UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THALYTA MARINA BENETTI

MÉTODOS DE DETECÇÃO E INCIDÊNCIA DE *Listeria* sp e *Salmonella* sp EM LINGÜIÇAS RESFRIADAS COMERCIALIZADAS NO ESTADO DO PARANÁ.

CURITIBA

2009

THALYTA MARINA BENETTI

MÉTODOS DE DETECÇÃO E INCIDÊNCIA DE *Listeria* sp e *Salmonella* sp EM LINGÜIÇAS RESFRIADAS COMERCIALIZADAS NO ESTADO DO 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. ª Dr. ª Márcia Regina Beux e
Prof. ª Dr. ª Wanda Moscalewski Abrahão

CURITIBA

2009

Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SETOR DA SAÚDE
Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia

PARECER

A banca examinadora de defesa de dissertação de Mestrado constituída pelas Professoras: Drª. Cristina Leise Bastos Monteiro – Departamento de Patologia Básica/UFPR (Presidente); Drª Juliana Ferreira de Moura - Departamento de Patologia Básica/UFPR, Drª Wanda Moscalewski Abrahão – Departamento de Farmácia/UFPR e Drª Renata Emlund Freitas de Macedo - PUCPR, após argüir a mestranda THALYTA MARINA BENETTI em relação ao seu trabalho de dissertação intitulado **"Métodos de detecção e incidência de *Listeria* sp e *Salmonella* sp em lingüiças resfriadas comercializadas no Estado do Paraná"**, é de parecer favorável à APROVAÇÃO do mesmo. Para a devida publicação, o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Em Curitiba, 8 de abril de 2009.

Profª. Drª. Cristina Leise Bastos Monteiro (presidente)

Profª. Drª. Juliana Ferreira de Moura

Profª. Drª. Wanda Moscalewski Abrahão

Profª. Drª. Renata Emlund Freitas de Macedo

Algo só é impossível até que alguém
duvide e acabe provando o contrário.

Albert Einstein

Dedico este trabalho ao meu avô Enestor que com seu infinito amor sempre me acolheu e com suas sabias palavras me impulsionou para grandes desafios, nenhum gesto seria grande o suficiente para agradecê-lo pelo grande exemplo que representou em minha vida. Estaremos sempre juntos ontem, hoje e amanhã.

Aos meus pais Rosangela e Douglas pela vida e por fornecerem toda a base do meu sucesso, a educação.

AGRADECIMENTOS

À 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.

Agradeço aos meus pais Rosangela e Douglas por estarem sempre ao meu lado, por toda a dedicação, por todo suporte de vida que sempre me deram o meu caminho que com certeza, é muito menos penoso e os fardos menos pesados graças a vocês.

À minha “mãe do coração”, Wanda, por seu amor, carinho, incentivo, apoio irrestrito e co-orientação, por despertar em mim o espírito cientifico, por ter me dado a oportunidade de conhecer a Microbiologia de Alimentos, a qual se tornou novo horizonte em minha vida e, sobretudo, por sempre acreditar em minha capacidade.

À querida Cristina Leise Bastos Monteiro, por seu carinho irrestrito que participou com a orientação, compreensão e amizade na elaboração e execução do projeto e em muitos momentos da execução dos trabalhos.

À co-orientadora e querida amiga Márcia Regina Beux pela correção e sugestões para a realização deste trabalho.

Às minhas irmãs Stephany e Nathany por estarem sempre ao meu lado, me confortando com palavras maravilhosas, e por muitas vezes dizerem até o que eu não queria ouvir.

À minha família por me impulsionar a cada dia mais, e por me mostrar que eu sou capaz.

À minha querida amiga Ana Rittler Danszkai pelo auxilio e cooperação no desempenho deste estudo, e por me privilegiar mesmo em finais de semana e feriados com seu sorriso.

Ao meu querido Cristiano Zimmermann pela força e carinho nos momentos mais difíceis.

Ao professor Aguinaldo José do Nascimento, pelos conhecimentos em estatística e pela paciência e dedicação em me mostrar o melhor caminho.

Aos servidores públicos da Secretaria de Estado da Saúde do Laboratório Central do Estado - LACEN, das secções de Microbiologia de Alimentos, Toxicologia de Alimentos, Meios de Cultura, Reativos e Esterilização, pela calorosa colhida e pelo apoio oferecido, sem os quais seria impossível a realização deste estudo.

Aos meus queridos amigos e colegas do Grupo Parati, por todo o incentivo e carinho dispensado.

À todas as pessoas, que mesmo não mencionadas, acrescentaram seus conhecimentos para a realização desta conquista, que me ajudaram a construir a escada que me trouxe ate aqui.

RESUMO

Neste estudo foi realizada uma análise comparativa entre métodos de detecção para *Listeria* sp e *Salmonella* sp em 51 amostras de lingüiças resfriadas comercializadas no Estado do Paraná. Avaliou-se a ocorrência de *Listeria* sp e *Salmonella* sp comparando os resultados obtidos das análises realizadas por metodologia convencional (método ISO 11290-1 e, metodologia básica descrita no Bacteriological Analytical Manual (BAM)) com sistema de análise qualitativa imunoenzimática automatizada (mini-VIDAS Listeria, e mini-VIDAS Salmonella). A ocorrência de *Listeria* sp em lingüiça resfriada comercializadas no Estado do Paraná foi de 52,9%, sendo 13,7% *L. monocytogenes,* 19,7% *L. grayi*, 13,7% *L. innocua*, e 5,9% *L. welshimeri*. Um total de 3,9% das amostras de lingüiça resfriada apresentaram-se contaminadas com *Salmonella* sp Em avaliação comparativa entre metodologia BAM e mini-VIDAS Salmonella, observou-se que através da metodologia BAM ouve uma maior correlação com a identificação de *Salmonella* sp (9,8%), no entanto, a metodologia mini-VIDAS, demonstrou maior expressividade na identificação de *Proteus mirabilis* e *Salmonella* sp ambas com 9,8%. Em avaliação comparativa entre ISO e mini-VIDAS Listeria, observou-se que *Listeria grayi* predominou em ambos os métodos de análise com valores de 19,6% e 13,7%, respectivamente, e de que a *Listeria monocytogenes* demonstrou resultados expressivos, sendo constatada 13,7% em ambas as metodologias. O método mini-VIDAS comparado com o método BAM para identificação de *Salmonella* sp produziu uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 88,89%. O método mini-VIDAS comparado com o método ISO para identificação de *Listeria* sp produziu uma sensibilidade de 96,7% e uma especificidade de 94,70%. Os ágares cromogênicos (CM1080 e CM1084), foram avaliados entre si, verificando-se, concordância positiva de 62,7% e concordância negativa em 35,3%, condizendo à percentagem global de concordância de 98,0%. Os ágares clássicos (PALCAM e Oxford) também foram avaliados, apresentando concordância positiva de 66,5%, e concordância negativa de 23,5%. O teste de *kappa* apresentou concordância de 96% e 76% respectivamente. Comparando o tempo de resposta dos métodos para identificação de *Salmonella* sp, observou-se que não existe diferença em resultados de ausência do microrganismo entre os métodos mini-VIDAS Salmonella e BAM. No entanto, quando avaliou-se o tempo para pesquisa com resultado positivo observou-se que o método clássico BAM produz o resultado em menor tempo quando comparado ao método mini-VIDAS. Comparando o tempo para identificação de *Listeria* sp observou-se que o método mini-VIDAS desenvolve resposta em menor tempo quando comparado ao método ISO, tanto na presença quanto ausência do microrganismo. A análise efetuada neste trabalho evidencia a ocorrência de falhas no processo de fabricação de lingüiça resfriada por parte de alguns produtores, representando grande risco a saúde do consumidor.

Palavras chaves: lingüiça resfriada, *Salmonella* sp, *Listeria* sp, sistema mini-VIDAS.

ABSTRACT

In this study it was carried out a comparative analysis between detection methods for *Listeria* sp and *Salmonella* sp in 51 samples of cooled sausages commercialized in Paraná State. It was evaluated the occurrence of *Listeria* sp and *Salmonella* sp comparing the results gotten from the analysis made by conventional methodology (method ISO 11290-1 and, described basic methodology in Bacteriological Analytical Manual (BAM)) with system of quantitative automatized imunoenzimática (mini-VIDAS Listeria, and mini-VIDAS Salmonella). The occurrence of *Listeria* sp in sausage cooled commercialized in the State of the Paraná it was of 52,9%, being 13,7% *L. monocytogenes,* 19,7% *L. grayi*, 13,7% *L. innocua*, and 5,9% *L. welshimeri*. A total of 3,9% of the samples of cooled sausage had been presented contaminated with *Salmonella* sp In comparative evaluation between methodology BAM and mini-VIDAS Salmonella, it was observed that through methodology BAM it hears a bigger correlation with the identification of *Salmonella spp.* (85.7%), however, the methodology mini-VIDAS, demonstrated to greater expressividade in the identification of *Proteus mirabilis* and *Salmonella* sp (9,8%) in booth. In comparative evaluation between ISO and mini-VIDAS Listeria, it was observed that *Listeria grayi* it predominated in both the methods of analyzes with values of 19,6% and 13,7%, respectively, and of that *Listeria monocytogenes* it demonstrated significant result, being evidenced in 13,7% booth. The mini-VIDAS method compared with the BAM method for identification of *Salmonella* sp produced a sensitivity of 100% and a specificity of 88.89%. The mini-VIDAS method compared with the ISO method for identification of *Listeria* sp produced a sensitivity of 96.7% and a specificity of 94.70%. The chromogenic agars (CM1080 and CM1084) were evaluated together, there is positive correlation of 62.7% and 35.3% in negative correlation, match the overall percentage of agreement of 98.0%. The classic agars (PALCAM and Oxford) were also evaluated, showing good agreement of 66.5% and negative agreement of 23.5%. The kappa test showed concordance of 96% and 76% respectively. Comparing the time of reply of the methods for identification of *Salmonella* sp, it was observed that difference in results of absence of the microrganismo between the methods does not exist mini-VIDAS Salmonella and BAM. However, when it was evaluated the time for research with positive result was observed that classic method BAM it produces the result in lesser time when compared with the method mini-VIDAS. Comparing the time for identification of *Listeria* sp it was observed that the method mini-VIDAS it develops reply in lesser time when compared with the method ISO, as much in the presence how much absence of the microrganismo. It analyzes it effected in this work evidences the occurrence of imperfections in the process of manufacture of sausage cooled on the part of some producers, representing great risk the health of the consumer.

Key word: cooled sausages, *Salmonella* sp, *Listeria* sp, mini-VIDAS system.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 *Listeria* sp OBSERVADA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....33

FIGURA 02 ISOLAMENTO DE *Listeria* sp PELO MEIO PALCAM.....42

FIGURA 03 ISOLAMENTO DE *Listeria* sp PELO MEIO CM 1084.....43

FIGURA 04 MORFOLOGIA DA *Salmonella* sp EM COLORAÇÃO DE GRAM.....47

FIGURA 05 MÉTODO CONVENCIONAL BAM PARA ISOLAMENTO DE *Salmonella* sp PLAQUEAMENTO SELETIVO E DIFERENCIAL. ESQUERDA ÁGAR ENTÉRICO DE HEKTOEN (HE). DIREITA ÁGAR *Salmonella -Shiguella* (SS).....54

FIGURA 06 DISTRIBUIÇÃO EM PORCENTAGEM DOS LOCAIS PRODUTORES DAS AMOSTRAS ANALISADAS.....67

FIGURA 07 FLUXOGRAMA DE ISOLAMENTO DE IDENTIFICAÇÃO DE *Listeria* sp PELO MÉTODO CONVENCIONAL ISO 11290-1..72

FIGURA 08 FLUXOGRAMA DE IDENTIFICAÇÃO DE *Listeria* sp PELO MÉTODO MINI-VIDAS.....74

FIGURA 09 SISTEMA API LISTERIA – IDENTIFICAÇÃO: *Listeria monocytogenes.....76*

FIGURA 10 FLUXOGRAMA DE IDENTIFICAÇÃO DE *Salmonella sp* PELO MÉTODO CONVENCIONAL BAM.....79

FIGURA 11 SISTEMA API 20 E PRONTO PARA USO (DESIDRATADO)82

FIGURA 12 FLUXOGRAMA DE IDENTIFICAÇÃO DE *Salmonella* sp PELO MÉTODO MINI-VIDAS.....83

FIGURA 13 OCORRÊNCIA DE AMOSTRAS VERDADEIRAMENTE POSITIVAS PARA *Listeria* sp EM LINGÜIÇA RESFRIADA....87

FIGURA 14 OCORRÊNCIA DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA *Salmonella* sp EM LINGÜIÇA RESFRIADA.....88

