), transfere-se 1 ml do caldo BLED para tubo de ensaio e coloca-se em aquecimento em banho-maria a 100°C por 5 minutos com a finalidade de liberar o antígeno somático. Após resfriamento em temperatura ambiente, transfere-se uma alíquota de 0,2 ml para a área com formato circular onde se adiciona a amostra.

FIGURA 14 PREPARAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOPRECIPITAÇÃO VISUAL PARA *Listeria* spp.

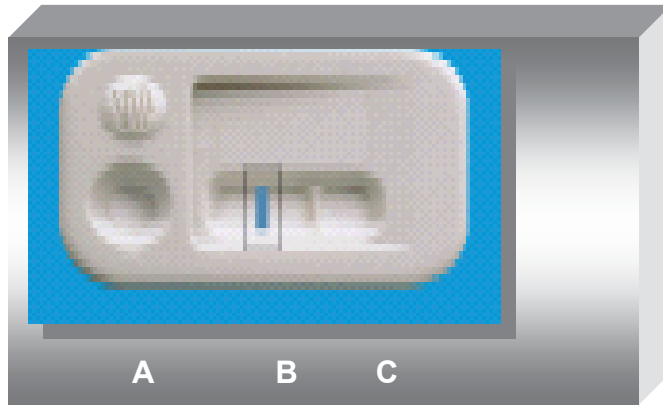


FONTE: Association of Official Analytical Chemists. AOAC, 2002.

3.5.1.4 Leitura do sistema reagente

Após 10 minutos, observa-se a presença de uma linha cinza na cavidade de resultado (B) do sistema reagente, a qual indica a presença de antígenos flagelares de *Listeria* spp, e , portanto, considerado como resultado positivo, (figura 15). A ausência da linha cinza indica resultado negativo.

FIGURA 15 DETECÇÃO DE *Listeria spp.* ATRAVÉS DO ENSAIO VISUAL DE IMUNOPRECIPITAÇÃO (VIP) – RESULTADO POSITIVO NA CAVIDADE B

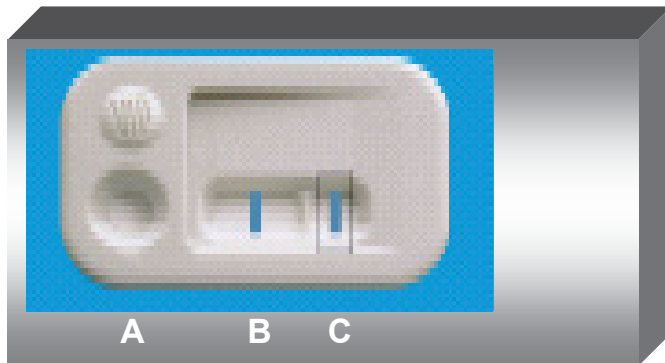


FONTE: Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2002).

O aparecimento de uma linha cinza em vinte minutos na cavidade controle (C), indica o correto funcionamento do dispositivo, caso contrário, deve-se repetir o teste com outro dispositivo.

A diferença de intensidade da coloração azul, tanto na cavidade de resultado como no do controle, não afeta a interpretação dos resultados, a não ser que ocorra uma linha muito forte na cavidade de resultado, e ausência da linha na cavidade controle. Neste caso, ocorre um excesso de antígenos flagelares havendo necessidade de diluir a amostra. A positividade para gênero *Listeria spp.* pelo método VIP (figura 16) é representada pelo aparecimento de duas linhas no sistema reagente.

FIGURA 16 DETECÇÃO DE *Listeria* spp. ATRAVÉS DO ENSAIO VISUAL DE IMUNOPRECIPITAÇÃO (VIP) – RESULTADO POSITIVO NAS CAVIDADES B e C INDICANDO PROVA POSITIVA PARA *Listeria* spp.



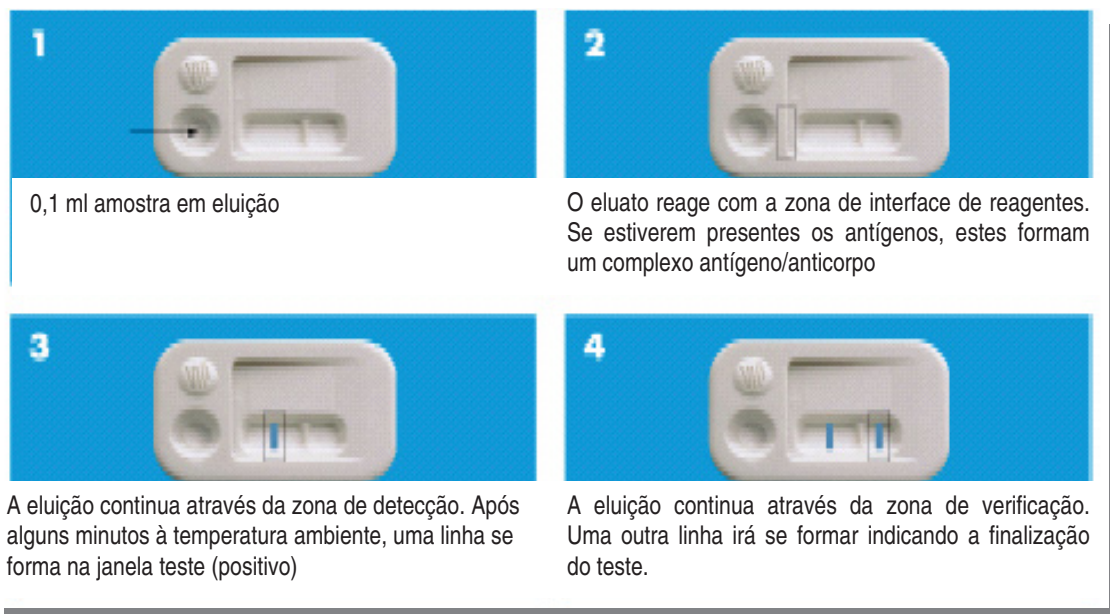
FONTE: Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2002).

A figura 17 resume o funcionamento do Sistema Reagente VIP para detecção de *Listeria* spp.

Na figura 18 está representado o princípio imunológico de detecção de *Listeria* spp. através do ensaio visual de imunoprecipitação.

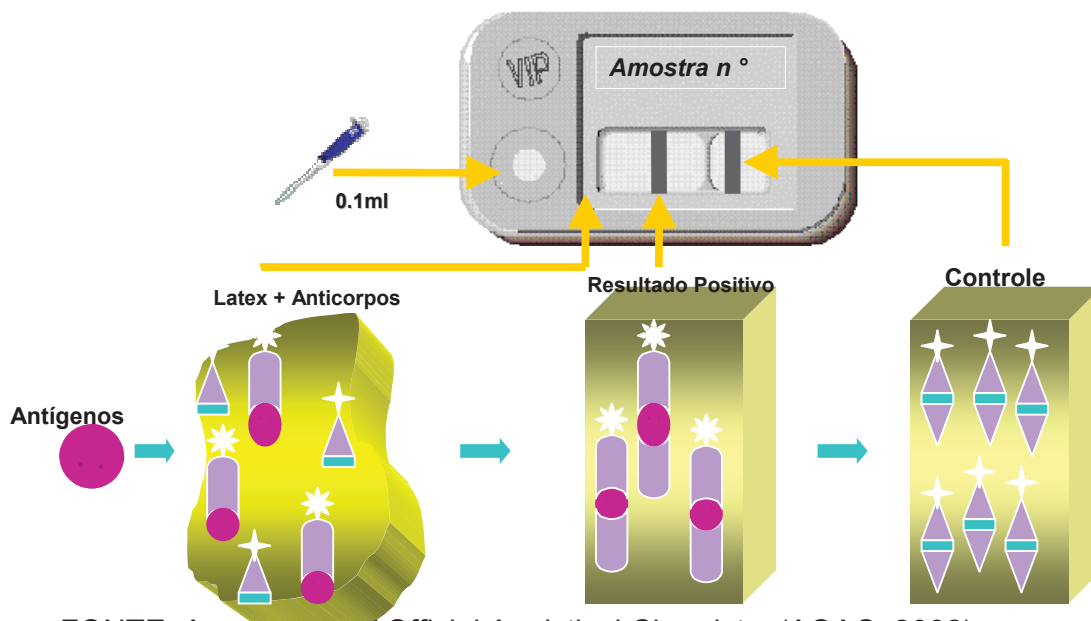
A figura 19 demonstra o binário existente entre a metodologia convencional e o sistema reagente VIP. A utilização desses dois sistemas reduz os custos empregados para a detecção do gênero *Listeria* spp., assim como facilita a identificação da espécie *Listeria monocytogenes*.

FIGURA 17: DETECÇÃO DE *Listeria spp.* ATRAVÉS DO SISTEMA REAGENTE DE ENSAIO VISUAL DE IMUNOPRECIPITAÇÃO (VIP)



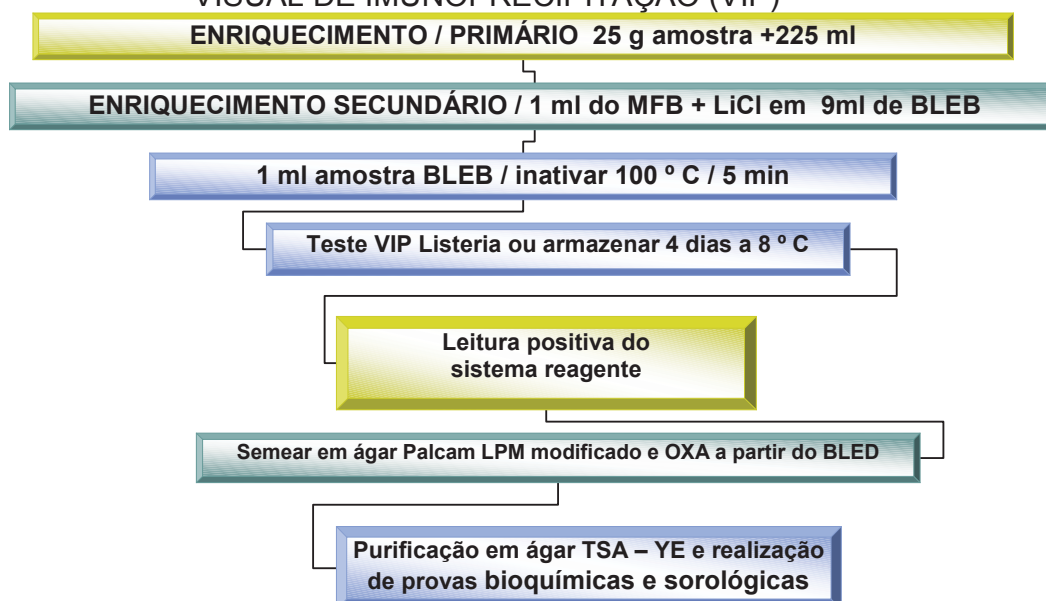
FONTE: Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2002).

FIGURA 18 VIP (IMUNOPRECIPITADO VISUAL) MOSTRANDO A REAÇÃO ANTÍGENO - ANTICORPO



FONTE: Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2002).

FIGURA 19: ESQUEMA DE DETECÇÃO DE *Listeria* spp. ATRAVÉS DO ENSAIO VISUAL DE IMUNOPRECIPITAÇÃO (VIP)



FONTE: Association of Official Analytical Chemists. AOAC, 2002.

3.5.2 Pesquisa de *Salmonella* spp.

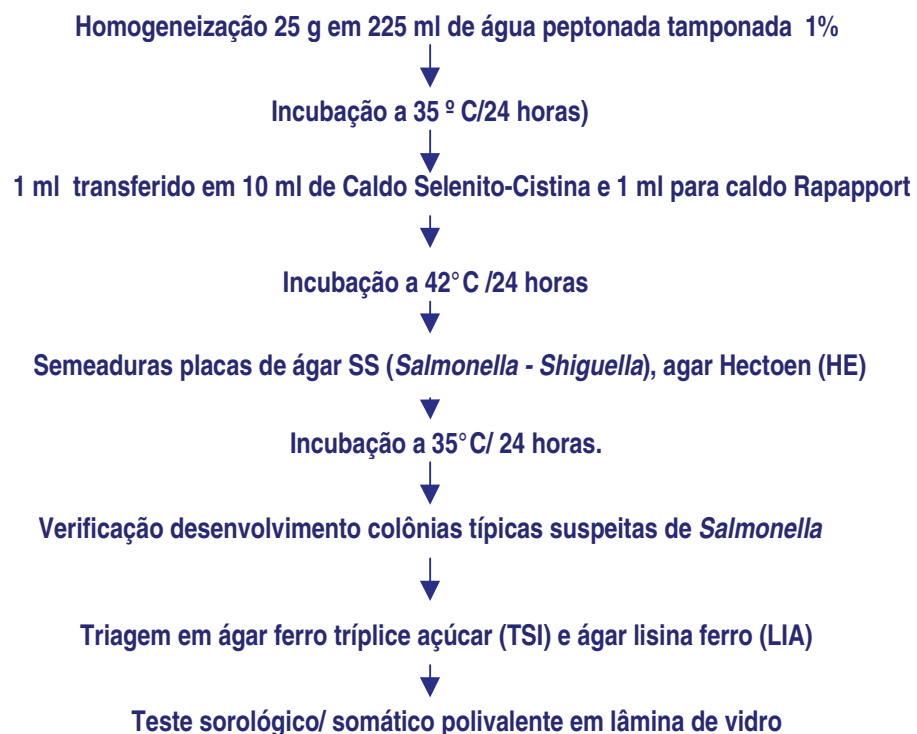
Foram homogeneizados 25 g de sorvete em 225 ml de água peptonada tamponada a 1%. Após a incubação a 35° C (24 horas), 1 ml dessa suspensão foi transferido para 10 ml de Caldo Selenito-Cistina e 1 ml para caldo Rapaport e incubados a 42° C (24 horas). Após período de incubação foram realizadas sementeiras por esgotamento em placas de petri, contendo ágar SS (*Salmonella- Shiguella*), agar Hectoen (HE) . Foi feita incubação a 35° C, por 24 horas. Verificou-se se há desenvolvimento de colônias típicas suspeitas de *Salmonella* spp.

As colônias suspeitas foram identificadas em ágar ferro tríplice açúcar (TSI) e ágar lisina ferro (LIA). Em HE as colônias típicas apresentam-se transparentes, verde-azuladas, com ou sem centro preto. As cepas fortemente produtoras de H₂S podem produzir colônias inteiramente pretas. Em SS as colônias típicas apresentam-se transparentes geralmente com centro negro.

3.5.2.1 Confirmação bioquímica e sorológica

Com o auxílio de uma agulha de inoculação, removeu-se uma porção da massa de células, do centro da colônia típica e inoculou-se em tubos inclinados de Ágar Lisina Ferro (LIA) e Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI). A inoculação foi feita por picada e estrias na rampa, utilizando-se a mesma alçada para inocular ambos os tubos. Não é necessário nem recomendado flambar a agulha e retirar outra porção da colônia, entre um tubo e outro. Submeteu-se à confirmação preliminar de pelo menos duas colônias típicas de cada placa, nos tubos de LIA e TSI (figura 20). Incubou-se os tubos a $35 \pm 0,2^\circ$ C por 24 horas e observou-se se há ocorrência de reação típica de *Salmonella*:

FIGURA 20: ESQUEMA DE DETECÇÃO DE *Salmonella* spp. ATRAVÉS DE MÉTODO BIOQUÍMICO E SOROLÓGICO



FONTE: AOAC. 2003

3.5.2.2 Reação típica de *Salmonella* em TSI:

Reação caracterizada pela rampa alcalina (vermelha) e fundo ácido (amarelo), com ou sem produção de H₂S (escurecimento do ágar). Reação atípica e, TSI, que não deve ser descartada se as demais reações em LIA se apresentarem típicas: rampa e fundo ácidos (amarelos), com ou sem produção de H₂S.

3.5.2.3 Reação típica de *Salmonella* em LIA

Fundo e rampa alcalinos (púrpura, sem alteração da cor do meio), com ou sem produção de H₂S (escurecimento do meio). Reação atípica em LIA, que não deve ser descartada se as demais reações em TSI se apresentarem típicas: fundo amarelado com rampa alcalina, com ou sem produção de H₂S.

- Nota 1: Se as placas de HE ou SS apresentarem colônias típicas, porém não isoladas de *Salmonella*, estriou-se uma alçada da colônia, tomada no centro e, se possível, sem tocar nas colônias adjacentes, em placas de HE e SS, para purificação da cultura. Somente então, a partir da cultura pura, deve-se inocular os tubos de LIA e TSI.
- Nota 2: Os tubos de TSI devem ser inclinados com fundo de no mínimo 2,5 cm e incubados com a tampa ligeiramente afrouxada, para manter condições aeróbicas. Este cuidado objetiva prevenir a excessiva produção de H₂S e reações ácidas errôneas na rampa. Se ainda assim, houver excessiva produção de H₂S, mascarando a reação ácida do fundo, deve-se assumir a reação como típica.
- Nota 3: Os tubos de LIA devem ser inclinados com fundo de no mínimo 2,5 cm e incubados com a tampa bem fechada, porque a reação de descarboxilação da lisina ocorre anaerobicamente. A exclusão do ar previne falsos resultados

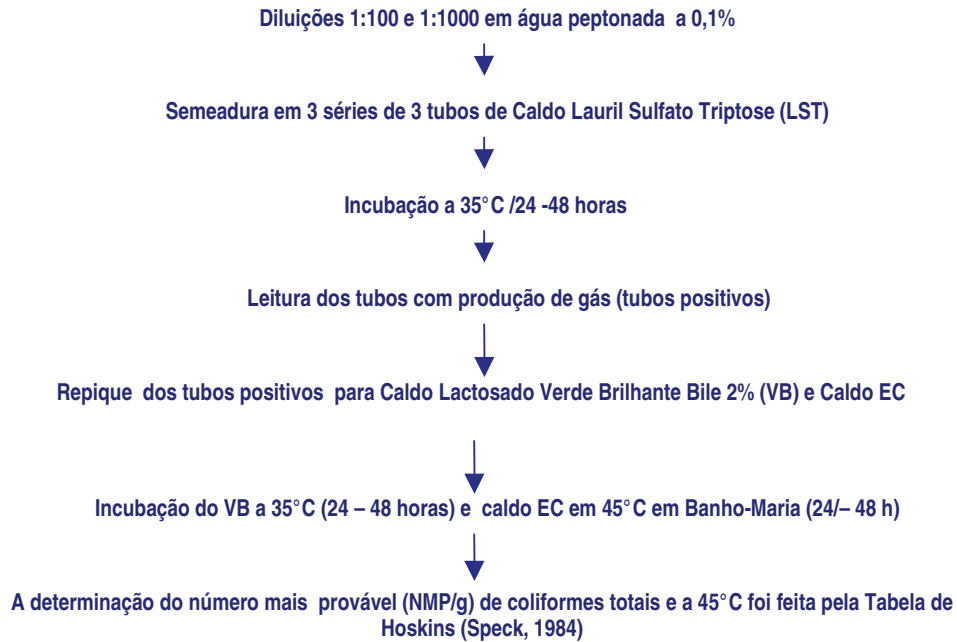
positivos, resultantes da desaminação oxidativa das peptonas do meio de cultura.