FIGURA 15 ANÁLISE DO MÉTODO MINI-VIDAS *Salmonella* AVALIANDO POSSÍVEIS VARIAÇÕES.....99

FIGURA 16 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DO MÉTODO MINI-VIDAS *Salmonella* PARA IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES AVALIANDO POSSÍVEIS VARIAÇÕES.....99
FIGURA 17 ANÁLISE DO MÉTODO MINI-VIDAS LISTERIA AVALIANDO POSSÍVEIS VARIAÇÕES.....100
FIGURA 18 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DO MÉTODO MINI-VIDAS LISTERIA AVALIANDO POSSÍVEIS VARIAÇÕES.....101

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01 FORMAS DE OCORRÊNCIA DE LISTEROSE..... 36
QUADRO 02 LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO DE *L. monocytogenes* 38
QUADRO 03 LEVANTAMENTO EPDEMIOLÓGICO DE *Salmonella* sp 51

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 RANKING DOS PRINCIPAIS SETORES DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS ALIMENTARES EM VALOR DE 2001 A 2005...25

TABELA 02 OCORRÊNCIA DE *Listeria* sp E *Salmonella* sp ATRAVÉS DO MÉTODO RÁPIDO, E MÉTODO CONVENCIONAL EM LINGÜIÇA RESFRIADA.....91

TABELA 03 AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS DADOS OBTIDOS NA DETECÇÃO DE *Salmonella* sp ATRAVÉS DO MÉTODO BAM E MÉTODO MINI-VIDAS.....91

TABELA 04 AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS DADOS OBTIDOS NA DETECÇÃO DE *Listeria* sp ATRAVÉS DO MÉTODO ISO E MÉTODO MINI-VIDAS.....91

TABELA 05 PERCENTUAL DE ESPÉCIES DE *Listeria* sp DETECTADAS ATRAVÉS DA METODOLOGIA MINI-VIDAS E METODOLOGIA ISO.....92

TABELA 06 PERCENTUAL DA FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEAE DETECTADO ATRAVÉS DA METODOLOGIA MINI-VIDAS E METODOLOGIA BAM.....93

TABELA 07 RESULTADOS POSITIVOS E NEGATIVOS NA COMPARAÇÃO ENTRE O MÉTODO MINI-VIDAS E MÉTODO CONVENCIONAL BAM (PADRÃO) PARA PESQUISA DE *Salmonella* sp EM LINGÜIÇA RESFRIADA.....95

TABELA 08 TESTE DE EXATIDÃO ENTRE O MÉTODO MINI-VIDAS E MÉTODO CONVENCIONAL BAM (PADRÃO) PARA PESQUISA DE *Salmonella* sp EM LINGÜIÇA RESFRIADA..95

TABELA 09 RESULTADOS POSITIVOS E NEGATIVOS NA COMPARAÇÃO ENTRE O MÉTODO MINI-VIDAS E MÉTODO CONVENCIONAL ISO (PADRÃO) PARA PESQUISA DE *Listeria* sp EM LINGÜIÇA RESFRIADA.....97

TABELA 10 TESTE DE EXATIDÃO ENTRE O MÉTODO MINI-VIDAS E MÉTODO CONVENCIONAL ISO (PADRÃO) PARA PESQUISA DE *Listeria* sp EM LINGÜIÇA RESFRIADA.....97

TABELA 11 RESULTADOS POSITIVOS E NEGATIVOS NA COMPARAÇÃO DO MÉTODO ISO EM RELAÇÃO AOS ÁGARES CROMOGÊNICOS PARA PESQUISA DE *Listeria* sp EM LINGÜIÇA RESFRIADA.....102
TABELA 12 TESTE DE CONCORDÂNCIA ENTRE RESULTADOS POSITIVOS E NEGATIVOS NA COMPARAÇÃO DO MÉTODO ISO EM RELAÇÃO AOS ÁGARES CROMOGÊNICOS PARA PESQUISA DE *Listeria* sp EM LINGÜIÇA RESFRIADA.....102
TABELA 13 RESULTADOS POSITIVOS E NEGATIVOS NA COMPARAÇÃO DO MÉTODO ISO EM RELAÇÃO AOS ÁGARES CLASSICOS PARA PESQUISA DE *Listeria* sp EM LINGÜIÇA RESFRIADA.....103
TABELA 14 TESTE DE CONCORDÂNCIA ENTRE RESULTADOS POSITIVOS E NEGATIVOS NA COMPARAÇÃO DO MÉTODO ISO EM RELAÇÃO AOS ÁGARES CLASSICOS PARA PESQUISA DE *Listeria* sp EM LINGÜIÇA RESFRIADA.....103
TABELA 15 DESCRIÇÃO DO TEMPO DE ANÁLISE PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Salmonella* sp.....105
TABELA 16 DESCRIÇÃO DO TEMPO DE ANÁLISE PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Listeria* sp.....106

LISTA DE ABREVIATURA

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ADPT	Água Peptonada Tamponada
AFNOR	Association Française de Normalisation
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
APHA	American Public Health Association
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ATCC	American Type Culture Collection
BAM	Bacteriological Analytical Manual
BGA	Brilliant Green Agar
BSA	Àgar Sulfito Bismuto
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CDC	Center Disease Control and Prevention
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
E	Especificidade
EIA	Ensaio Imunoenzimático
ELFA	Enzyme Linked Fluorescent Assay
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
EMB	Eosina azul de metileno
FDA	Food and Drug Administratios
FN	Falso-negativo
FP	Falso-positivo
HE	Hektoen
ISO	International Organization of Standardization
LIA	Ágar lisina ferro
LIS	*Listeria*
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento
MSRV	Ágar semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado

RIISPOA	Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal
RV	Rappaport-Vassiliadis
S	Sensibilidade
SC	Selenito-Cistina
SIM	Sulfito indol motilidade
SLM	*Salmonella*
SR	Semi-sólido Rappaport
SS	*Salmonella –Shiguella*
TSA-YE	Ágar tripticase de soja suplementado com extrato de levedura
TSI	Tríplice Açúcar Ferro
UFC	Unidades formadoras de colônias
USDA – FSIS	Departamento da agricultura dos Estados Unidos – Alimentos pronto para consumo e serviço de inspeção

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 19
2. OBJETIVOS 22
2.1 OBJETIVO GERAL 23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 23
3. REVISÃO DE LITERATURA 24
3.1 SEGURANÇA ALIMENTAR 25
3.2 EMBUTIDOS 28
3.3 BACTÉRIAS ANALISADAS 31
3.3.1 *Listeria* sp. 31
3.3.1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA *Listeria* sp 31
3.3.1.2 LISTERIOSE 34
3.3.1.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS 37
3.3.1.4 PRESENÇA DE *Listeria* sp EM EMBUTIDOS 39
3.3.1.5 MÉTODOS PARA ISOLAMENTO DE *Listeria* sp. 40
3.3.1.6.MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *Listeria* sp 44
3.3.2 *Salmonella* sp 47
3.3.2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA *Salmonella* sp 47
3.3.2.2 SALMONELOSE 48
3.3.2.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS 50
3.3.2.4 PRESENÇA DE *Salmonella* sp EM EMBUTIDOS 52
3.3.2.5 DETECÇÃO DE *Salmonella* sp 54
3.4 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS 60
3.4.1 METODOLOGIA CONVENCIONAL 60
3.4.2 METODOLOGIA RÁPIDA / PRÁTICA 61
3.4.3 SISTEMA API 64
3.4.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS 64
4. MATERIAIS E MÉTODOS 66
4.1 MATERIAIS 67
4.1.1 MEIOS DE CULTURA, SOLUÇÕES, REAGENTES, INSUMOS E DIVERSOS 68
4.2 MÉTODOS 69
4.2.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE 70

4.2.2 PESQUISA *Listeria* sp. 70
4.2.2.1 MÉTODO DE CULTURA CONVENCIONAL COMO RECOMENDADO PELA ISO 11290-1 70
4.2.2.2 MÉTODO MINI-VIDAS..... 73
4.2.2.3 CONFIRMATÓRIO DE *Listeria* sp ATRAVÉS DO API LISTERIA 75
4.2.3 PESQUISA DE *Salmonella* spp. 76
4.2.3.1 MÉTODO CONVENCIONAL BAM..... 76
4.2.3.2 MÉTODO RÁPIDO MINI-VIDAS..... 80
4.2.3.3 CONFIRMATÓRIO DE *Salmonella* sp ATRAVÉS DO API 20E..... 80
4.2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS 84
4.2.5 MÉTODO EMPREGADO PARA AVALIAÇÃO DOS MEIOS SELETIVOS DE *Listeria* sp PELO MÉTODO ISO 11.290-1.....85
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 86
5.1 OCORRÊNCIA DE *Listeria* sp e *Salmonella* sp EM LINGÜIÇA RESFRIADA 87
5.2 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS MÉTODOS ANALISADOS... 95
5.3 AVALIAÇÃO DOS MEIOS EMPREGADOS PELO MÉTODO ISO 11290-1 PARA ISOLAMENTO DE *Listeria* sp. 101
5.4 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE ANÁLISE DOS MÉTODOS..... 104
6. CONCLUSÃO..... 108
7. REFERÊNCIAS 111
8. ANEXOS..... 128

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A análise microbiológica de um alimento visa investigar quantitativamente e qualitativamente a presença ou ausência de um determinado microrganismo em um produto, assim como identificar e caracterizar as diferentes espécies a fim de rastrear as condições de higiene em que o alimento foi processado, os prováveis riscos a saúde do consumidor, e se o alimento terá ou não vida de prateleira pretendida. Além disso, a análise laboratorial permite determinar o agente etiológico mais provável no caso de toxinfecção alimentar. Essa análise é imprescindível também para verificar se os padrões e as especificações microbiológicas, nacionais, ou internacionais, estão sendo atendidas adequadamente.

A escolha da metodologia a ser adotada na análise microbiológica de alimentos deve ser norteada pela precisão pretendida, custo, tempo de análise, aceitabilidade do método por órgãos oficiais e comunidade cientifica; operacionalidade, treinamento e qualificação do analista, disponibilidade e qualidade de reagentes, meios de cultura e outros suprimentos, disponibilidade de espaço no laboratório, entre outros.

Apesar da utilização de diferentes técnicas para garantir a qualidade e a inocuidade de alimentos, as doenças transmitidas por alimentos (DTA) continuam sendo um problema de saúde pública.

Diversos microrganismos podem causar DTA, e dentre eles *Listeria* sp e *Salmonella* sp destacam-se devido à capacidade de sobreviver em alimentos mantidos sob temperaturas de refrigeração, sendo capazes de sobreviver por muito tempo nos alimentos e outros substratos. Sendo que estes microrganismos possuem elevada resistência fisiológica, sendo difícil controlar ou prevenir sua presença em alimentos, principalmente naqueles que sua confecção não sofre tratamento térmico, como é o caso das lingüiças.

A carne e seus derivados incluem-se entre os alimentos que mais preocupam os serviços de saúde publica, em razão dos riscos que oferecem pela contaminação com uma grande variedade de bactérias patogênicas. As

lingüiças apresentam-se como excelentes substratos para o desenvolvimento de microrganismos, devido a uma série de fatores favoráveis como a alta atividade de água, mistura de diferentes tipos de ingredientes, etc. Além disso, lingüiças são submetidas a intenso manuseio durante seu processo, o que aumenta a probabilidade de contaminação com microrganismos indesejáveis.

Um dos aspectos relevantes das DTAs é a ocorrência de surtos de toxinfecção alimentar, onde os números relatados demonstram-se inferiores ao esperado, em virtude da disseminação do patógeno no ambiente. Vários fatores provavelmente interferem nesta relação: subnotificação; o período de incubação de até 30 dias para alguns patogênicos dificulta a associação do quadro clínico com alimentos; a dificuldade de encontrar o alimento incriminado após a confirmação do caso, uma vez que o alimento contaminado já foi consumido ou desprezado; a utilização de antibióticos no tratamento antes da coleta para análise microbiológica da infecção dificulta o isolamento do microrganismo nos pacientes.

Desta forma, produtores de alimentos, bem como órgãos de fiscalização têm estado alerta para garantir a ausência de microrganismos patogênicos nos alimentos. Entretanto esta metodologia pode ser limitada, uma vez que as técnicas de laboratório rotineiramente empregadas para isolamento de patogênicos são trabalhosas e demoradas no fornecimento de resultados.

Considera-se que o desenvolvimento de uma proposta metodológica, a qual diminua o tempo do fornecimento dos resultados, seja uma importante contribuição para o atendimento às exigências dos órgãos fiscalizadores, produtores e consumidores.