A partir da cultura de 24 horas em TSI com reação suspeita de *Salmonella* spp. procedeu-se ao teste sorológico somático polivalente em lâmina de vidro ou placa de Kline. Foi colocado em dois quadrados duas gotas de soro fisiológico e uma alçada do microrganismo a partir o Agar TSI. Emulsionou-se bem a cultura. Sobre um dos quadrados adicionou-se uma gota de anti-soro polivalente anti-Salmonella e emulsionou-se bem. Segurando a lâmina contra um fundo preto bem iluminado, fazer delicados movimentos de inclinação e rotação da lâmina, para movimentar a emulsão, por um minuto, observando se ocorre aglutinação no quadrado com o anti-soro (prova positiva). Comparar com a aparência da emulsão no quadrado com salina (controle negativo), para não confundir a aparência turva da emulsão com a reação de aglutinação. Eventualmente pode ocorrer aglutinação em ambos os quadrados (reação inespecífica), provavelmente causada por cepas rugosas e auto-aglutináveis.

3.5.3 NMP de coliformes a 35° C e NMP de coliformes a 45° C

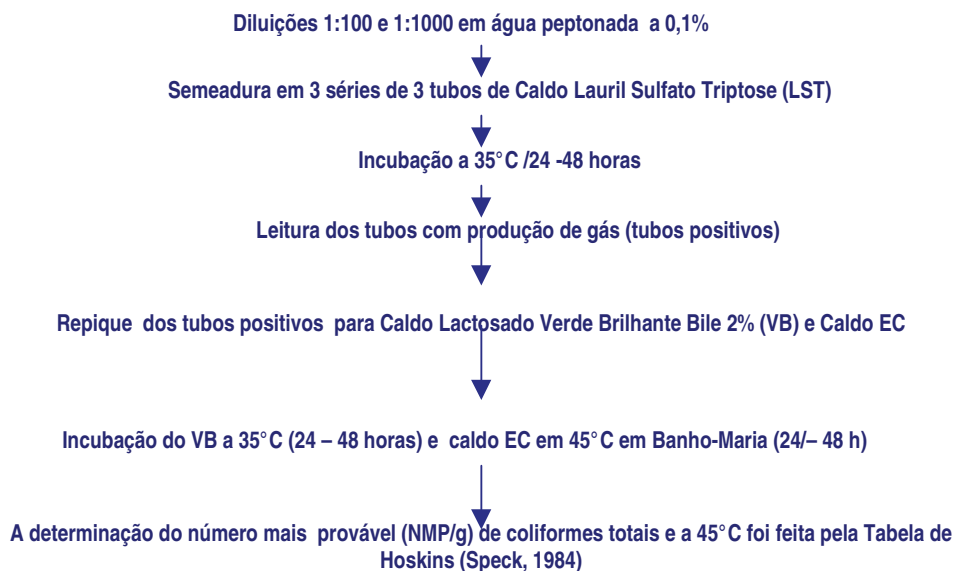
Foi usada a técnica dos tubos múltiplos com três séries de três tubos em cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) (figura 21 A e 21 B). Usou-se como meio presuntivo o Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), com incubação a 35°C (24 -48 horas). Os tubos positivos apresentam gás e devem ser repicados para Caldo Lactosado Verde Brilhante Bile 2% (VB) e Caldo EC /35° C (24-48 h) e a 45° C em Banho-Maria (24-48 h). A determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e a 45° C foi feita pela Tabela de Hoskins (Speck, 1984).

FIGURA 21-A ESQUEMA DEMONSTRADO A TÉCNICA DE NMP DE COLIFORMES A 35° C



FONTE: AOAC. 2003

FIGURA 21-B ESQUEMA DEMONSTRADO A TÉCNICA DE NMP DE COLIFORMES A 45° C



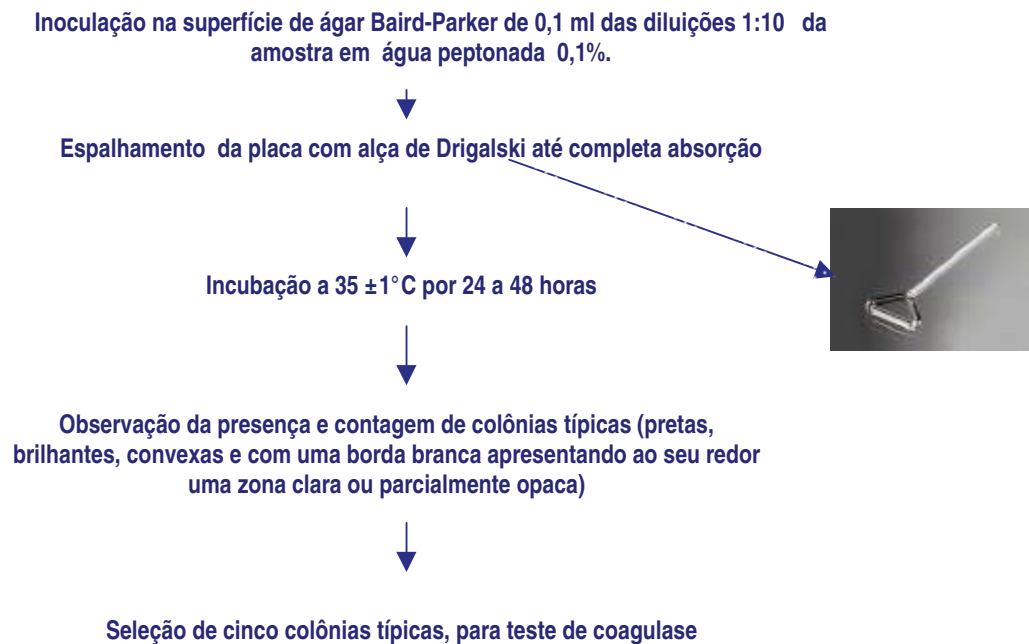
FONTE: AOAC.2003

3.5.4 Contagem de Estafilococos coagulase positiva

Foram inoculadas em placas previamente preparadas e secas, 0,1 ml das diluições selecionadas de amostra em ágar Baird-Parker suplementadas com emulsão de gema de ovo a 20% em solução fisiológica e solução de telurito de potássio a 1% em água, conforme recomendação do fabricante (figura 21 C). As placas foram espalhadas com alça de Drigalski até completa absorção da maior para as de menor diluição. Estas foram incubadas a $35 \pm 1^\circ \text{C}$ por 24 a 48 horas. Após incubação foram selecionadas as placas que continham entre 20 e 200 colônias, com as seguintes características: pretas, brilhantes, convexas e com uma borda branca (1 a 1,5 mm de diâmetro após 24 horas e 1,5 a 2,0 mm após 48 horas) apresentando ao seu redor uma zona clara ou parcialmente opaca. Eventualmente foram observadas a presença de placas com colônias atípicas que são cinzentas, sem um ou ambos os halos típicos.

Foram selecionadas cinco colônias típicas, para teste de coagulase, e quando ocorreu a presença de menos de cinco, foram selecionadas todas. Nos casos em que a placa apresentou colônias suspeitas de mais de um tipo, típicas e atípicas, selecionou-se cinco de cada tipo, ou um número proporcional à distribuição dos diferentes tipos na placas. Cada colônia foi transferida para um tubo de Caldo Infusão Cérebro-Coração.

FIGURA 21 C ESQUEMA DEMONSTRADO A TÉCNICA DE CONTAGEM DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA



FONTE: AOAC. 2003

3.5.4.1 Teste de coagulase

Foi transferido 0,2 ml de cada cultura obtida em BHI, para um tubo de 10x100mm. Foi adicionado aos 0,2ml de cultura 0,5 ml de Coagulase Plasma- EDTA (plasma de coelho com EDTA) misturando com movimentos de rotação, sem agitar os tubos para não interferir na coagulação. Os tubos foram incubados a 35°C e foi observada a formação de coágulo a cada hora pelo período de 6 horas. Reações positivas de nível 3 ou 4 são consideradas confirmativas da presença de *S. aureus*.

3.5.4.2 Cálculo de Resultados

O cálculo do número de UFC/g de *Estafilococos* coagulase positiva foi determinado em função do número de colônias típicas contadas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas na prova de plasmó coagulase.

Os experimentos foram realizados na Seção de Microbiologia do Laboratório Central do Estado e Laboratório (Secretaria de Estado da Saúde) no Laboratório de Controle de Qualidade II do Departamento de Farmácia (Universidade Federal do Paraná).

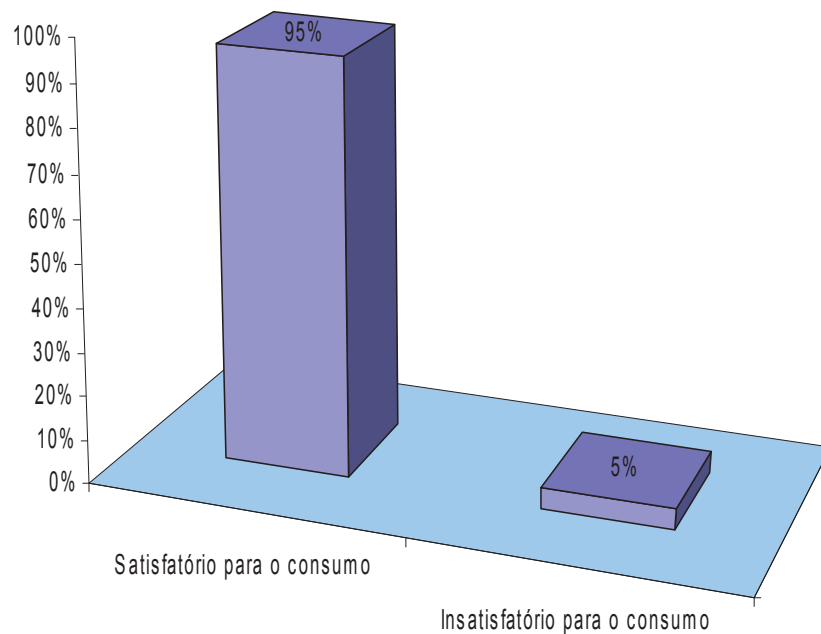
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RESULTADOS

As 60 amostras foram coletadas em 13 municípios, totalizando 27 microempresas produtoras de gelados comestíveis, representando uma cobertura de 67,5% dos estabelecimentos cadastrados na Vigilância Sanitária (40 fábricas).

A figura 22 representa o resultado da análise microbiológica das 60 amostras de gelados comestíveis coletadas em fábricas da 2ª RS no ano de 2004. Destas amostras, 57 (95%) apresentaram-se como satisfatórias para o consumo em relação ao padrão microbiológico vigente (RDC nº 12 de 02.01.2001 da ANVISA/MS), sendo consideradas como insatisfatórias apenas 3 amostras (5%).

FIGURA 22: RESULTADO DA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE GELADOS COMESTÍVEIS COLETADAS EM FÁBRICAS DA 2ª RS NO ANO DE 2004 – CRITÉRIO SATISFATÓRIO PARA O CONSUMO OU INSATISFATÓRIO PARA O CONSUMO



FONTE: Gráfico original da pesquisa. 2004

O Quadro 03 apresenta o resultado da análise microbiológica das amostras de gelados comestíveis a base de leite e os parâmetros realizados considerando como padrão microbiológico a RDC n° 12 de 02/01/2001 da ANVISA/MS para a pesquisa de *Salmonella* spp, contagem de estafilococos coagulase positiva, NMP de coliformes a 45° C e a pesquisa de *Listeria monocytogenes* no caso de situação de risco epidemiológico que justifique alerta sanitário conforme indicação desta legislação e para a pesquisa de coliformes a 35° C o limite anteriormente estabelecido pela Portaria 451, de 19 de setembro de 1997 precedentes à RDC n° 12 de 02/01/2001 da ANVISA/MS.

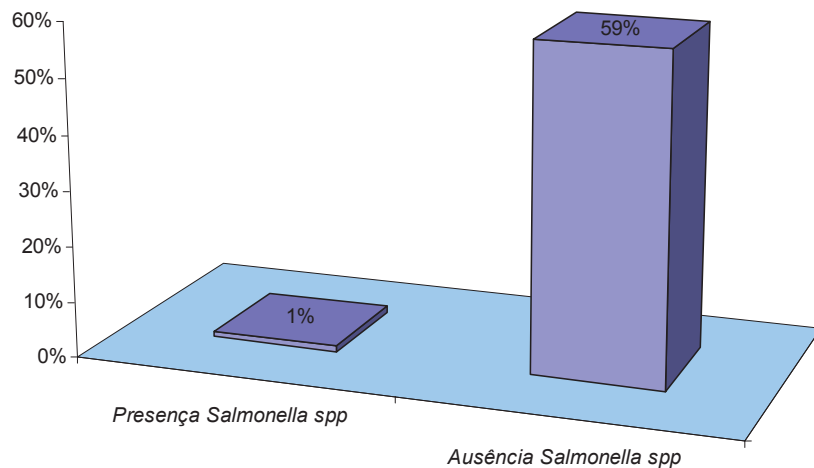
QUADRO 03: RESULTADOS LABORATORIAIS DAS AMOSTRAS GELADOS COMESTÍVEIS COLETADAS ENTRE OS MESES DE MARÇO A DEZEMBRO DE 2004 NA 2ª RS – CURITIBA.

	Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i>	NMP de Coliformes a 35 ° C	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp	Contagem de Estafilococos coagulase positiva	NMP de Coliformes a 45 ° C
1	Ausência / 25 g	> 1,1 x 10 ⁴ /g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
2	Ausência / 25 g	> 1,1 x 10 ⁴ /g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
3	Ausência / 25 g	> 1,1 x 10 ³ /g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
4	Ausência / 25 g	1,1 x 10 ³ /g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	4,0 / g
5	Ausência / 25 g	> 1,1 x 10 ³ /g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
6	Ausência / 25 g	> 1,1 x 10 ³ /g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
7	Ausência / 25 g	4,0/ g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
8	Ausência / 25 g	4,0/ g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
9	Ausência / 25 g	1,1 x 10 ³ /g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
10	Ausência / 25 g	4,3 x 10/ g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
11	Ausência / 25 g	< 3,0 / g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
12	Ausência / 25 g	4,6 x 10 ² /g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0/g
13	Ausência / 25 g	9,3 x 10/ g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	4,0 / g
14	Ausência / 25 g	2,3 x 10/ g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
15	Ausência / 25 g	9,3 x 10/g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
16	Ausência / 25 g	2,3 x 10/ g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
17	Ausência / 25 g	< 3,0 / g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
18	Ausência / 25 g	2,3 x 10/ g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
19	Ausência / 25 g	< 3,0 / g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
20	Ausência / 25 g	1,5 x 10/g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
21	Ausência / 25 g	4,0/g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	4,0/ g
22	Ausência / 25 g	4,3 x 10/g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
23	Ausência / 25 g	> 1,1 x 10 ³ /g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
24	Ausência / 25 g	2,4 x 10 ² /g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
25	Ausência / 25 g	4,3 x 10/g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
26	Ausência / 25 g	4,3 x 10/g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
27	Ausência / 25 g	2,3 x 10/ g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
28	Ausência / 25 g	4,0 / g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0/g
29	Ausência / 25 g	2,3 x 10/g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0/g
30	Ausência / 25 g	7,5 x 10/g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
31	Ausência / 25 g	> 1,1 x 10 ³ /g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	<3,0 /g
32	Ausência / 25 g	> 1,1 x 10 ³ /g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
33	Ausência / 25 g	> 1,1 x 10 ³ /g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
34	Ausência / 25 g	2,3 x 10/g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
35	Ausência/25g	9,3 x 10/ g	Presença / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
36	Ausência / 25 g	2,3 x 10/ g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
37	Ausência / 25 g	< 3,0 / g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
38	Ausência / 25 g	< 3,0 / g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
39	Ausência / 25 g	4 / g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
40	Ausência / 25 g	< 3,0 / g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
41	Ausência / 25 g	> 1,1 x 10 ³ /g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
42	Ausência / 25 g	4,6 x 10 ² /g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	4,0/ g
43	Ausência / 25 g	4,6 x 10 ² /g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
44	Ausência / 25 g	2,4 x 10 ² /g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	1,5 x 10 / g
45	Ausência / 25 g	> 1,1 x 10 ³ /g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	2,4 x 10 ² / g
46	Ausência / 25 g	2,4 x 10 ² /g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	2,4 x 10 ² / g
47	Ausência / 25 g	1,5 x 10 ² /g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
48	Ausência / 25 g	4,3 x 10 ² /g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
49	Ausência / 25 g	9,3 x 10 / g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
50	Ausência / 25 g	< 3,0 / g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
51	Ausência / 25 g	< 3,0 / g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
52	Ausência / 25 g	< 3,0 / g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
53	Ausência / 25 g	4,3 x 10/ g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
54	Ausência / 25 g	< 3,0 / g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
55	Ausência / 25 g	2,3 x 10/ g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
56	Ausência / 25 g	2,1 x 10 ² /g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
57	Ausência / 25 g	9,0/g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
58	Ausência / 25 g	4,6 x 10 ² /g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
59	Ausência / 25 g	9,3 x 10 / g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
60	Ausência / 25 g	9,3 x 10 / g	Ausência / 25 g	< 1,0 x 10 ² UFC/g	< 3,0 / g
	Em situação de risco epidemiológico que justifique alerta sanitário	Portaria 451, de 19 de setembro de 1997	Portaria RDC 12 da ANVISA/ MS de 02/01/2001	Portaria RDC 12 da ANVISA/ MS de 02/01/2001	Portaria RDC 12 da ANVISA/ MS de 02/01/2001
	Ausência / 25 g	Máximo 100 / g	Ausência / 25 g	Max. 500 UFC/g	Max. 50 / g

FONTE: Quadro original da pesquisa. 2004

Considerando a metodologia de análise (método rápido VIP), das 60 amostras analisadas de gelados comestíveis, não foi constatada a ocorrência de *Listeria* spp. Também não foi constatada a presença de Estafilococos Coagulase Positiva acima do limite estabelecido em nenhuma das amostras analisadas. Entretanto ocorreu o isolamento de *Salmonella* spp. em 2% das amostras analisadas e 3% das amostras apresentavam Coliformes de origem fecal. Este achado indica um risco epidemiológico para a população e torna o produto impróprio para o consumo (figuras 23 e 24).