Portanto, espera-se que os dados expressos no presente estudo possibilitem uma forte correlação entre as metodologias, assim como, as informações obtidas exprimam resultados confiáveis dentro de um curto espaço de tempo, viabilizando desta forma a precisão nos resultados emitidos, associados à satisfação dos profissionais que utilizam as metodologias, e acima de tudo, objetiva-se assegurar a qualidade dos alimentos consumidos.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Comparar métodos de detecção e avaliar a incidência de *Listeria* sp e *Salmonella* sp em lingüiças resfriadas comercializadas no Estado do Paraná.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a incidência de lingüiças resfriadas contaminadas com *Listeria monocytogenes* e espécies do gênero Salmonella.
- Comparar os resultados obtidos nas análises realizadas pelo método mini-VIDAS Salmonella com o método BAM em amostras de lingüiça resfriadas.
- Comparar os resultados obtidos nas análises realizadas com o método mini-VIDAS Listeria com o método ISO 11290-1 em amostras de lingüiça resfriadas.
- Comparar os resultados obtidos com os meios seletivos utilizados no plaqueamento do método ISO 11290-1 para o isolamento de *Listeria* sp.
- Comparar o tempo dispensado para análise nas pesquisas de *Listeria* sp (método ISO 11290-1 e método mini-VIDAS Listeria) e *Salmonella* sp (método BAM e método mini-VIDAS Salmonella).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 SEGURANÇA ALIMENTAR

O mercado mundial de carnes apresenta produção crescente segundo dados apresentados pela ABIPECS (2005). A produção mundial deste gênero foi de 257 milhões de toneladas. O Brasil destaca-se na produção de produtos cárneos, tendo produção anual de 41 milhões de bovinos abatidos, quatro bilhões de frangos e 34,5 milhões de suínos, em 2004, representando uma produção anual de 24,4 bilhões de dólares, sendo exportados 4,5 bilhões (ABIPECS, 2008).

O setor de derivados cárneos manteve-se entre 2001 e 2005 em primeiro lugar no “ranking” dos principais setores da indústria de produtos alimentares no Brasil como descrito na Tabela 01 (ABIA, 2007).

TABELA 01 RANKING DOS PRINCIPAIS SETORES DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS ALIMENTARES EM VALOR DE 2001 A 2005.

Indústria da Alimentação - Principais Setores em Valor					
	2001	2002	2003	2004	2005
Laticínios	2°	4°	4°	4°	4°
Beneficiamento de Café, Chá e Cereais	3°	3°	2°	3°	2°
Derivados de Carne	1°	1°	1°	1°	1°
Óleos e Gorduras	4°	2°	3°	2°	3°
Derivados do Trigo	5°	5°	5°	6°	6°
Açúcares	6°	6°	6°	5°	5°
Derivados de Frutas e Vegetais	8°	8°	7°	7°	7°
Diversos	7°	7°	8°	8°	8°
Chocolate, Cacau e Balas	9°	9°	9°	9°	9°
Conservas de Pescados	10°	10°	10°	10°	10°

FONTE: Adaptado de ABIA, 2007

A crescente exigência do mercado consumidor por alimentos cada vez mais seguros e os requisitos de segurança alimentar estabelecidos pelos órgãos regulamentadores tem levado as indústrias alimentícias a adotarem programas de

gestão da qualidade severos. Os primeiros passos são os de implantação de sistemas de segurança alimentar, como as BPF (boas práticas de fabricação), implantação do APPCC (análise de perigos e pontos críticos de controle), entre outros programas de qualidade.

Ferramentas são necessárias para auxiliar técnicos das indústrias a identificar perigos, estabelecer limites críticos, formas de monitoramento e medidas corretivas. A melhoria de condições dos serviços públicos de saúde e direitos do consumidor está evidenciando um aumento no número de casos de doenças transmitidas por alimentos, o que exige dos fabricantes de produtos alimentícios novas ações relacionadas à segurança alimentar. Analisar amostras alimentícias e ambientais quanto à presença de bactéria patogênica, ou deteriorante, fungos e toxinas é uma prática que assegura a qualidade do produto.

Entre os vários parâmetros que determinam a qualidade, os mais importantes, são sem dúvida, aqueles que definem suas características microbiológicas. A avaliação da qualidade microbiológica de um produto fornece informações que permitem julgá-lo quanto às condições de processamento, de armazenamento, de distribuição, sua vida útil, e quanto ao risco de saúde da população (FRANCO E LANDGRAF, 2004).

Apesar das infecções alimentares terem sido a principal causa de enfermidades para o homem durante muitos anos, desconhece-se sua incidência real. Há estudos que periodicamente resumem as tendências das enfermidades de origem alimentar. As originadas por patógenos, constituem um problema mundial de saúde pública que pode ser influenciada pela demografia, industrialização, e distribuição, transporte, comercialização, bem como a elucidação e a capacidade de adaptação dos microrganismos. As enfermidades de origem alimentar vão desde gastrenterites leves, a enfermidades letais, constituindo perigo à saúde do consumidor, podendo deixar seqüelas a longo prazo (ICMSF, 2002).

As enfermidades de origem alimentar ocorrem quando uma pessoa contrai uma doença devido à ingestão de um produto contaminado com microrganismos e/ ou toxinas indesejáveis. Essa condição é, freqüentemente, denominada como toxinfecção alimentar. É sabido que apenas um pequeno número de casos de enfermidades causadas por alimentos são notificados aos órgãos de inspeção de alimentos, de controle e às agências de saúde. Isso se deve em parte ao fato de que

muitos patógenos presentes em alimentos causam sintomas brandos, e a vítima não busca auxílio médico (FORSYTHE, 2002).

Condições sanitárias deficientes durante o abate dos animais, cozimento inadequado, armazenamento impróprio, e falta de higiene durante o preparo dos produtos cárneos são condições que podem predispor os indivíduos a tornarem-se portadores assintomáticos ou doentes. Dependendo do microrganismo envolvido, os sintomas podem variar de desconforto intestinal moderado a desidratação severa, ou diarréia hemorrágica e morte (PELCZAR, 1997).

A ausência de microrganismos patógenos para o homem, nos alimentos, e de suas toxinas constitui uma exigência primária: se pressupõe que estes não transmitirão enfermidades aos consumidores. Além disso, o produto de boa qualidade microbiológica deve apresentar níveis reduzidos de microrganismos deteriorantes (BENITEZ, 2000).

A contaminação biológica é um problema de saúde pública no Brasil, assim como afeta o mundo todo. No País existe normatização adequada para controle sanitário dos alimentos, como o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Porém, ainda falta a fiscalização efetiva e permanente da produção, conservação e comercialização de alimentos pelos serviços estaduais e municipais de vigilância sanitária, aos quais é delegado o poder de inspecionar e punir os infratores (BALBANI E BUTUGAN, 2001).

A qualidade da matéria-prima, a padronização do processamento e a manutenção das temperaturas na saída da indústria até as gôndolas do supermercado têm sido citadas como parâmetros importantes para se evitar as cada vez mais freqüentes toxinfecções alimentares. A busca incessante da qualidade, seja na produção, transporte, armazenamento e consumo de alimentos é fator primordial na competição entre empresas deste mercado (RICHARDS, 2003).

3.2 EMBUTIDOS

Embutidos ou carnes preparadas embutidas são produtos elaborados com carnes ou outros tecidos animais comestíveis, curados ou não, condimentados, cozidos ou não, defumados e dessecados ou não, tendo como envoltório natural tripas, bexigas ou outras membranas animais ou envoltório plástico apropriado (SÃO PAULO, 1978).

De acordo com Martins e Terra, (1985), o embutido será designado pelo seu nome, seguido da classe a que corresponde, ou o tipo, ou espécie animal de que designa, podendo ser seguido ainda de complementações elucidativas quanto às características peculiares. Pode-se exemplificar como “lingüiça defumada”, “salsicha tipo Viena”, “Pasta de fígado”.

De acordo com o seu processo de fabricação, os embutidos são classificados em frescos, cozidos, defumados e secos. Segundo a sua composição são divididos em simples e mistos e de acordo com suas características em chouriço, lingüiça, morcela, mortadela, paio, queijo de porco ou ralado, salame, salsicha e patê ou pasta (SÃO PAULO, 1978).

Os embutidos crus são curados a frio e/ou a quente, dividindo-se em frescos e maturados, pois a cura pode ser dividida em duas fases: a cura propriamente dita (seca ou úmida) e a maturação e secagem. Podem ainda se apresentar defumados ou não. Os embutidos maturados dividem-se em secos e semi-secos, apresentando-se em ampla variedade devido às muitas matérias-primas envolvidas no seu processamento, o que acaba por dificultar a exata classificação destes produtos (HAACK *et al*, 1991).

A indústria emprega grande variedade de carnes como matéria-prima, desde os segmentos musculares até vísceras, gorduras, sangue, pele e ligamentos. Dependendo do produto, é precedida a escolha do tipo de tecido, da qualidade, do estado e da espécie ou espécies de animais a serem empregados (HAACK *et al*, 1991).

Os embutidos deverão ser preparados de carne e outros tecidos animais em perfeito estado de conservação. De acordo com o tipo de embutido e suas peculiaridades, podem entrar na sua composição tendões, cartilagens, ou aponeuroses, porém a proporção não poderá ser preponderante ao exame microscópico (SÃO PAULO, 1978).

Os embutidos compreendem basicamente duas classes, aqueles preparados a partir de misturas de carnes moídas ou menor grau como as lingüiças frescas, lingüiças defumadas, e salames: e os embutidos preparados a partir de emulsões, como as mortadelas, salsichas e similares, também chamados de embutidos cozidos (MARTINS E TERRA *et al*, 1985).

Os principais componentes da emulsão ou massa são a carne, água, gordura, sal, aditivos e condimentos, proteínas suplementares e os amidos. A massa dos embutidos é uma emulsão de gordura em água, portanto do tipo óleo-água, onde as gotículas de gordura são distribuídas de maneira relativamente uniforme e são mantidas em suspensão pelas proteínas solúveis da carne (MARTINS E TERRA *et al*, 1985).

De acordo com Haack *et al.* (1991), as características das matérias-primas, carnes e gorduras, são de importância decisiva para a elaboração de embutidos crus em condições adequadas. A carne deve proceder de animais sadios. Além disso, a carne dos animais submetidos a extremas condições fisiológicas, isto é, as chamadas influências de estresse, exibe uma maturação defeituosa, que se traduz em uma acidificação deficiente ou num elevado valor de pH.

Da mesma forma animais abatidos em condições precárias e sem higiene, carcaças mal resfriadas, carnes desossadas sem os cuidados devidos não podem ser considerada como matéria-prima de boa qualidade e certamente, mais cedo ou mais tarde, vão ocasionar problemas (HAACK *et al*, 1991).

Banwart (1989), Jay (1992) e Strapazzon (1997) citam a deterioração microbiológica como a mais grave de todas. É causada por microrganismos que decompõem rapidamente as proteínas e produzem resíduos desta deterioração, como as toxinas que podem causar efeitos indesejáveis ao consumidor. A contaminação da carne pode ocorrer por fonte endógena ou exógena.

Esses autores comentam que a contaminação endógena é causada por microrganismos que já estão presentes no tecido do próprio animal. O grau desta contaminação pode ser diminuído pela utilização de técnicas e práticas adequadas de sangria, refrigeração das carcaças, pela boa origem dos animais, e um bom preparo destes animais antes do abate. Já a contaminação

exógena é causada por microrganismos existentes no ambiente ou nos manipuladores de carne. Para reduzir os níveis de contaminação, é preciso haver uma boa limpeza das instalações, máquinas, mesas, e ferramentas, assim como uma rigorosa disciplina quanto à higiene dos manipuladores, e utilização de sanitarizantes adequados. A contaminação mais importante da carne é, sem duvida, de origem externa, uma vez que admite-se que a massa interna da carne não contém microrganismos, ou estes são muito escassos. Por outro lado, podem ser encontrados microrganismos nos linfonodos, medula óssea, e no próprio músculo. Comentam também que a *Salmonella* sp e *Listeria* sp são as principais bactérias patogênicas encontradas nas carnes e seus derivados.

3.3 BACTÉRIAS ANALISADAS

3.3.1 *Listeria* sp

Segundo Corrêa e Corrêa (1992), em 1919, Gustav Hulpers, na Suécia, isolou um germe a partir do fígado de coelho e o denominou de *Bacillus hepatis*. A descrição do germe e o tipo de enfermidade observada no coelho indicam claramente que ele foi o primeiro a isolar *Listeria monocytogenes*, porém a amostra bacteriana não foi conservada, impedindo de compará-la com as cepas hoje conhecidas. No entanto, dez anos mais tarde, Munay, Webb e Swann, durante uma epizootia entre coelhos e cobaias de um biotério em Cambridge, isolaram microrganismos que causavam intensa monocitose, nomeando o agente como *Bacterium monocytogenes*.

Um ano mais tarde, na África do Sul, observou-se uma doença similar em roedor selvagem e, em honra a Lord Lister, denominou-se o agente como *Listerella hepatolytica*, porém, considerando ser parecido com o agente isolado pelos outros autores ingleses, propôs a denominação de *Listerella monocytogenes*. Posteriormente, como havia um gênero vegetal assim denominado, o agente passou a chamar-se *Listeria monocytogenes*.