FIGURA 23 PESQUISA *Salmonella* spp. - CRITÉRIO DE PRESENÇA OU AUSÊNCIA EM 25 g DE AMOSTRA INDICANDO UM RISCO EPIDEMIOLÓGICO PARA A POPULAÇÃO



FONTE: Gráfico original da pesquisa. 2004

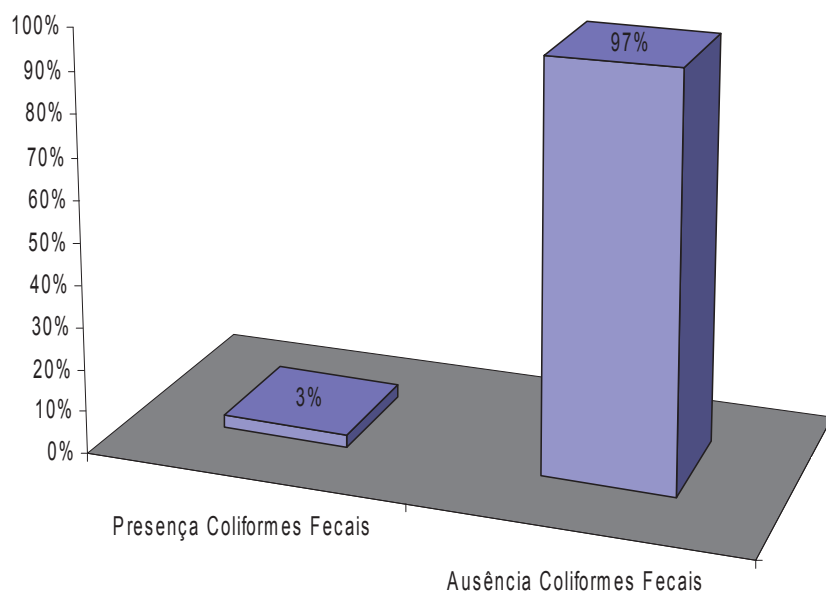
Com relação a coliformes de origem fecal a 45 °C, obteve-se 3 % das amostras contaminadas (figura 24). A utilização de produtos industrializados para a confecção de sorvetes possivelmente impediu o uso de matéria-prima de qualidade inferior, mas não impediu a transferência dos microrganismos da microbiota dos manipuladores. Este fato contaminou a mistura no momento da fabricação. Isto também demonstra que há necessidade de se instruir adequadamente o contingente

de manipuladores sob aspectos de higiene pessoal.

As bactérias do grupo coliforme são consideradas os principais indicadores de contaminação fecal. Este grupo é formado por um número de bactérias que inclui os gêneros *Klebsiella*, *Escherichia*, *Serratia*, *Erwenia* e *Enterobactéria*. Todas as bactérias coliformes são gram-negativas, não esporuladas e que estão associadas com as fezes de animais de sangue quente e com o solo. Os coliformes considerados coliformes fecais reproduzem-se ativamente a 44,5 °C e são capazes de fermentar carboidratos.

A presença de coliformes fecais em alimentos indica poluição sanitária nas amostras de gelados comestíveis. Utiliza-se o termo bactérias coliformes fecais, porque estas bactérias estão restritas ao trato intestinal de animais homeotérmicos. A determinação da concentração dos coliformes assume importância como parâmetro indicador de possível existência de microrganismos patogênicos, responsáveis pelas doenças de veiculação hídrica. Entre outras, estão as bactérias de febre tifóide, febre paratifóide, desintéria bacilar e cólera.

FIGURA 24 PESQUISA DO NMP – COLIFORMES A 45° C. MÁXIMO 50 / g INDICANDO POLUIÇÃO SANITÁRIA NAS AMOSTRAS DE GELADOS COMESTÍVEIS



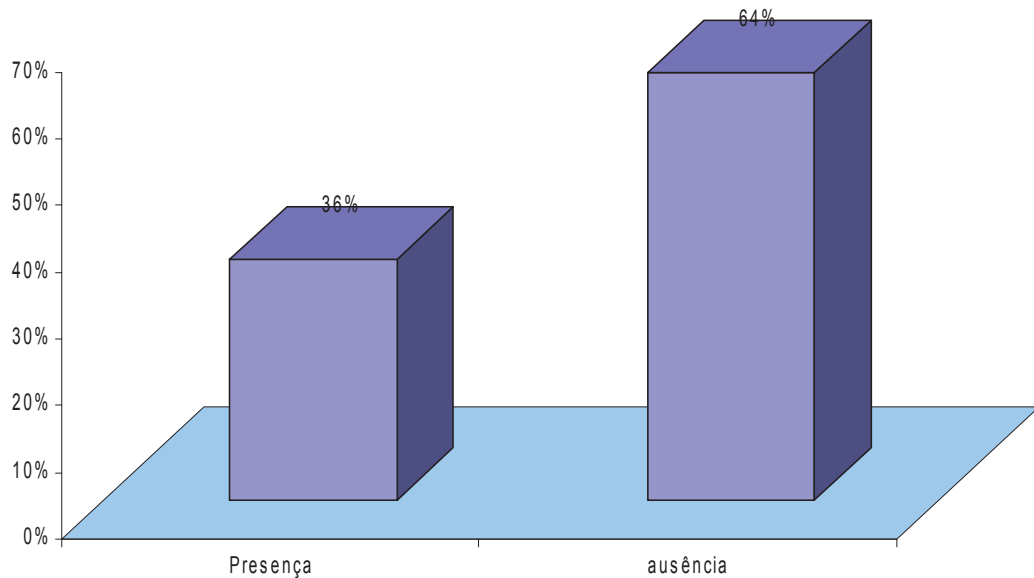
FONTE: Gráfico original da pesquisa. 2004

Estes dados podem ser discutidos devido ao processo de implementação do trabalho desenvolvido no triênio (2001-2004) pelas Vigilâncias Estadual e Municipal da 2ª Regional de Saúde. A Vigilância Sanitária optou em realizar um trabalho de correção não punitivo, ou seja, ao invés de fechar ou interditar os estabelecimentos produtores de gelados comestíveis, a VISA optou em orientar o fluxo de trabalho no sentido de aplicação de alguns itens importantes de Boas Práticas de Fabricação.

Na presente investigação a contaminação por coliformes totais em amostra submetidas a 35° C ocorreu em 36% (figura 25). A presença do grupo de bactérias de Coliforme de origem ambiental denota que ocorreu uma interferência externa no ato de produção dos ingredientes da mistura. Isto também indica que o produtor não adotou

boas práticas de fabricação, e facilitou a contaminação da matéria por agente externo. Este tipo de contaminação pode ocorrer antes, durante e depois da fabricação (no envase), devido À natureza do processo ou pelo fato da embalagem não estar devidamente higienizada, ou no transporte e armazenamento, no caso da embalagem não ser absolutamente estanque.

FIGURA 25 NMP COLIFORMES A 35° C INDICANDO A INTERFERÊNCIA EXTERNA NO ATO DE PRODUÇÃO DOS INGREDIENTES DA MISTURA



FONTE: Gráfico original da pesquisa. 2004

Foi constatada durante a pesquisa que, pelo menos, 50% das microempresas introduziram equipamentos destinados à pasteurização (figura 26) e à maturação de gelados comestíveis.

FIGURA 26 INSTALAÇÃO DE FÁBRICA - GELADOS COMESTÍVEIS EM SÃO JOSÉ DOS PINHAIS / 2º RS, REGIONAL METROPOLITANA DE CURITIBA, PARANÁ, 2004



FONTE: Foto original da pesquisa. 2004

Os resultados microbiológicos nulos para *Listeria monocytogenes* e Estafilococos Coagulase Positiva constatados podem ser esclarecidos visto que até mesmo os locais com deficiência higiênico-sanitária foram verificados a utilização de produtos industrializados para a confecção dos gelados comestíveis como o leite UHT e emulsificantes e estocagem adequada (figura 27).

FIGURA 27 ESTOCAGEM DA MATÉRIA-PRIMA INDUSTRIALIZADA PARA CONFEÇÃO DE SORVETES, 2ª RS, REGIONAL METROPOLITANA DE CURITIBA, PARANÁ, 2004



FONTE: Foto original da pesquisa

A Portaria nº 370 de 04.09.1997 determinou a inclusão de Citrato de Sódio para fixação de identidade e qualidade de leite U.H.T (U.A.T.) (BRASIL,1997).

O leite UHT (ultra Alta Temperatura = UAT) homogeneizado é submetido, durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura entre 130° C e 150° C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo com imediato resfriamento a uma temperatura inferior a 32° C e em seguida é envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas.

O leite UHT (UAT) integral, semi-desnatado ou parcialmente desnatado ou desnatado pode ser acrescentada a expressões "Longa Vida" e/ou homogeneizado. O leite UHT (UAT) é envasado em embalagens adequados para as condições previstas de armazenamento e que garantam a hermeticidade da embalagem e uma proteção apropriada contra a contaminação. Este leite deve atender a Critérios Microbiológicos e

tolerâncias. O leite UHT (UAT) não deve ter microrganismos capazes de proliferar em condições normais de armazenamento e distribuição.

4.2 DISCUSSÃO

Analisando-se comparativamente os dados obtidos através da presente pesquisa / ano 2004 e o número de amostras insatisfatórias da Regional de Saúde - Metropolitana, segundo o resultado dos laudos de análise anteriores, observa-se uma maior proporção de produtos considerados como inaceitáveis e impróprios para o consumo nos anos de 1998 e 2000. No ano de 1999, a maioria das amostras foi classificada como em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias.

A pesquisa revelou também, que no ano de 1999, das 54 amostras de gelados comestíveis em que se pesquisou a presença da enzima fosfatase pelo serviço estadual de vigilância sanitária, seis amostras (10,0%) acusaram a fosfatase positiva.

Esses resultados indicaram que houve a utilização de leite *in natura* ou a mistura de leite pasteurizado com leites crus durante o processo de fabricação. Indicaram também uma relação tempo-temperatura insuficiente e até mesmo a ausência de qualquer tratamento térmico da mistura do sorvete.

Os resultados obtidos pela análise de amostras de sorvetes produzidos na 2ª RS como pela pesquisa em banco de dados apontam para a necessidade de uma revisão dos padrões nacionais para esses alimentos. Com a exclusão da pesquisa de microrganismos indicadores dos atuais padrões microbiológicos, os resultados de análise não permitem uma avaliação das condições de processamento e podem sugerir uma conclusão dos laudos não coerente com a realidade higiênica dos produtos.