Os primeiros isolamentos confirmados do microrganismo provenientes de indivíduos infectados, foram efetuados em 1929 por Nyfeldt, na Dinamarca, que isolou a bactéria do sangue de doentes com monocitose. Em 1931, Gill isolou a bactéria pela primeira vez de ovelhas na Nova Zelândia. Posteriormente, casos esporádicos de listeriose humana foram reportados, os quais estavam associados a indivíduos que tiveram contato com animais doentes. Na década de 80, com os relatos de diversos surtos decorrentes da ingestão de alimentos contaminados, o interesse pelo microrganismo cresceu rapidamente entre as indústrias, agências governamentais reguladoras e pesquisadores (FABER E PETERKIN, 1991).

3.3.1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA *Listeria* sp

O meio científico foi despertado para o perigo da listeriose durante a década de 80, quando uma séries de surtos ocorreram na América do Norte e Europa; e a *Listeria monocytogenes* foi responsável por várias formas de listeriose humana. A

partir de 1988, principalmente nos países da Europa Central, pesquisadores passaram a investigar a listeriose como doença de origem alimentar (FABER E PETERKIN,1991; OLIVEIRA, 1993).

Rocourt em 1996 classificou o gênero *Listeria* em seis espécies: *L. monocytogenes, L. ivanovii, L. innocua, L. seeligeri, L. welshimeri* e *L. grayi.* A espécie *L. denitrificans* foi reclassificada como *Jonesia denitrificans* e as espécies *L. grayi* e *L. murrayi* foram agrupadas em uma única espécie, *L. gray*i. As subespécies da *L. ivanovii* foram extintas (BARBALHO, 2002).

Das espécies de *Listeria*, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri* estão associadas com enfermidades no homem (VARNAM E EVANS, 1991). A *L. monocytogenes* desperta um maior interesse para saúde pública (VIDON *et al*., 2001), por estar envolvida em surtos de listeriose de origem alimentar em humanos. A *L. ivanovii* tem sido descrita raramente em patologias no homem, embora seja responsável por abortos em bovinos e caprinos (PEREIRA E ROCOURT, 1993). A *L. seeligeri* foi relatada apenas uma única vez como causa de meningite num adulto imunodeprimido. Contudo, usualmente, a presença de qualquer espécie do gênero *Listeria* em alimentos é um indicador de condições precárias de higiene (PEREIRA E ROCOURT, 1993; COCOLIN *et al*., 2002).

Listeria sp encontra-se amplamente distribuída na natureza, fato que explica a facilidade com que é encontrada em alimentos, desde a produção até o consumo (BEUCHAT, 1996).

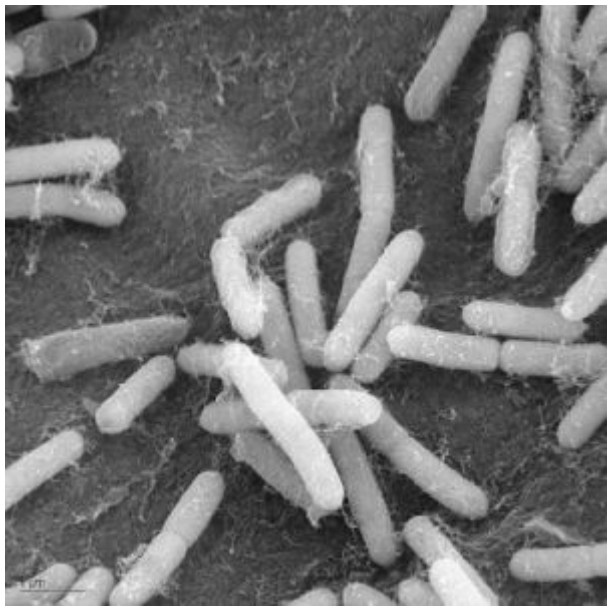
A pesquisa de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo é de grande importância, pois se sabe que os alimentos envolvidos em surtos e casos esporádicos de listeriose são aqueles processados industrialmente, mantidos sob refrigeração, com vida de prateleira longa, e que oferecem condições adequadas para a sua multiplicação.

Listeria monocytogenes é uma bactéria ubíqua, com capacidade de se desenvolver em condições inóspitas para outros microrganismos patogênicos, que pode iniciar multiplicação em temperaturas que variam de 0 a 45ºC (SWAMINATHAN, 2001).

Segundo o Manual de Bergey (HENSYL, 1994), *Listeria* é um bacilo pequeno, quando célula jovem, as células observadas ao microscópio apresentam-se como pequenos bacilos difteróides, medindo de 1,0 a 2,0 µm de comprimento por 0,5 µm

de diâmetro. Após três a cinco dias de incubação, no entanto, as células apresentam-se como bacilos longos, com tamanho variado de 6 a 20µm. Os organismos do gênero *Listeria* são definidos como bastonetes regulares Gram positivos, que podem aparecer isolados, em cadeias curtas ou formando agregados em forma de V, Y e K (Figura 01) ou ainda dispostos em paliçadas. Não formam esporos, nem cápsulas e são aeróbios ou anaeróbios facultativos. São móveis a 25°C, com movimentos característicos de tombamento, e são imóvel a 35°C. A multiplicação ocorre rapidamente na maioria dos meios bacteriológicos utilizados na rotina laboratorial (HENSYL, 1994; RYSER E DONNELLY, 2001).

FIGURA 01 *Listeria* sp OBSERVADA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA



FONTE: KUNKEL, 2008.

Quanto às características bioquímicas, bactérias do gênero *Listeria* são catalase positivos, oxidase negativos, hidrolisam a esculina e o hipurato de sódio, mas não hidrolisam a uréia, a gelatina e a caseína. Fermentam a glicose com produção de ácido lático sem produção de gás, são indol negativo e H_2S e apresentam reação positiva a provas de Voges Proskauer e vermelho de metila (SEELIGER E JONES, 1986).

As colônias de *Listeria* são pequenas e circulares quando em meios de cultura claros e translúcidos que ao serem examinados sob luz oblíqua transmitida, apresentam-se com coloração azul esverdeada (BAHK E MARTH, 1990).

O pH de multiplicação de *L. monocytogenes* varia entre 4,4 e 9,6, mas se multiplica melhor entre 6 e 8, sendo 7,0 o pH ótimo (ROCOURT, 1999). Por ser ácido tolerante, pode sobreviver em alimentos de baixa acidez por dias ou semanas (RYSER E DONNELLY, 2001). *Listeria* é um dos poucos microrganismos patogênicos que pode se multiplicar em substratos com atividade de água tão baixa quanto 0,93 e em meio de cultura com 10% de NaCl (FARBER *et al*., 1991; ROCOURT, 1999).

A hemolisina é o mais importante fator de virulência da *Listeria* e três espécies, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri*, são hemolíticas (GOUIN *et al*., 1994).

3.3.1.2 LISTERIOSE

Dentre os alimentos já envolvidos nos surtos de listeriose, têm-se leite cru e pasteurizado, queijos, carnes bovina, suína, de aves e seus derivados, frutos do mar, além de produtos de origem vegetal, crus ou processados, e refeições preparadas (FRANCO E LANDGRAF, 1996; RYSER E DONNELLY, 2001).

A listeriose é definida como uma zoonose que pode acarretar um quadro clínico severo com elevada taxa de letalidade. A doença passou a receber atenção significativa a partir dos episódios ocorridos nos Estados Unidos entre 1981 e 1985 (SCHLECH III *et al*., 1983) e a doença é transmitida por duas vias principais: contato com animais infectados, infecção cruzada (contaminação cruzada), preferencialmente entre recém-nascidos em hospitais e através da ingestão de alimentos contaminados (BELL E KYRIADES,1998).

Com relação aos mecanismos de ação da *Listeria monocytogenes*, esta produz algumas toxinas, destacando-se as toxinas hemolíticas (hemolisinas) e as toxinas lipolíticas; responsáveis pelo aumento na produção de monócitos e pela depressão na atividade de linfócitos. Entre as toxinas isoladas incluem uma toxina hemorrágica, uma fração pirogênica e uma toxina capaz de causar alterações eletrocardiográficas (MARTH, 1988).

A hemolisina durante a infecção provoca rompimento das membranas, especialmente aquelas formadas entre os vacúolos fagocitários e os lisossomas, não permitindo, portanto, a formação dos fagolisossomas, que poderiam destruir a bactéria por meio das hidrolases ácidas aí existentes. Isto permite que a *Listeria* sobreviva e se multiplique dentro das células fagocitárias. As enzimas hidrolíticas, após a ruptura das membranas dos lisossomas, são liberadas e provocam a destruição dos macrófagos e monócitos (CORRÊA E CORRÊA, 1992).

Diversas formas de transmissão do microrganismo a humanos já foram relatadas, mas a via alimentar parece ser a mais preocupante. Entretanto, o risco de desenvolver uma infecção por *L. monocytogenes*, após a ingestão de um produto contaminado, é baixo para a população em geral (CDC, 2008).

A listeriose ocorre principalmente em pessoas pertencentes a certos grupos de risco, tais como mulheres grávidas, crianças, idosos e indivíduos imunodeprimidos como os submetidos à terapia prolongada com corticosteróides ou à quimioterapia, os portadores de AIDS, os alcoólicos, os diabéticos e os submetidos à hemodiálise.

Em gestantes, a doença manifesta-se com sintomas semelhantes aos da gripe, como febre, dor de cabeça, calafrios e dores nas costas, aparecendo às vezes faringite, diarréia e inflamação nos rins; ocasionalmente ocorre meningite. A bacteremia na gestante pode levar a infecção do feto através da via transplacentária, o que ocorre geralmente no terceiro mês de gestação. Logo após os sintomas de febre e calafrios, pode ocorrer o aborto ou o nascimento de bebês prematuros (MARTH, 1988).

Na listeriose neonatal (ROCOURT, 1996) podem ser observadas duas síndromes: uma manifestação precoce, principalmente septicemia apresentada por bebês de pouco peso e acompanhada de alta taxa de letalidade e uma manifestação tardia, principalmente meningítica, que ocorre em recém-nascidos com peso normal e está caracterizada por baixa taxa de letalidade (FARBER, 1986).

O Quadro 01, a seguir, demonstra resumidamente tipos de infecções causadas por listeriose, bem como, gravidade e período de incubação.

QUADRO 01 FORMAS DE OCORRÊNCIA DE LISTEROSE

Tipos de Listeriose	**Natureza da Infecção**	**Gravidade**	**Tempo de incubação**
Infecção Zoonótica	Infecção local e lesões na pele	Benigna e curável se tratada	1-2 dias
Infecção Neonatal	Infecção de recém nascidos adquirida da mãe durante o parto ou por contaminação cruzada de um neonato no hospital a outros recém nascidos.	Pode ser extremamente grave, resultando em meningite e morte.	1-2 dias, habitual em infecções congênitas antes do nascimento.
Infecção durante a gravidez	Adquirida pelo consumo de alimentos contaminados.	Enfermidade leve similar à gripe, ou assintomática para a mãe, mas com sérias implicações para o feto que inclui aborto espontâneo, a morte do feto, nascimento de crianças mortas e meningite.	5-12 dias (incubação tardia) Como conseqüência de uma infecção a partir de outro recém nascido.
Infecção de Adultos	Adquirida pelo consumo de alimentos contaminados	Assintomática, enfermidades leves, que podem evoluir para infecções do sistema nervoso central como meningites. Sendo mais comum em indivíduos imunodeprimidos e idosos.	Varia desde um dia a vários meses.
Intoxicação alimentar por *Listeria*	Consumo de alimentos com grandes quantidades de *L. monocytogenes,* ou toxinas pré-formadas.	Vômitos e diarréia, às vezes podem evoluir para bacteremia podendo se curar sozinha ou não.	Menos de 24 horas após o consumo.

FONTE: BELL E KYRIAKIDES, (1998)

A dose mínima de infecção não foi ainda estabelecida, mas informações sobre a população de *L. monocytogenes* em alimentos contaminados envolvidos em surtos indicam que populações entre 10^3 – 10^4 Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/g de alimento foram responsáveis pela doença (DUFFY *et al.,* 1999).

Entretanto, estudo realizado na Finlândia indica que a exposição da população de risco a doses baixas [0,3 Número Mais Provável (NMP)/g] de *L. monocytogenes*, por períodos prolongados, pode também levar ao desenvolvimento da doença (MAIJALA *et al*., 2001).

Organismos internacionais tratam o caso com a gravidade que merece, porém no âmbito nacional, os estudos dos casos envolvendo este microrganismo ainda são pontuais e não se relacionam, resultando em um cenário onde, aparentemente, não representa um grau de risco que justifique maior informação ao público e medidas mais amplas de controle. As causas mais prováveis da falta de um maior volume de dados científicos e de informações sobre os problemas relacionados à *Listeria* no cenário nacional, seriam os altos custos analíticos e uma deficiência na interação dos estudos realizados, tanto dentro do setor alimentício como no hospitalar, e pouca exigência de controle governamental.