Das 40 fábricas que constavam do cadastro inicial obtido pela pesquisa em banco de dados, a pesquisa de campo confirmou a existência dessa 40 em funcionamento na RMC, no período de janeiro a dezembro de 2004.

As 40 fábricas (100%) enquadravam-se na categoria de micro-empresa, segundo os critérios adotados pelo SEBRAE, apresentando um número de funcionários

de até 19 empregados. Apenas 3 fábricas (7,5%) contavam com mais de 5 funcionários e 37 (92,5%) com menos de 5 empregados. A pesquisa de campo revelou que a etapa da pasteurização da mistura era aplicada por somente 15 fábricas (37,5%). Somente em três fábricas (7,5%) as etapas de pasteurização, homogeneização e maturação eram aplicadas.

Duas fábricas (5,0%) utilizavam-se da etapa da pasteurização seguida da maturação, porém sem uma fase própria para a homogeneização que não aquela aplicada no equipamento pasteurizador quando da preparação da mistura. A etapa da pasteurização sem a homogeneização e a maturação, foi observada em dez estabelecimentos (25,0%). Em 25 fábricas (62,5%) aplicavam apenas as etapas de preparo da mistura dos ingredientes, batimento e congelamento, envase, congelamento final e estocagem, sem qualquer tratamento térmico da mistura.

A adoção desse tipo de fluxo de produção aumenta a possibilidade da presença de perigos microbianos significativos para a segurança do produto, além de problemas relacionados com a qualidade sensorial e a aparência do produto final.

Comparando-se os resultados das análises microbiológicas com os fluxos de processamento adotados pelas fábricas de sorvete da RMC, o estudo demonstrou que os atuais parâmetros microbianos definidos pela legislação sanitária não revelam as reais condições de fabricação desses produtos.

Até o ano 2000, os resultados foram emitidos com base na Portaria n° 451, de 19 de setembro de 1997, substituída pela Resolução RDC n° 12, de 01 de janeiro de 2001, que alteraram os padrões para gelados comestíveis, dispensando a pesquisa de coliformes totais e a contagem padrão em placas e permitindo a presença de coliformes fecais dentro do limite de 500 UFC/g (ANVISA, 2001).

Os padrões nacionais vigentes para esta categoria de alimentos diferem dos preconizados pelo *Codex Alimentarius* e adotados pela União Européia e pelo FDA, que recomendam também a pesquisa de coliformes totais e a contagem padrão em placas (FAO, 1981; FDA, 2000).

Comparando-se os resultados obtidos com a análise de amostras de sorvetes produzidos por empresas da área de estudo com os gerados pela pesquisa em banco de dados, tanto na área da 2ª Regional de Saúde como no total do Paraná, percebe-se que o índice de aprovação de 95% das amostras (Quadro 04) pôde ter sido influenciado pelos atuais padrões de exigência de adequações com vistas à pasteurização.

Esses achados poderiam ser explicados, também, por uma melhoria suficiente das condições de fabricação desse alimento no ano de 2004 para causar um impacto nos resultados laboratoriais.

QUADRO 04: ÍNDICE DE APROVAÇÃO - COMPARATIVO PESQUISA ANTERIOR (1998-2001) E PESQUISA ATUAL (2003/2005)

	1998/2001 Pesquisa anterior	2003/2004 Pesquisa atual
<i>Listeria monocytogenes</i>	Não pesquisada	Ausente
Impróprio para o consumo (Salmonella spp, Estafilococos, Coliformes fecais)	39,5 % de Risco Epidemiológico (Salmonella spp, Estafilococos coagulase positiva, Coliformes fecais)	5 % Risco Epidemiológico (Salmonella spp, Coliformes fecais, Estafilococos coagulase positiva) 36 % (anterior a 1997)
Índice de Aprovação	40,5 %	95% (RDC 12) 64 % (se fosse anterior a 1997)

Fonte: Quadro original da pesquisa. 2004

Observa-se que os motivos de condenação das amostras no Estado do Paraná nos anos de 1998 a 2001 foram a presença do número mais provável (NMP) de coliformes totais (39,5%) devido a na Portaria n° 451, de 19 de setembro de 1997 que incluía a pesquisa de coliformes totais.

Segundo HOFFMANN et al., (2000) contagens altas coliformes totais em sorvete indicam a utilização de matéria-prima contaminada, limpeza e desinfecção de superfícies inadequadas, higiene insuficiente nas operações ou a combinação dessas circunstancia. Sugerem ainda a possibilidade de contaminação pós-processamento, limpeza e sanitização inadequadas ou o conjunto desses fatores (FALCÃO, 1996).

Foi detectada a presença de *Salmonella* spp. (3%) nas amostras analisadas nesta série. Os estudos indicam a presença do patógeno em amostras de sorvete, sugerindo a possibilidade de utilização de leite *in natura* na fabricação dos produtos (FALCÃO, 1996).

A pesquisa do número mais provável de coliformes fecais tomou-se obrigatória a partir de 2001, entretanto a sua presença em sorvetes não era tolerada pela Portaria n ° 451/97 que vigorava antes desse período (BRASIL, 1997).

No ano de 1998 foi verificada a presença de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* acima da dose infectante em duas amostras referentes à investigação de um surto de enfermidade transmitida por sorvete em Curitiba (PARANÁ, 1998). GALLARDO (2000) ressalta que as intoxicações estafilocócicas provocadas por sorvetes geralmente ocorrem como conseqüência da contaminação da mistura e a sua manutenção em temperaturas inadequadas, permitindo a multiplicação do *Staphylococcus aureus* acima da dose infectante e a conseqüente produção de toxina.

5. CONCLUSÃO

No ano de 1998, a Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, analisou 77 amostras de sorvete de massa, revelando que 41 amostras (53%) se encontravam em desacordo com os padrões microbiológicos estabelecidos. No entanto, a legislação mudou com a edição da RDC 12 de 02.01.2001 - ANVISA/MS suprimindo o item relativo à contaminação por Coliformes de origem ambiental.

Após processamento e análise das amostras verificou-se que houve investimentos que propiciaram uma melhora na qualidade dos gelados comestíveis na região compreendida pela 2ª Regional de Saúde Metropolitana de Curitiba.

O trabalho desenvolvido pela VISA estadual e municipal com o objetivo de orientação às Boas Práticas de Fabricação, fez com que os proprietários dessas pequenas empresas investissem em processos de melhoria da qualidade da produção.

Muitos dos locais ainda apresentam deficiência nos aspectos sanitários, mas a utilização de matéria-prima industrializada, principalmente o leite UHT, proporcionou uma diminuição da contaminação microbiana nesses produtos.

Este trabalho demonstrou que os gelados comestíveis da Região Metropolitana de Curitiba não são produzidos com todas as condições higiênico-sanitárias recomendadas, como foi revelado pelos os resultados da avaliação microbiológica.

A presença de microrganismos patogênicos e não patogênicos, especialmente os coliformes fecais indicam que os gelados comestíveis produzidos na região metropolitana de Curitiba ainda não possuem uma sistematização de fabricação eficaz que garanta a higidez do produto.

A ocorrência de *Listeria monocytogenes* foi constatada nas outras 21 Regionais de Saúde da Secretaria de Estado da Saúde. A existência de grande

produção leiteira no Estado do Paraná indica que existe uma produção excedente de leite. Geralmente, o leite excedente é processado em indústrias caseiras ou em médias empresas. Culturalmente, o consumidor entende que esses produtos oriundos dessas pequenas empresas têm a natureza “saudável”, uma vez que associam o campo e a natureza às práticas saudáveis de vida.

No entanto, as práticas saudáveis de vida podem estar associadas aos patógenos, entre eles, a *Listeria monocytogenes*.

A pesquisa sugere que o estudo possa ser estendido para as outras 21 Regionais de Saúde com o objetivo de se contemplar os 399 municípios do Estado do Paraná.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MURRAY, E. G. D.; WEBB, R. A.; SWANN, M. B. R. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis: caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. **Journal of Pathology and Bacteriology**, Edinburgh, v. 29, p. 407-439, 1926.

PIRIE, J.H.H. *Listeria*: change of name for a genus of bacteria. **Nature**, London, n.145, p.264, 1940.

GRAY, M. L.; KILLINGER, A.H. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v. 30, n.2, p.309-382, June 1966.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regulamentação da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**. Brasília, 1980. 166 p.

PEARSON, L. J.; MARTH, E. H. *Listeria monocytogenes*: threat safe a food supply. **Journal Science Dairy**, v.73, p. 912-928, 1980.

MERCK. **Manual de médios de cultivo**. Dormstadt, 1982

FALCÃO, D. p. et al. Exame microbiológico de sorvetes não pasteurizados. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, n. 17, p. 2-8, 1983.

DAVIES, L.W.; EWAN, E.P.; VARUGHESE, P.; ACRES, S.E. *Listeria monocytogenes* infections in Canada. **Clinical Invest. Medical**, v. 7, n.4, p.315-320, 1984.

DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, L.; FERNADEZ-GARAYZABAL, J.F.; VASQUEZ-ROLAND, J. A.; RODRIGUEZ-FERRI, E.; SUAREZ-FERNANDEZ, G. Isolation de micro-organismes du genre *Listeria* à partir de la lait cru destine à la consommation humaine. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.31, n.10, p. 938-41, Oct. 1985

DOYLE, M. P.; MESKE, L. M.; MARTH, E. H. Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufactory and storage of non fat dry milk. **Journal of Food Protection**, v. 48, n.9, p740-742, 1985.