A legislação brasileira determina a ausência de *L. monocytogenes* em 25 gramas de queijo, mas para outros alimentos, como produtos cárneos, ainda não existe um limite regulatório. Dada à freqüência de *L. monocytogenes* em carnes e produtos cárneos de origem suína, a sua detecção deveria ser levada em consideração na avaliação do risco de transmissão da listeriose para o ser humano, a partir de produtos cárneos (SANTOS *et al*., 2005).

Critérios para níveis toleráveis de *L. monocytogenes* em produtos cárneos foram introduzidos em diversos países (GRAVANI, 1999). Entre estes, os Estados Unidos da América exige ausência de *L. monocytogenes* em 25 g do alimento ("tolerância zero"), enquanto na Europa, limites quantitativos inferiores a 100 UFC/g foram recomendados para não apoiar o crescimento do patógeno (ANON, 1999).

3.3.1.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Apesar de *Listeria monocytogenes* causar uma doença de baixa morbidade (0,3 – 1 caso / 100.000 pessoas / ano) nos Estados Unidos, sua importância está na elevada mortalidade associada a ela (FDA, 2008).

No Quadro 02 descreve-se o levantamento epidemiológico efetuado entre os anos de 1970 a 2008 envolvendo incidências e surtos ocorridos decorrentes de toxinfecções causadas pela *L. monocytogenes.*

QUADRO 02 LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO DE *L. monocytogenes*

Ano	País	Ocorrência	Bibliografia
1970 - 2007	Estados Unidos	12 surtos de listeriose resultaram em 1466 casos decorrentes da ingestão de produtos lácteos, cárneos, vegetais e ovos contaminados.	FDA, 2008
1979	Estados Unidos	Primeiro surto de listeriose causada por alimentos, registrados em 8 hospitais; segundo investigação realizada a possível causa relaciona-se a ingestão de vegetais e carne de frango contaminados.	JAY, 2005
1981	Canadá	Foram constatados 41 casos de listeriose transmitidas por vegetais cultivados com esterco contaminado com *L. monocytogenes.*	SCHLECH III *et al*., 1983
1983	Estados Unidos	Surto de listeriose associado ao sorotipo 4b, ocasionou 14 óbitos, causado pelo consumo de leite submetido a tratamento térmico inadequado.	FLEMING *et al*., 1985
1985	Brasil	Observou-se cinco casos de listeriose em transplantados renais num mesmo hospital, caracterizada pelos sorovares 1/2a e 4b.	HOFER *et al*., 1999
1985	Estados Unidos	Epidemia de listeriose acometeu 65% da população de risco, o alimento responsável foi o queijo macio tipo mexicano, resultando em 105 mortes.	LINNAN *et al*., 1988
1983 – 1987	Suíça	Surto resultou em 122 casos e 34 óbitos, associado ao consumo de queijo contaminado	BILLE, 1990
1988	Túrquia	Relato de aborto de 23 semanas ocasionados pelo consumo de carne de frango.	KERR *et al*.,1988
1992	França	Surto de listeriose envolvendo 279 casos com 63 mortes e 22 abortos onde a usa foi à ingestão de língua suína cozida	DEVER *et al*., 1993

1996	Suécia	Relatou-se surto de listeriose associado à ingestão de truta arco-íris.	ERICSSON *et al*., 1997
1998-1999	Finlândia	Surto de listeriose causado pela ingestão de manteiga contendo *L. monocytogenes* sorotipo 3a.	MAIJALA *et al*., 2001
1999 – 2006	França	(1999 – 2005) Declínio na incidência de listeriose. (2006) Aumento abrupto da infecção causada pela *L. monocytogenes*.	GOULET, *et al*., 2008
2000	França	Consumo de produto suíno defumado contaminado resultou em 7 óbitos. O produtor retirou do mercado todos os produtos depois do registro de *L. monocytogenes.*	DOROZYNSKI, 2000
2003	Reino Unido	Surto de listeriose observou-se em mulheres grávidas que consumiram sanduíche proveniente do mesmo ponto de venda.	DAWSON *et al*. ,2006
2003 - 2007	Estados unidos	Declínio na incidência de infecções causadas por Campylocabter e alguns sorovares de Salmonella. Aumento significante de infecções causadas por Listeria.	CDC, 2008
2006	Brasil	Relataram-se dois casos de peritonite bacteriana espontânea por *Listeria monocytogenes* em pacientes com cirrose.	TOYOSHIMA *et al*., 2006
2005-2008	Índia	Observou-se aumento de surtos relacionados à listeriose, envolvendo principalmente derivados cárneos e vegetais.	DHANASHREE *et al*., 2008

3.3.1.4 PRESENÇA DE *Listeria* sp EM EMBUTIDOS

Estudos no Brasil demonstram a presença de *L. monocytogenes* em alimentos cárneos. DESTRO *et al.*,(1991) relataram uma incidência de 32% de *L. monocytogenes* em diferentes alimentos, como carne, lingüiça, salsicha, leite “in natura” e queijo tipo “Minas Frescal”. Quanto às lingüiças, 80% das amostras foram positivas para o microrganismo.

De acordo com os resultados obtidos por BERSOT *et al*. (2001), das 30 amostras de mortadela analisadas, 11 (36,7%) foram positivas para *Listeria* sp, sendo oito (26,7%) para *L. monocytogenes*.

LIMA, ROSSINI e POPERMAYER (2003) verificaram a ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos, através da análise de 106 amostras de cinco tipos diferentes de lingüiças (de suína, se carne de frango, tipo calabresa, tipo mista e tipo toscana). A presença de *Listeria* sp foi evidenciada em 62 amostras (58,5%) e *L. monocytogenes* em 11 amostras (10,4%). A maior ocorrência de *L. monocytogenes* ocorreu em lingüiça de frango (18,2%).

Em um estudo realizado por SILVA *et al*. (2004), foi isolada *Listeria* sp em 100% das 41 amostras de lingüiças mistas do tipo frescal analisadas. Dentre as diferentes espécies, *L. innocua* foi isolada com maior freqüência (97,6% das amostras) seguida por *L. monocytogenes* (29,3%) e *L. welshimeri* (24,4%).

Listeria monocytogenes possui elevada resistência fisiológica, sendo difícil, controlar ou prevenir sua contaminação em alimentos, principalmente naqueles que não sofrem tratamento térmico durante o processamento. Sua capacidade de colonização, multiplicação, e formação de biofilmes em equipamentos de plantas processadoras de alimentos tornam este microrganismo uma ameaça à indústria (RORVICK *et al*., 2003). Assim, cuidados especiais, como adoção de boas práticas de higiene durante as etapas de produção de alimentos, associados às técnicas de preservação do produto final tornam-se imprescindíveis (FENLON, 1999).

3.3.1.5 MÉTODOS PARA ISOLAMENTO DE *Listeria* sp

Listeria monocytogenes não era considerada um importante patógeno em alimentos até ocorrem alguns surtos de listeriose no início dos anos 1980; devido ao consumo de alimento contaminado. Conseqüentemente, alguns meios seletivos foram desenvolvidos para o isolamento de *Listeria monocytogenes* em alimentos. McBride e Girard (1960) e Vlaemynck *et al.,* (2000) desenvolveram um meio seletivo para o isolamento de *L. monocytogenes* de amostras clínicas, mas foram encontrados problemas com a biota contaminante como S*treptococcus, Micrococcu*s, Enterobactérias e *Pseudomonas*. Muitas modificações do meio foram subseqüentemente desenvolvidas como o Modified McBride's Ágar, porém a

seletividade era insuficiente. Muitos investigadores buscavam melhorar a seletividade propondo modificações de fórmulas.

O desenvolvimento do cloreto de litio feniletanol moxalactam Ágar LPM por Lee e McClain (1986), apud Vlaemynck *et al.*,(2000), foi uma significante melhoria para o isolamento de *Listeria monocytogenes* considerando a resistência geral de *Listeria* sp frente ao cloreto de lítio e cefalosporinas, como moxalactam e ceftazidina. Estes princípios são a base para outros meios seletivos. O caráter indicativo neste meio ainda estava baseado no desenvolvimento de colônias azulado-acinzentadas quando do uso da iluminação de Henry (VLAEMYNCK *et al.,* 2000). A adição de esculina ao meio resultando na formação de colônias verde acinzentadas puxando para preto, em alguns casos, o meio também modificava sua cor para preto, tornavam mais fácil à visualização e identificação das colônias. Estes elementos foram explorados, posteriormente, na maioria dos meios usados para o isolamento de *Listeria* sp, como Ágar Oxford (CURTIS *et al.,* 1989), Ágar Oxford modificado (McCLAIN E LEE, 1988) e Ágar PALCAM (VAN NETTEN *et al.,*1989). Porém ainda havia necessidade de um meio que pudesse distinguir *Listeria monocytogenes* e *Listeria* sp não patogênica. Além disso, sabe-se que durante o enriquecimento em caldo seletivo, *Listeria monocytogenes* pode ser inibida pelo rápido crescimento de *Listeria innocua*.

O Ágar hemolítico ceftazidina cloreto de lítio – HCLA, “enhanced haemolysis agar” – EHA e algumas modificações deste, *Listeria monocytogenes* Ágar sangue - LMBA, recentemente desenvolvido Rapid L’mono de Foret & Dorey (1997), o meio ALOA, e Ágar Base Listeria Cromogênico (ISO) CM 1080 e CM 1084 ambos fornecidos pela Oxoid (OTTAVIANI *et al.,*1997) são exemplos de tais meios que possibilitam a diferenciação de *Listeria monocytogenes* de *Listeria* sp (VLAEMYNCK *et al.,* 2000).

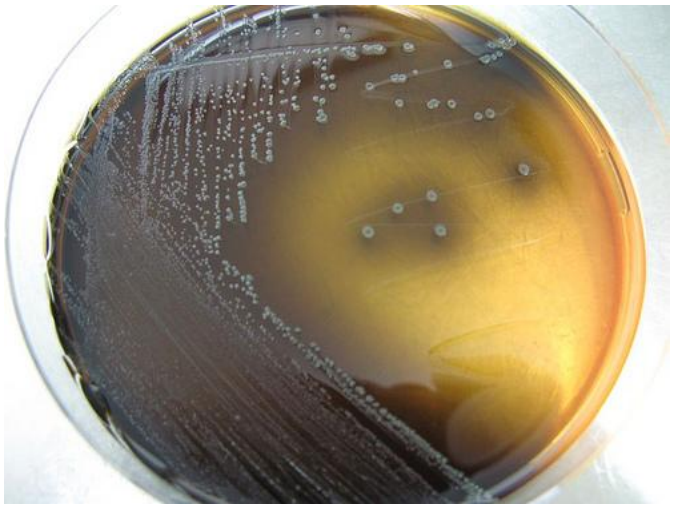
O enriquecimento seletivo realizado em duas etapas (a primeira em caldo Half Fraser, e a segunda em caldo Fraser), tem a finalidade de inibir a microbiota acompanhante, permitindo a recuperação de baixos números de células de *Listeria* sp.

O efeito seletivo do caldo Half Fraser é exercido pela associação de ácido nalidíxico e acriflavina, e no caldo Fraser pelo cloreto de lítio, ácido nalidíxico, acriflavina e citrato de ferro. O enegrecimento do meio evidencia a presença de

Listeria sp. Após 48 horas de incubação, as culturas que não enegrecem, são consideradas negativas (DIFCO E BBL MANUAL, 2003). Na seleção e isolamento em ágar PALCAM, observa-se a não fermentação do manitol e a formação de esculetina pela hidrólise da esculina, reação revelada pela presença de ferro trivalente. Palcam é meio sólido onde se encontram presentes as substâncias sulfato de polimixina B, cloreto de lítio, ceftazidina e cloridrato de acriflavina, com a finalidade da inibição da biota acompanhante. *Listeria monocytogenes* hidrolisa a esculina dando como resultado a formação de um halo negro ao redor das colônias (Figura 02).

Este agente não fermenta o manitol, o que o diferencia de contaminantes como *Enterococcus* e *Staphylococcus* (DIFCO E BBL MANUAL, 2003).

FIGURA 02 ISOLAMENTO DE *Listeria* sp PELO MEIO PALCAM



O ágar base *Listeria* Cromogênico (ISO) CM 1080, para seleção e isolamento, utiliza o princípio básico dos meios existentes pela adição dos agentes seletivos inclusive cloreto de lítio, ceftazidina, polimixina B, ácido nalidíxico e anfotericina para reduzir o desenvolvimento de competidores. No entanto o ágar base *Listeria* Cromogênico (ISO) CM 1084 somente utiliza como agentes seletivos o cloreto de lítio, polimixina B e ácido nalidíxico, não conseguindo reduzir o eventual crescimento de bolores e leveduras.

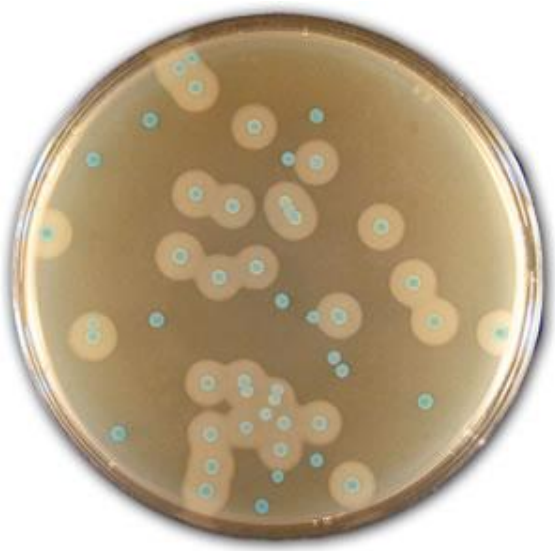
Em ambos os meios a esculina é substituída por um substratocromogênico e um substrato enzimático (lecitina e fosfatidilinisitol), onde, a hidrólise da lecitina pela enzima fosfolipase C resulta em um aparecimento de colônia azulada típica para

todas as listerias e a capacidade de diferenciar *Listeria monocytogenes* de outras *Listerias* sp, pela produção de um halo opaco claro que cerca as colônias.

A combinação cromogênica X-glucoside é somada com o substrato para a detecção da β- glucosidase, que é comum para toda a espécie de *Listeria*, resultando em colônias de coloração azul. A diferenciação da *Listeria monocytogenes* da *Listeria* sp é baseada na produção de fosfatidilinositol-específico fosfolipase C em cepas de *Listeria monocytogenes* que somado a um substrato purificado específico resulta em um halo opaco claro ao redor das colônias de *Listeria monocytogenes* (Figura 03) (VLAEMYNCK *et al.,* 2000).

A confirmação bioquímica e diferenciação das espécies são realizadas por meio da verificação da produção de beta-hemólise em Ágar sangue de cobaia (*L.monocytogenes* é positiva), prova de CAMP-test (*L. monocytogenes* produz reação de CAMP positiva com *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e negativa para *Rhodococcus equi* ATTC 6939), motilidade característica no Ágar motilidade modificado (*Listeria* sp apresenta crescimento móvel característico em forma de guarda-chuva), capacidade de fermentar ramnose e, α - metil D – manosídeo, incapacidade de fermentar xilose e o manitol (OXOID MANUAL, 2008).

FIGURA 03 ISOLAMENTO DE *Listeria* sp PELO MEIO CM 1084



FONTE: OXOID MANUAL, 2008

3.3.1.6 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *Listeria* sp

L. monocytogenes é um microrganismo não facilmente diferenciado das outras espécies de *Listeria* não patogênicas. Vários métodos convencionais, como os da International Organization for Standardization (ISO, 1996), United State of Department of Agriculture – Food Safety and Inspection Service (USDA – FSIS, 1989); Bacteriological Analytical Manual (BAM) (HITCHINS, 1998) e AOAC Internacional, (AOAC, 1999), requerem vários dias e um grande número de provas bioquímicas para a identificação e diferenciação das espécies (HOCHBERG *et al*., 2001).

Na tentativa de melhorar a capacidade de detecção de *L. monocytogenes* e tornar os resultados mais rápidos e confiáveis, estes métodos, apesar de aceitos, sofrem constantes modificações (DONNELY, 1999).

Apesar do longo tempo envolvido na sua execução, do volume de trabalho e do custo em termos de vidraria, equipamentos de laboratório (estufas, geladeiras, autoclaves, contadores, etc.) e suprimentos, os métodos convencionais apresentam a grande vantagem de serem utilizados já há muito tempo e de serem reconhecidos como oficiais, tanto nacional como internacionalmente (FRANCO, 1994).

Métodos alternativos para detectar *L. monocytogenes* têm sido desenvolvidos, mas, geralmente, requerem tempo próximo ao do convencional para o procedimento de confirmação para resultados positivos presuntivos.

Na pesquisa de *Listeria* uma etapa inicial de enriquecimento é quase sempre usada para facilitar a recuperação de organismos injuriados que podem ser encontrados em amostras de alimentos processados. Além disso, ela pode promover a multiplicação seletiva do organismo alvo. Gray *et al.* (1948) descreveram um dos primeiros protocolos de enriquecimento de *Listeria*, em que amostras eram mantidas a frio (4ºC), em meio não-seletivo, por vários meses. Desta maneira, conseguiam limitar o crescimento de organismos competidores e tirar proveito da característica psicrotrófica de *Listeria*. Embora o método de enriquecimento a frio tenha mostrado alta sensibilidade, o tempo para a obtenção dos resultados limitou seu potencial para aplicação prática como um método de detecção (DONNELY, 1999).

Esforços para reduzir o tempo de recuperação e o isolamento de *Listeria* sp em matrizes complexas e amostras ambientais resultaram no desenvolvimento de diferentes caldos de enriquecimento e ágares seletivos e diferenciais (DONNELY, 1999).

Problemas associados aos métodos convencionais ocorrem por exemplo, com que células de *L. monocytogenes* injuriadas que podem não se recuperar nos meios empregados, ou outras espécies de *Listeria* podem multiplicar-se mais rapidamente, sobrepondo-se à população de *L. monocytogenes*. Com isso, há possibilidade de resultados falso-negativos.

Outros microrganismos acompanhantes podem também se multiplicar mais rapidamente que *L. monocytogenes*, interferindo na sua detecção (DONNELLY, 1999; PETRAN E SWANSON, 1993). Vários são os métodos não convencionais para a pesquisa de *Listeria* sp. Em alimentos, porém poucos são específicos para *L. monocytogenes*. De modo geral, todos os testes requerem um enriquecimento primário, para aumentar seletivamente a população alvo para níveis detectáveis (ROCOURT, 1999).

Devido à tolerância zero para *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo em alguns países e à freqüente presença de baixas populações de *L. monocytogenes* nos alimentos em geral (ZHANG *et al.,* 2004), o método de escolha deve ser muito sensível, capaz de detectar 1 célula / g do produto (INGIANNI *et al*., 2001) e apresentar alta especificidade, prevenindo a ocorrência de resultados falso-positivos.

Um teste ótimo para utilização em rotina deve ser de fácil execução por técnicos não especializados, específico para *L. monocytogenes*, rápido, com a possibilidade de obter-se o resultado em poucos dias, adequado para automação (INGIANNI *et al*., 2001).

A obtenção de resultados em um período curto de tempo possibilita eventuais correções durante o processamento do alimento, a retirada de um lote do comércio e, para produtos frescos, a comercialização mais rápida (BARBUTI *et al*., 2000).

Os métodos rápidos surgiram na década de 70 com o objetivo de abreviar o tempo para obtenção de resultados analíticos, simplificar o trabalho, e reduzir custos, no sentido de melhorar a produtividade laboratorial. A essas vantagens aliam-se outras como maior sensibilidade e especificidade que aquelas

apresentadas pelo método convencional. Nos últimos anos, a área de métodos rápidos vem se desenvolvendo rapidamente, com a proposta de novos sistemas e instrumentos, destinados a variados tipos de análise (ALMEIDA, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2003).

Recentemente, vários métodos alternativos para detecção rápida de células de *Listeria* têm sido desenvolvidos, os quais são baseados na hibridização de ácidos nucléicos (EMOND *et al*., 1993), amplificação de ácidos nucléicos (STARBUCK *et al.*, 1992) ou uso de anticorpos específicos (RIJPENS *et al.,* 1995). No entanto, eles nem sempre são apropriados para uso na indústria de alimentos. Até o momento nenhuma técnica empregando DNA tem poder discriminatório capaz de, em um único teste reconhecer todas as espécies de *Listeria* (RIJPENS *et al.,* 1995). Além disso, os testes baseados na análise de DNA podem detectar células mortas, porventura presentes nos alimentos (ALMEIDA *et al.,* 1999).

Os testes de detecção rápida atualmente disponíveis incluem hibridização de ácidos nucléicos (Gene-Trak, Darmstadt de origem alemã), métodos baseados imunodoseamento (Listeria visual imunodoseamento Bioenterprises Tecra, Roseville, desenvolvido na Austrália; VIDAS - Biomerieux, Marcy l'Etoile, ambos elaborados por franceses; Listertest, Vicam, Watertown, promovidos por americanos), imuno-látex aglutinação métodos baseados (Listeria Rapid Test, Oxoid), Isothermal amplificação de ácidos nucleicos (Nasba, Organon Teknika, Boxtel) e PCR (ProbeliaTM, Sanofi Pasteur diagnósticos; Bax System-L. monocytogenes, Qualicon, Wilmington). No entanto, a maioria deles requer um passo enriquecimento seletivo e, conseqüentemente, ausência ou presença pode ser determinada, mas não quantificada (MARTÍN *et al.*, 2004).

A quantificação de *L. monocytogenes* em produtos cárneos é muitas vezes difícil, devido à elevada população da microbiota competitiva (CAPITA *et al*. 2001) e os baixos níveis de *Listeria* sp. Muitos métodos têm sido desenvolvidos para a quantificação de *Listeria* sp ou *L. monocytogenes*: Listeria-SELECT (CARROLL *et al.* 2000), ISO-GRID método de filtro (ENTIS LERNER, 2000) e PCR em tempo real (HEIN *et al.* 2001). No entanto, esses métodos são, em geral, demasiadamente caros e não adequados para análise de rotina em muitos laboratórios.

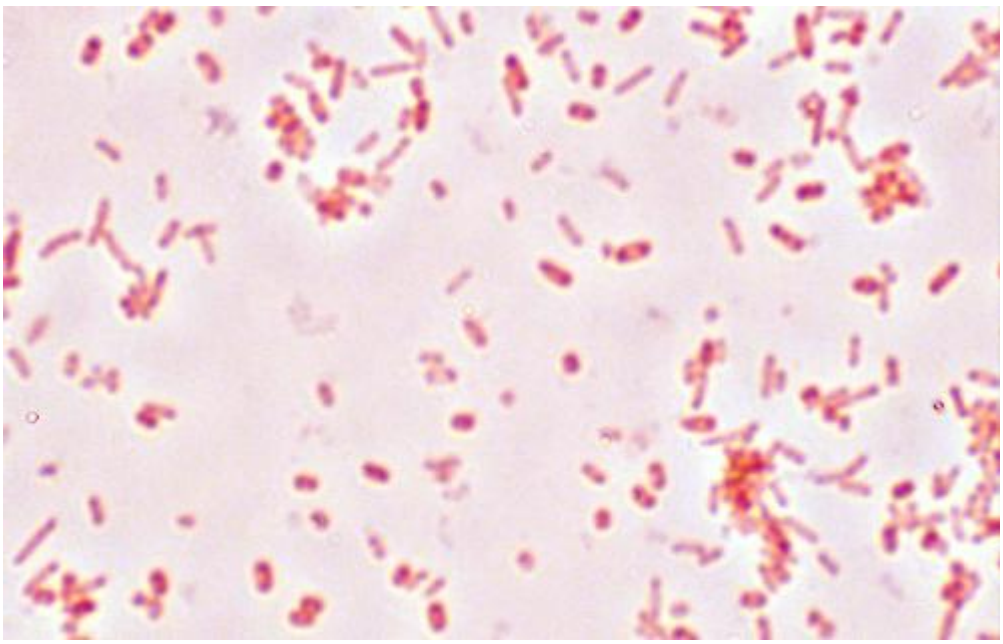
3.3.2 *Salmonella* sp

A *Salmonella* sp recebeu este nome em homenagem ao seu descobridor, Daniel Salmon (TORTORA *et al.*, 1993). Salmon e Smith descreveram a *S. choleraesuis* como agente etiológico de uma doença infecciosa em suínos, posteriormente identificada como sendo a Peste Suína Clássica em que a *S. choleraesuis* aparecia como agente secundário (JUBB *et al.*, 1985).

3.3.2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA *Salmonella* sp

De acordo com o International Comission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 1996), a *Salmonella* é um gênero da família *Enterobacteriaceae*, sendo caracterizadas como bactérias Gram negativas, anaeróbias facultativas, na forma de bastonetes (Figura 04). As formas móveis possuem flagelos peritríquios.

FIGURA 04 MORFOLOGIA DA *Salmonella* sp EM COLORAÇÃO DE GRAM



FONTE: ADAMS E MASS, 1995

De acordo com Adams e Moss (1995), a temperatura ótima para o crescimento deste microrganismo é de 35-37°C, onde a mínima é de 5°C podendo

chegar à temperatura máxima de 45°C. O pH ótimo para seu crescimento é 7,0. Quando os valores extremos para o crescimento são ultrapassados, pode ocorrer a morte da *Salmonella*.