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

BECKERS, H. J. Incidence of foodborne diseases in Netherlands: annual summary, 1982 and an overview from 1979 to 1982. **J. Food Prot.**, v.51, p.327-333, 1988

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

FRASER, J.A.; SPERBER, W.H. Rapid detection of *Listeria spp* in food and environmental samples by esculin hydrolisis. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 551, n.10, p.762-765, Oct., 1988.

GOLDEN, D. A.; BEUCHAT, L.R.; BRACKETT, R.E. Inactivation and injury of *Listeria monocytogenes* as affected by heating and freezing. **Food Microbiology**, v.4, n.1, p.17-23, 1988.

LOESSNER, M.J.; BELL, R.H.; JAY, J.M.; SHELEF, L.A. Comparison of seven plating media for enumeration of *Listeria* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 3003-3007, Dec. 1988.

MCCLAIN, D.; LEE, W. H. Development of USDA- FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v.71, n.3, p. 660-664, 1988.

OBLINGER, J. L. (Ed.). Bacteria associated with foodborne diseases. **Food Technol.**, v.42, p.181-200, 1988

SMITH, A. R. B.; ARCHER, D. L. Heat- induced injury in *Listeria monocytogenes*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 3, n.1, p.105-110, 1988.

SWAMINATHAN, B.; HAYES, P.S.; PRZYBYSZEWSKI, A. Evaluation of enrichment and planting media for isolating *Listeria monocytogenes*. **Journal Assoc. Off. Chemical**, v.71, p.664-668, 1988.

CASSIDAY, P. K.; BRACKETT, R.E. Methods and media to isolate and enumerate *Listeria monocytogenes*: a review. **Journal of Food Protection**, v.52, n.3, p.207-214, 1989.

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

LACHICA, R.V.F., P.D. Hoeplich and C. Genigeorgis. Metachromatic agar-diffusion microslide technique for detecting staphylococcal nuclease in foods. **Appl. Microbiol.** 21:585- 587. 1989.

HALPIN-DOHNALEK, M.I. ; MARTH, E.H. *Staphylococcus aureus*: Production of extracellular compounds and behavior in foods - a review. **J. Food Protect.** 52(4):267-282. 1989.

ARCHER, D. L. *Listeria monocytogenes*. What is its ecological niche In: MILLER, A.L.; SMITH, J.L.; SOMKUTI, G.A. (Eds.). **Foodborne Listeriosis**. Amsterdam: Elsevier, 1990. p.5-8.

BAHK, J.; MARTH, E.H. Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. In: CLIVER, D.O. (Ed.). **Foodborne diseases**. San Diego: Academic Press, 1990. Cap. 18, p. 247-57.

BAYLEY, J. S.; FLETCHER, D.L.; COX, N. A. Effect of enrichment of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.53, n.6, p.505-507, June, 1990a.

BAYLEY, J. S.; FLETCHER, D.L.; COX, N. A. Efficacy of enrichment media for recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 53, n.6, p.473-477, June 1990b.

BESSESEN, M. T. Detection of *Listeria monocytogenes* by using the polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n. 9, p.2930-2932, Sept. 1990.

HITCHINS, A.D.; TRAN, T. Initial cell concentration and selective media effects on the isolation of *Listeria monocytogenes* from enrichment cultures of inoculated foods. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 53, n. 6, p. 502- 504, June 1990.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v.53, n. 3, p.476 –511, 1991.

FARBER, J.M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 55, p. 476-511, 1991.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS – ICMSF. **El Sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos; su aplicación a las industrias de alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1991.

LUND, A.M.; ZOTTOLA, E.A.; PUCH, D. J. comparison of methods for isolation of *Listeria* from raw milk. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.8, p. 602-606, Aug., 1991.

RAINALDI, L.; LUCIANI, M.A.; PICCONI, F. behavior of *Listeria spp.* in meat products. **Italian J. Food Sci.**, Roma, v.3, n.4, p.291-296, 1991.

RYSER, E. T.; MARTH, E. H. **Listeria, listeriosis, and food safety**. New York: Marcel Dekker, 1991. 631 p

SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C. V. Epidemiology of human listerioses. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.4, p.169-183, 1991.

VARNAM, A. H.; EVANS, M.G. **Foodborne pathogens: a illustrated text**. London: Wolfe Publishing, 1991.

BILLE, J.; CATIMEL, B.; BANNERMAN, E. *et al.* Api Listeria: a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.6, p.1857-1860, 1992.7

DONNEL Y. C. W., BRIGGS, E. H.; DONNELLY, L.S. Comparison of heat resistance of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washiington, v.53, p. 1433-1438, 1992.

FITTER, S.; HEUZENROEDER; THOMAS, C.J. A combined PCR and selective enrichment method for rapid detection of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 34, p.53 –59, 1992.

GRAY, P. S. ; MOSSEL, A. **Food higiene in the EC**. **Brit. Food. J.**, v. 94, n.9, p.10 –13, 1992.

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

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 3 ed. American public Health Association, Washington, DC, 1218p., 1992.

WARBURTON, D. W.; FARBER, J. M.; POWELL, C.; TIWARI, N. P.; READ, S. et al. Comparison of methods for optimum detection of stressed and low levels of *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiol.**, v. 9, p.127-145, 1992.

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

NOTERMANS, S., GIESSEN van der, A. **Foodborne disease in the 1980s and 1990s, the Dutch experience.** Food Cont. v.4, p.122-4, 1993.

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

BAIRD-PARKER, A .C. Foods and microbiological risks. **Microbiology**, v.140, n.4, p.687 – 695, 1994.

GILBERT, R.J. **Foodborne infections and intoxications: recent problems and new organisms.** Brit. Food J., v. 96, p.85-7, 1994

HOLT, J.G.; KRIEG, N. R; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. Regular, nonsporing gram-positive rods. Genus *Listeria*. In: HENSLEY, W. R (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology.** 9thed. Baltimore: Williams Wilkins, 1994. p.565-570.

JEONG, D. K.; FRANK, J.F. Growth of *Listeria monocytogenes* at the 10°C in biofilms with microorganisms isolated from milk and dairy processing environments. **J. Food Prot.**, Ames, v.57, n.7, p.576-586, 1994.

Monge, Rafael; Utzinger, Dagmar; Arias, M. Laura. Incidence of *Listeria monocytogenes* in pasteurized ice cream and soft cheese in Costa Rica, 1992 . Rev. biol. trop;42(1/2):327-8, abr.-ago. 1994.

QVIST, S.; SEHESTED, K.; ZEUTHEN, P. Growth supression of *Listeria monocytogenes* in a meat product. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 24, n.2, p.283-293, 1994.

TWEDT, R. M. et al. Determination of the presence of *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products: IDF collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.77, n.2, p.395 – 402, 1994

SALYERS, A.; WHITT, D. Bacterial pathogenesis : a molecular approach

Washington, D.C. **ASM Press**, 1994

DALLAS, H.L.; THOMAS, D.P.; HITCHINS, A.D. Virulence of *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, and *Listeria innocua* assayed with in vitro murine macrophagocytosis. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 1, p. 24-27, 1995.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual**. 8 ed. AOAC International, Gathersburg, USA, 1995.

HOFFMAN, F. et al. Qualidade higiênico – sanitária de sorvetes comercializados na cidade de São José do Rio Preto – SP Brasil. **Boletim do CEPPA**, v. 13, n.2, Curitiba, jul./dez. 1995.

KLIMA, R. A., MONTVILLE, T. J. **The regulatory and industrial responses to listeriosis in the USA: a paradigm for dealing with emerging food borne pathogens**. **Trends Food Sci. Technol.**, v.6, p.87 – 93, 1995.

MANERU, L.; GARCÍA-JALÓN, I. *Listeria monocytogenes* en alimentos disponibles en el mercado de Pamplona. **Alimentaria**, Harac, v. 33, n.267, p.39-43, 1995.

TAPPERO, J.W.; SCHUCHAT, A.; DEEVER, K.A.; MASCOLA, L.; WENGER, J.D. Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States. Effectiveness of prevention efforts? The listeriosis study group. **JAMA J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.273, p.1118-1122, 1995.

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

FRANCO, B.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. 1 ed. São Paulo: Ateneu, 1996, 182 p.

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

MARSHALL, R. T., ARBUCKLE, W. S. **Ice cream**. Hapman & Hall, 1996

OJENIYI, B.; WEGENER, H.C.; JENSEN, N.E. et al. *Listeria monocytogenes* in poultry products: epidemiological investigations in seven Danish abattoir. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 80, p.395-401, 1996.

SCHLECH, W. F. Overview of listeriosis. **Food Control**, Guildford, v.7, n.4/5, p.183-186, 1996

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

BRASIL. **Portaria 451 de 19.09.1997**. Ministério da Saúde. ANVISA. (revogada).

BUCHANAN, R. L.; DAMERT, W.G.; WHITING, R.C.; VAN SCHOTHORST, M. Use of epidemiologic and food survey data to estimate a purposefully conservative dose-response relationship for *Listeria monocytogenes* levels and incidence of listeriosis. **J. Food Prot.**, Ames, v. 60, n.8, p.918-922, 1997.

DALTON, G.B.; AUSTIN, C.C.; SOBEL, J.; HAYES, P.S.; BIBB, W.F.; GRAVES, L.M.; SWAMINATHAN, B.; PROCTOR, M.E.; GRIFFIN, P.M. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 336, n.2, p.100-105, 1997.

GOFF, D. H. Colloidal Aspects of Ice Cream - a review. *Journal of Dairy Science*, n. 7, p. 363 - 373, 1997.

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

HERMAN, L.; BLOCK, J. D.; RENTERGHEM, R. VAN. Isolation and detection of *Clostridium tyrobutyricum* cells in semi-soft and hard cheeses using the polymerase chain reaction. **Journal of Dairy Research**, v. 64, p.311-314, 1997.

BRASIL. Portaria nº 370 de 04.09.1997. **Diário Oficial da União**. Setembro 1997. Ministério da Saúde

JONES, C.E.; SHAMA, G.; JONES, D.; ROBERTS, I.S.; ANDREW, P.W. Physiological and biochemical studies on psychrotolerance in *Listeria monocytogenes*. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.83, n.1, p.31-35, 1997.

JUNEJA, V.K.; SNYDER, O. P., MARMER, B.J.J. Potential for growth from spores of *Bacillus cereus* and *Clostridium botulinum* and vegetative cells of *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* serotypes in cooked ground beef during cooling. **J. Food. Prot.**, Ames, v.60, n.3, p.272-275, 1997.

KLEIN, P.; JUNEJA, V. Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription – PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.63, n.11, p. 4441 – 4448, Nov., 1997.

MANZANO, M. et al. A simple and fast PCR protocol to detect *Listeria monocytogenes* from meat. **Journal Sci. Food Agric.**, v. 74, p. 25-30, July, 1997.

McCARTHY, S. A. Incidence and survival of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat seafood products. **J. Food.Prot.**, Ames, v.60, n.4, p.372-376, 1997

McLAUHLIN, J. The identification of *Listeria* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 38, p.77-81, 1997

ORGANIZATION. *Codex Alimentarius* Commission. Norma CODEX STAN 137. Washington, 1981.

- *Codex Alimentarius* Commission. Food Hygiene Basic Texts. Hazard analysis and critical control point (HACCP) system and guidelines for its

application.CAC/RPC 1 - 1969, Rev.3 (1997), Roma, 1997.

- *Codex Alimentarius* Commission. CX / FH 00/10: Discussion Paper on the Application of HACCP in *Small/or* Less Developed Businesses. 33a seção, Washington, 2001.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.P.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997.

TOBIA, M.B.; MENGONI, G.B.; PELION, H.S. *Listeria monocytogenes* e *Listeria sp* em produtos termoprocessados. **Rev. Argentina Microbiologia.**, Buenos Aires, v.29, p.109-113, 1997.

POPOFF (M.Y.) and LE MINOR (L.): Taxonomy of the genus *Salmonella*. Changes in serovars nomenclature. *In*: M.Y. POPOFF and L. LE MINOR: Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 7th revision. **Institut Pasteur**, Paris, France, 1997, p. 5

DODHIA, H.; KEANEY, J.; WARBURTON, F. A Birthday Party, Home-made Ice Cream and an Outbreak of *Salmonella enteritidis* phage type 6 Infection. **Communicable Disease and Public Health**. Reino Unido, 1998.

DUGGAN, J.; PHILLIPS, C.A. *Listeria* in the domestic environment. **Nutrition Food Science**, London, v.213, n. 2, p.73-79, March/April, 1998.

GOLDEN, D. A.; BEUCHAAT, L.R.; BRACKETT, R.E. Direct planting technique for enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 71, n.3, p.647-650, May/June, 1988.

MANZANO, M. et al. A rapid method for the identification and partial serotypic of *Listeria monocytogenes* in food by PCR and restriction enzyme analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, p.207-212, 1998.

YOUSEF, A.E.; RYSER, E. T.; MAARTH, E. H. Methods for improved recovery of *Listeria monocytogenes* from cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 54, n.11, p.2643- 2649, Nov. 1988.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Portaria n.379, de 26 de abril de 1999. Aprova o regulamento técnico referente a gelados comestíveis, preparados, pós para o preparo e bases para gelados comestíveis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 29 abr. 1999.

BUBERT, A. et al. Detection and differentiation of *Listeria spp.* by a single reaction bases on Multiplex PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.10, p. 4688 -4692, Oct. 1999.

CAMARGO, N.J., **Cuidados dos alimentos – um desafio transnacional**. O Estado do Paraná. **Jornal Agrícola**. p.3, 17 Out.,1999.

DESEO, J. *Listeria monocytogenes* in processed meats. **AOAC Int.**, Arlington, v.3, n.4, p.23-24, 1999.

KAYAL, S.; LILIENBAUM, A.; POYART, C.; MEMET, S.; ISRAEL, A.; BERCHE, P. Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NF-Kappa B and upregulation of adhesion molecules and chemokines. **Molecular Microbiology**, v. 31, n.5, p.1709-1722, 1999.

LANDGRAF, I. M. et al. Surto de Meningite neonatal por *Listeria monocytogenes*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 58, n.1, p. 63-67, 1999.

LANDGRAF, I. M. et al. Surto de Meningite neonatal por *Listeria monocytogenes*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 58, n.1, p. 63-67, 1999.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. **Emerg. Infec. Dis.**, Atlanta, v. 5, n.5, p.607-625, 1999.

PANDIRIPALLY, V. K.; WESSTBROOK, D.G.; SUNKI, G.R.; BHUNIA, A.K. Surface protein p104 is involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to human intestinal cell line, Caco-2. **Journal Med. Microbiology**, v.48, p.117-124, 1999

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

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

RODRIGUES, D.A. ***Listeria sp* e *Listeria monocytogenes* em indústria processadora de nuggets de frango: estudo de ocorrência e avaliação de metodologias de análise**. São Paulo, 1999. 104 p. Tese (Mestrado), Universidade de São Paulo.

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

SIBÉR. Curso Técnico para Fabricação de Sorvetes. Campinas, 1999

BACCARIN, A. A história e o romantismo do sorvete. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE TECNOLOGIA EM SORVETES, Vassouras - RJ, 2000. Centro de Tecnologia de Produtos Alimentares / SENAI.

COSTA, O. P.; LUSTOZA, D. C. **Industrialização de Sorvetes**. Germantown International Limited, 2000

FUNGARO, M. H. P. (não é este autor PELEGRINNO, M.H.). PCR na micologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.3, p.12 - 16, 2000.

HOFFMAN, F. et al. Qualidade higiênico-sanitária de sorvetes comercializados na cidade de São José do Rio Preto (SP) Brasil. **Higiene Alimentar**, v. 11, n.76, p.62-68, nov. 2000.

PHAN-THANH, L.; MAHOUI, F.; ALIGÉ, S. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. **Int. J. Food Microbiol.**, v.55, p.121-126, 2000.

WINDRANTZ, P.; ARIAS, M. L. Evaluation of the bacteriological quality of ice cream sold at San Jose, Costa Rica. *Arch. latinoam. nutr*; 50(3):301-303, sept. 2000. tab.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA –ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC n. 112 de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico de princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 jan. 2001. Seção 1.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Codex alimentarius Commission. CX/FH OO/10. Discussion of HACCP in Small/or Less Developed Businesses. 33 seção. Washington. 2001.

HONG KONG. Microbiological Risk Assessment of Ice Cream. **Risk Assessment Studies**, v. 7. Food and Environmental Hyg. Dep., Queensway Government Offices, Hong, Kong, sset. 2001.

LOUGUERCIO, A. P. et al. *Listeria monocytogenes*: um importante patógeno de origem alimentar. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n.80-81, p.39-48, jan./fev., 2001.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde. **Laudos de Análises Laboratoriais de Gelados Comestíveis do período de 1998 a 2001**. Arquivo da Divisão de Vigilância Sanitária de Alimentos. Curitiba, 2001.

SILVA JR., E. A. **Manual de controle Higiênico sanitário em Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2001, 347p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA –ANVISA. **Programa nacional de monitoramento da qualidade de produtos dispensados de registro**. Brasília, 2002

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. **Programa nacional de monitoramento da qualidade de produtos dispensados de registro**. Brasília, 2002.

KNABEL, S. J. Optimized, one-step, recovery-enrichment broth for enhanced detection of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk and hot dogs. **J. AOAC Int.**, v.85, p.501-504, 2002.

NUTRE. **O sorvete**. Disponível em: <http://new.onda.serviços.com.br/canais/indexj>esquisa.htm>> Acesso em: 12 abr. 2002

ORNELAS et al. Perfil microbiológico de amostras de sorvete comercializadas em algumas cidades mineiras. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, n. 327, v. 57 c. Juiz de Fora – Mg., Jul./ago. 2002.

SILK, T. M.; ROTH, T. M. T.; DONNELLY, C.W. Comparison of growth kinetics for healthy and heat-injured *Listeria monocytogenes* in eight enrichments broths. **J. Food Protect.**, v. 65, p.1333-1337, 2002.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Preventing foodborne illness: Listeriosis**. Georgia [Online]. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/publications/brochures/lister.htm>>. Acesso em: 16 Dec. 2003

MIKILITA, I. **Avaliação do estágio de adoção das boas práticas de fabricação pelas indústrias de sorvete da região metropolitana de Curitiba (pr): proposição de um plano de análise de perigos e pontos críticos de controle**. Dissertação de mestrado. UFPR. 2003.

FERREIRA, A. **Novo dicionário aurélio da língua portuguesa**. Positivo:2004. São Paulo.2004

INTERNATIONAL DAIRY FOOD ASSOCIATION - IDFA. History of Ice Cream. Disponível em: <<http://www.idfa.org/facts/slicecream/history.htm>> Acesso em: 02 abr. 2004

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.;HERNÁNDEZ, M.Applied and Environmental Microbiology. Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by Real-Time PCR: Assessment of hly, iap, and lin02483 Targets and AmpliFluor **Technology**.**March** 2004, p. 1366-1377, Vol. 70, nº 3

Kovats RS, Edwards SJ, Hajat S, Armstrong BG, Ebi KL, Menne B, Collaborating group. The effect of temperature on food poisoning: a time series analysis of salmonellosis in 10 European countries. **Epidemiol Infect.**;132:443-453.2004