A atividade de água afeta o crescimento deste microrganismo. A atividade de água mínima para o crescimento do microrganismo é de 0,93. São destruídas facilmente por desinfetantes comerciais, utilizados na indústria de alimentos. As *salmonelas* são capazes de sobreviver por muito tempo nos alimentos e outros substratos (ICMSF, 1996).

A dose infecciosa de *Salmonella* é elevada, 10^6 (UFC/g ou mL) podendo variar de acordo com a virulência do sorotipo, a sensibilidade do indivíduo e o alimento veiculado (ADAMS E MOSS, 1995). De acordo com Forsythe (2002) a dose infecciosa pode variar de 20 até 10^6 células. A dose infectante depende principalmente do *status* imunológico do hospedeiro, da virulência do agente e da composição química do alimento contaminado.

Compondo a população de maior risco estão os neonatos, crianças, idosos e imunodeprimidos. Essa população apresenta uma resposta imunológica fraca em função da imaturidade ou debilitação do sistema imunológico, somada, em algumas situações à baixa produção de ácido clorídrico no estômago que favorece a colonização intestinal. Da mesma forma, o elevado conteúdo de gordura de alguns alimentos proporciona às bactérias certa proteção frente à acidez do estômago, onde pequeno número de células poderá causar infecção a partir desses alimentos (D'AOUST, 1997).

3.3.2.2 SALMONELOSE

As *salmonelas* podem ser classificadas em três grupos. Primeiramente, as que infectam somente os humanos: estas incluem a *S. typhi*, a *S. parathypi A* e a *S. parathypi C.* Este grupo inclui o agente das febres tifóide e paratifóide, que são as mais graves de todas as enfermidades produzidas por *Salmonelas*.

A febre tifóide é a que tem o período de incubação mais longo, provoca temperatura corporal mais elevada, e o índice de mortalidade mais alto. A síndrome paratifóide é mais benigna que a tifóide.

Em segundo aparecem as sorovariedades adaptadas a hospedeiros (algumas das quais são patógenas para o homem e podem ser contraídas a partir de

alimentos): estão incluídas *S. gallinarum* (aves), *S. dublin* (bovinos), S*. abortus-equi* (eqüinos), *S. abortus-ovis* (ovinos), e *S. choleraesuis* (suínos).

No terceiro grupo estão as sorovariedades inadaptadas (sem preferência de hospedeiro). São patogênicas para as pessoas e para outras espécies animais, e incluem a maioria das sorovariedades transmitidas por alimentos (JAY, 1994).

De acordo com Jay (1994) entre as diferentes espécies de *Salmonella*, *S.choleraesuis* possui o índice de mortalidade mais alto: 21%.

Conforme Frazier e Westhoff (1993) as pessoas e os animais são direta ou indiretamente a fonte de contaminação dos alimentos com *Salmonella.* Também podem ser provenientes de gatos, suínos e dos bovinos, ainda que as fontes mais importantes de *Salmonella* nos alimentos são as aves, os ovos e os roedores. Cascas de ovos, ovos líquidos, ovos congelados são fontes importantes de contaminação. As salmonelas estão presentes no trato intestinal das aves e dos grandes animais de abate sem demonstrar sintoma algum de infecção. São encontradas nas fezes, nos gânglios linfáticos, no fígado e na vesícula biliar, nos rins e baço de animais clinicamente sadios (PRICE E SCHWEIGERT, 1994).

Os indivíduos adquirem *Salmonella* quase exclusivamente devido ao consumo de água e alimentos contaminados com fezes de animais ou humanos, principalmente, cremes doces utilizados em tortas, maioneses, carne moída, lingüiças, ovos e carnes de aves, suínos e bovinos. As carnes suínas e bovinas são responsáveis por cerca de 13% dos surtos de salmonelose humana (MEAD *et al.* 1999; SLUTSKER *et al.,* 1999; BRENNER *et al.,* 2000).

A salmonelose pode se apresentar clinicamente nos animais na forma entérica (localizada) com diarréia ou na forma generalizada, afetando vários sistemas, resultado de septicemia. A enfermidade clínica causada ao homem pela ingestão de alimentos contaminados por *Salmonella* tem um período de incubação de 8 a 36 horas, com os extremos oscilando entre 5 e 72 horas (PARDI *et al.,* 1995).

Thorberg e Engvall (2001) relataram que os processos particularmente envolvidos no risco de contaminação por *Salmonella* sp no abate de suínos são a evisceração e a toalete, mas o escaldamento e a divisão da carcaça também podem introduzir microrganismos que resultam em uma maior contaminação ao fim da linha do abate.

O aumento da incidência de salmonelose está associado ao aumento da população, ao aumento da criação e alimentação de animais com o uso de

antibióticos, ao aumento do consumo de carnes e derivados, à preparação maciça de alimentos, ao armazenamento inadequado e ao hábito crescente do consumo de produtos crus e mal cozidos (BARRETO, 2008).

Entre os microrganismos importantes para a segurança alimentar, a *Salmonella* tem se destacado como causadora de infecções alimentares. Os produtos de origem avícola têm sido os mais comumente relacionados a surtos desta natureza em humanos. Entretanto, a contaminação da carne suína também pode vir a oferecer risco à população (WEGENER E BAGER, 1997). A ausência dessa bactéria em produtos de origem suína é de extrema importância para competir no mercado, que apresenta uma crescente exigência em relação à qualidade dos produtos.

A partir da crescente ênfase na segurança de produtos cárneos que chegam ao consumidor, tem-se estimulado a identificação de meios para reduzir ou eliminar *Salmonella* sp antes do abate, uma vez que a redução das taxas de infecção pré-abate resulta em aumento na segurança dos produtos cárneos (FUNK *et al.,* 2001).

3.3.2.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Entre os bacilos Gram negativos que produzem gastroenterites de origem alimentar, os mais importantes são os representantes do gênero *Salmonella* sp (JAY, 2005).

A salmonelose é uma infecção alimentar de alta incidência e de importância em saúde publica, com custo significativo para muitos países. Existem poucos dados acerca da participação dos alimentos de origem animal na epidemiologia de salmonelose humana nos países em desenvolvimento, contrastando com os países desenvolvidos onde eficientes pesquisas etiológicas são realizadas (LÁZARO *et al*., 1997).

A incidência real de salmonelas nas toxinfecções alimentares é desconhecida uma vez que, freqüentemente pequenos surtos não são relatados às autoridades de Saúde Pública. Milhões de casos são registrados anualmente em todo o mundo que resultam em mortes.

O Center Disease Control (CDC) estima a ocorrência de 2 a 4 milhões de anuais com mais de 2000 subespécies de Salmonella (CDC, 2008).

No Quadro 03 descreve-se o levantamento epidemiológico efetuado entre os anos de 1986 a 2008 envolvendo incidências e surtos ocorridos decorrentes de toxinfecções causadas pelas formas patogênicas do gênero *Salmonella.*

QUADRO 03 LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO DE *Salmonella* sp

Ano	**País**	**Ocorrência**	**Referência**
1986 -1993	Argentina	Notificaram-se 150 surtos afetando mais de 600 pessoas, sendo que 47,3% apresentaram *Salmonella enteritidis* como agente causador da toxinfecção	CAFFER E EIGUER, 1994
1984	Portugal	Relatou-se a freqüência de salmonelose em 92% dos surtos	MACHADO E BERNARDO, 2002
1991 – 1994	Itália	*Salmonella* sp foi responsável por 81% dos surtos onde S. enteritidis estava relacionado a 34% deles	MACHADO E BERNARDO, 2002
1995	Brasil	Notificou-se 56 surtos causados por *Salmonella* com 3516 casos e 5 óbitos	CVE, 1995
1995 – 2001	Comunidade Européia (13 paises)	Relatou-se em 13 países 600.000 casos de salmonelose humana por ano, em sua maioria causada por *S. enteritidis* e *S. typhymurium*	GILL *et al.*, 2002
1999 - 2002	Brasil	Registraram-se 878 surtos de toxinfecção alimentar, com 20471 casos, dentre as bactérias envolvidas a *Salmonella* sp correspondeu a 25,6% dos surtos	EDUARDO *et al.,* 2003
2000	Brasil	Pão de queijo contaminado por formas patogênicas do gênero *Salmonella* foi o causador de surtos	SOUZA *et al.* 2000
2000	França	Um surto foi envolvido ao consumo de sanduíches contaminados por *Salmonella* sp envolvendo 34 pessoas com registro de óbito de uma criança	PENA *et al*, 2000
2000 – 2004	Brasil	O consumo de ovos ou maionese caseira foi responsável por 277 surtos	BRASIL, 2004
2004	Inglaterra	90% dos surtos alimentares foram	FRANCO;

		causados por *Salmonella* sp	LANDGRAF, 2004
2004	Estados Unidos, Canadá e Japão	Dados relatam o aumento gradativo da incidência de salmonelose	FRANCO E LANDGRAF, 2004
2005	Estados Unidos	Infecções por Salmonella, resultaram em 168.000 casos, 15.000 internações, 580 mortes, com custo aproximado de 3 bilhões de dólares	WHO, 2005
2007	Inglaterra e País de Gales	Relatou-se que dos 101 surtos alimentares analisados, *Salmonella* sp foi responsável por mais da metade deles.	HUGHES *et al*, 2007
2008	Estados Unidos	40.000 casos de salmonelose foram relatados, resultando em 600 mortes	CDC, 2008

Embora as notificações brasileiras sejam precárias, acredita-se que a incidência de doenças microbianas de origem alimentar em nosso pais seja bastante elevada. Mesmo em países desenvolvidos, nos quais o abastecimento de gêneros alimentícios é considerado seguro do ponto de vista de higiene e saúde pública, a ocorrência de doença desta natureza é significante e vem aumentando, apesar dos avanços tecnológicos nas áreas de produção e controle de qualidade.

3.3.2.4 PRESENÇA DE *Salmonella* sp EM EMBUTIDOS

Os suínos têm sido identificados em diversos países como importantes portadores de *Salmonella* sp (HALD *et al*., 2004; DAVIES *et al.,* 2004) e nos últimos anos a carne suína, cada vez mais, reconhecida como potencial origem de salmonelose humana (HALD *et al*., 2004).

No México, Bello-Pérez (1993) verificou que em 9.322 amostras de alimentos, encontrou-se *Salmonella* sp em 30% das lingüiças e 33% dos salsichões. Da mesma forma, Escartin *et al.* (1999), no mesmo país, encontraram 88,3% de embutidos positivos.

Chaves *et al*. (2000) no Rio de Janeiro, encontraram 10% das amostras de lingüiça frescal de origem suína positivas para *Salmonella* sp enquanto Tavechio *et al.* (2002) relataram 5% de ocorrência de *Salmonella* em salsicha em São Paulo, e Lobo *et al.* (2001) encontraram a mesma porcentagem em salames coloniais no Rio

Grande do Sul. Lirio *et al.* (1999) observaram que a lingüiça crua (10%) foi o segundo alimento que originou maior número de isolamento de *Salmonella* em São Paulo.

Surto devido a lingüiças contaminadas tem sido relatado nos Estados Unidos, onde a *S. typhimurium* foi isoladas (SAUER *et al.* 1997). Na Itália, *Salmonella* tem sido isolada em lingüiças de carne de suínos e também em curados (GIOVANNINI *et al.,*2004).

Em trabalho realizado por Giovannini *et al.* (2004), na Itália, de um número total de 595 amostras de produtos suínos, 58 (9,7%) foram encontradas contaminadas por *Salmonella*. Quarenta (17,6%) das 227 lingüiças frescas, 9 (8,9%) das 101 lingüiças secas e 9 (5%) das 180 carnes frescas foram positivas para *Salmonella* sp*. S. typhimurium* foi a mais freqüentemente isolada (35,5%), sorovar esse que é o segundo maior causador de salmonelose em humanos (20,3% do casos) na Itália (SCUDERI *et al.*, 1993).

3.3.2.5 DETECÇÃO DE *Salmonella* sp

A detecção de *Salmonella* sp em alimentos é uma técnica laboratorial que pode levar até 7 dias quando a análise é realizada pela metodologia tradicional, sendo necessários 4 dias para obtenção de resultado negativo confirmatório neste método (BENNETT *et al.,* 1998).

Para a indústria de alimentos, que retêm seus produtos até a obtenção dos resultados analíticos frente a um patógeno qualquer pesquisado, este tempo pode significar perdas econômicas, o que leva o analista a buscar alternativas analíticas mais rápidas.

Em microbiologia de alimentos, a presença de um único organismo patogênico é considerada significante, ”considerando-se a dose infectante do agente”. Portanto, métodos e meios devem ser sensíveis o suficiente para detectar um número extremamente reduzido de células (TIEJEN E FUNG; 1995).

Para pesquisa de *Salmonella* sp em alimentos, o método recomendado pelo Bacteriological Analytical Manual (BAM), American Public Health Association (APHA), Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o método clássico de cultivo, desenvolvido com a finalidade de garantir a detecção desse microrganismo, mesmo

em alimentos que apresentem situações extremamente desfavoráveis para o seu desenvolvimento, como alimentos com microbiota competidora muito maior que a população de *Salmonella* sp, alimentos em que as células se encontrem em número muito reduzido e/ou alimentos em que as células se encontrem injuriadas pela técnica de preservação, como a aplicação de calor, congelamento, secagem, salga, cura, entre outros (ECKNER *et al*., 2002).

O isolamento clássico de *Salmonella* sp pode ser dividido em quatro etapas: a) o pré-enriquecimento em caldo não seletivo para restaurar células injuriadas a uma condição fisiológica estável; b) enriquecimento seletivo, no qual a amostra é novamente colocada em caldo de cultivo contendo reagentes inibitórios que permitem a multiplicação de *Salmonella* sp, enquanto restringem a proliferação da maioria das outras bactérias; c) semeadura em meios sólidos seletivos que restringem a multiplicação de outras bactérias que não *Salmonella* (Figura 05); d) metodologias confirmatórias. A seleção dos meios de cultura e metodologia de preparo e cultivo das amostras varia de acordo com a fonte consultada, visando sempre, no entanto, obter as melhores condições de isolamento frente aos diferentes tipos de amostras (HAJDENWURCEL,1997).

FIGURA 05 MÉTODO CONVENCIONAL BAM PARA ISOLAMENTO DE *Salmonella* sp PLAQUEAMENTO SELETIVO E DIFERENCIAL. ESQUERDA ÁGAR ENTÉRICO DE HEKTOEN (HE). DIREITA ÁGAR SALMONELLA -SHIGUELLA (SS)

O Ágar semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado (MSRV) é derivado de melhorias efetuadas ao longo do tempo no Caldo Rappaport. Segundo o Manual Difco, (2003) o caldo de Rappaport segundo Rappaport, Konforti e Navon (1956),

incubado a 35°C, é baseado na habilidade de *Salmonella* sp em sobreviver em um meio de cultura de pressão osmótica relativamente elevada, capacidade de multiplicação em pH reduzido (5,2) e maior resistência ao verde malaquita, em conjunto com uma menor demanda nutricional.

Algumas modificações foram introduzidas por Vassiliadis et al., (1976) no caldo Rappaport, como a redução na concentração de verde malaquita, o aumento na temperatura de incubação de 35°C para 43°C e a sua utilização após uma etapa de pré-enriquecimento. Esta modificação foi denominada meio de Rappaport-Vassiliadis que apresenta uma maior atividade inibitória sobre a microbiota competidora do que a fórmula original (XIROUCHAKI, *et al*., 1982; VASSILIADIS, 1983).

Em estudo realizado por Van Schothorst e Renaud (1983), o caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) permitiu o isolamento de *Salmonela* em 42 amostras ambientais, enquanto o caldo tetrationato verde brilhante e o caldo selenito-cistina detectaram apenas 60% e 29% dessas cepas, respectivamente. Kalapothaki *et al*., (1983) também relataram a superioridade do caldo Rappaport-Vassiliadis em relação ao caldo tetrationato verde brilhante no isolamento de *Salmonella* sp a partir de amostras de carnes. O princípio dos meios semi-sólidos está na obtenção de uma maior especificidade e facilidade de isolamento das cepas de *Salmonella* sp porque estão combinados em um único meio de enriquecimento, o crescimento seletivo e a capacidade de produzir flagelos, característica da maioria das cepas de *Salmonella*.

Busse (1995), em uma revisão bibliográfica sobre meios de enriquecimento seletivo, concentra sua pesquisa bibliográfica no caldo RV e na sua evolução na forma do MSRV. Stuart e Pivnick (1965) estudaram o caldo selenito com 1,2% de ágar, o caldo Rappaport com 0,6% de ágar e o meio modificado de Rappaport adicionado de verde brilhante substituindo o verde malaquita. Os melhores resultados foram obtidos com o meio de Rappaport adicionado de verde brilhante e foi observado que o uso deste meio seguido de isolamento em Ágar EMB (Ágar eosina Azul de Metileno), geralmente, resultava em uma colônia pura de *Salmonella* sp.

Outros autores que usaram o procedimento do tubo em formato de “U”, nomeado como tubo “U”, foram Banwart (1968), que tentaram aperfeiçoar o método testando o efeito do pH, força iônica e a ação do trifenilmetano na motilidade de enterobactérias.

Em 1974, Chau e Huang desenvolveram um meio de enriquecimento seletivo semi-sólido para tubo ”U“, para a pesquisa de *Salmonella* sp a partir de amostras fecais. Foi considerado um meio de cultura eficaz e simples, mas sua seletividade não era alta, porque permitia o desenvolvimento e migração de outras espécies bacterianas como *Citrobacter freundii* e *Enterobacter cloacae*. Este efeito na seletividade foi minimizado quando, em 1976, Chau e Huang introduziram na composição do meio, verde malaquita, cloreto de magnésio e novobiocina (20µg/ml). Com o material coletado na área de migração realizavam testes sorológicos para antígenos “H“ (BUSSE, 1995).

Apesar dos meios semi-sólidos nos tubos em “U” permitirem o isolamento de um grande número de cepas de *Salmonela*, esses tubos apresentavam desvantagens como a necessidade de manuseio adequado, maior espaço para incubação e a limitação do seu uso devido ao formato peculiar (PERALES E AUDICANA, 1989).

Uma modificação do método foi introduzida por Goossens *et al*., (1984) que trocaram os tubos em “U” por placas de Petri. Eles usaram o meio de Rappaport modificado contendo 3,2 g de ágar, 65 mg de verde malaquita oxalato e 17,25 g de MgCl por litro. Os nutrientes foram reduzidos para 60% da formulação do Rappaport. Em trabalhos comparativos, o uso deste meio incubado por 18 horas sob temperatura de 37°C, aumentou em 22,3% a sensibilidade (detecção de amostras positivas) comparada ao método cultural tradicional (DE SMEDT *et al.,* 1986).

Perales e Audicana (1989) avaliaram o efeito da temperatura de incubação na eficiência do meio MSR para a detecção de *Salmonela* a partir de 104 amostras de produtos cárneos. O microrganismo estava presente em 41 amostras, das quais o meio SR (Semi-sólido Rappaport) incubado a 35°C permitiu detectar 90,2%, o BGA (Agar Verde Brilhante), 63,4%, o meio SR incubado a 43°C, 58,5% e o BSA (Agar Sulfito Bismuto), 46,3%. O meio SR incubado a 43°C foi 100% específico, seguido pelo SR a 35°C (72,6%), o BSA (36,6%) e o BGA (25,1%). O meio SR incubado a 35°C forneceu a melhor combinação sensibilidade-especificidade. Apesar da incubação do meio SR a 43°C ter aumentado a especificidade do meio de 72,6% para 100%, houve uma perda considerável de sua sensibilidade.

Um meio similar foi proposto por De Smedt *et al*., (1986) contendo 2,7 g de ágar, 37 mg de verde malaquita oxalato e 23,3 g $MgCl_2$. O conteúdo de nutrientes também foi reduzido. Como uma modificação do RV, o ágar foi chamado MSRV

(Modificação do ágar semi-sólido Rappaport Vassiliadis). O mais seletivo, MSR, é incubado a 35-37ºC, enquanto para o MSVR foi proposto 43ºC (reduzido para 42ºC, Baird *et al*., 1989). Como toda a família Rappaport, este meio não contém açúcares. Essa modificação de De Smedt *et al*., (1986) tornou o meio mais hipertônico.

Foi observado que concentrações mais elevadas de ágar resultavam em zonas de migração muito reduzidas e concentrações menores, apesar de proporcionar uma detecção mais rápida, tornava o meio instável e frágil durante o manuseio das placas de Petri.

A concentração de cloreto de magnésio de 2,33% e incubação a 42ºC foram suficientes para a inibição de *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter diversus*. A redução da concentração de ágar de 0,29 % para 0,27% aumentam a zona de migração, bem como o uso de 0,92% de triptose ao invés de triptona, resultou na formação de zonas de migração maiores (BUSSE, 1995). Estes fatores, combinados com uma temperatura de incubação de 42°C, permitiram condições adequadas para a multiplicação e consequente migração das cepas de salmonela (DE SMEDT *et al*., 1986).

A adição de novobiocina também é inibitória para *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter freundii* (DE SMEDT *et al*, 1986; CHAU E HUANG, 1974*).* Desta forma a eficiência desse meio é decorrente da habilidade de *Salmonella* sp em migrar através do meio altamente seletivo que é conferido pela presença de oxalato de verde malaquita, cloreto de magnésio, novobiocina, temperatura de incubação a 42ºC (O'DONOGUE e*t al*., 1992) e pH reduzido, o que minimiza a migração da maioria das Enterobacteriaceae móveis, exceto espécies de *Salmonella* sp*.*

De Smedt e Bolderdjik (1986) demonstraram que um pequeno número de células (60 UFC/mL) podia ser recuperado, mesmo que o número de bactérias competidoras estivesse na ordem de 10. As cepas de Salmonella*,* se presentes na amostra, formam zonas de migração circular na superfície do meio MSRV atingindo de 10 a 40 mm de raio em 24 horas de incubação a 42°C, enquanto os demais microrganismos (*Enterobacter cloacae, Citrobacter freundii, Proteus mirabilis*) são totalmente inibidos ou, quando se desenvolvem , as zonas circulares de migração não ultrapassam raios de 4 a 6 mm (DE SMEDT *et al*.,1986).

Esta migração é caracterizada por uma zona turva esbranquiçada ao redor da gota de inoculação, que pode se espalhar por toda a extensão da placa. Se o meio permanecer de coloração azul, sem formação de zona turva, o teste é considerado

negativo (ausência de *Salmonella* sp móvel). O crescimento de microcolônias em volta da gota não é considerado como migração. O resultado falso-negativo não deve ocorrer com o meio MSRV porque *Salmonella* sp*,* ao se mover por quimiotaxia através do meio, forma os halos de migração que facilitam a visualização de seu crescimento, o que não acontece com os competidores (DE SMEDT *et al*., 1994)**.**

Devido à baixa incidência de sorotipos de *salmonela* imóveis (<0,1%) e ao percentual de amostras negativas para *salmonela* (90%), os métodos de detecção baseados na motilidade têm tido reconhecimento na rotina laboratorial, e entre eles o MSRV, por apresentar um número reduzido de falso-positivos resultando em rapidez na análise, e, conseqüentemente, redução de custos de armazenamento para a indústria de alimentos em geral (OGGEL *et al*.,1990).

Em janeiro de 1993, a Association of Official Analytical Chemists (AOAC) adotou, preliminarmente, o método MSRV para a detecção de *salmonela* em amostras de cacau e produtos achocolatados e, em 1995, para *dried milk products* após a realização de estudos comparativos com o método tradicional para estas classes de produtos (BOLDERDIJK E MILAS, 1996).

Estudos comparativos foram efetuados utilizando o método MSRV frente a outros métodos de detecção de *salmonela* em amostras de alimentos, como imunoenzimático *Salmonella* - tek, Bactometer, tradicional, (O'DONOGUE *et al.,* 1992), modified 1-2 test e tradicional (OGGEL *et al*., 1990), não havendo diferença estatística nos resultados.

Os procedimentos de cultivo padrão para o isolamento de *Salmonella e*m alimentos são trabalhosos e requerem um mínimo de 4 dias para se obterem evidências presuntivas de contaminação (D'AOUST *et al*., 2000). A necessidade de métodos mais rápidos e menos laboriosos de detecção tem levado a avanços significativos no desenvolvimento de pesquisa e comercialização de "kits" de diagnóstico baseados em técnicas sorológicas, imunoabsorbância enzimática, hibridização de ácido nucléicos, entre outras (D'AOUST *et al*., 2003). Vários "kits" comerciais de diagnóstico baseados na técnica Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) estão disponíveis no mercado. Embora estudos comparativos tenham estabelecido sua equivalência com o método padrão de cultivo, é necessário validar a semelhança de sensibilidade entre ambas as metodologias (D'AOUST *et al*., 2002).

A importância e precisão da utilização de ensaios imunológicos para fins de diagnóstico estão na diversidade de anticorpos formados para um mesmo antígeno e que podem ser escolhidos, no caso dos anticorpos monoclonais. Esta diferenciação ocorre devido aos vários tipos de imunoglobulinas formadas (HARLOW E LANE, 1988).

O primeiro imunoensaio para *Salmonella* sp foi realizado em 1977 e, desde então, vários ELISA têm sido desenvolvidos, usando-se tanto anticorpos policlonais como monoclonais para detectar a maioria dos sorovares de *Salmonella* sp. Com o desenvolvimento da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais, trabalhos utilizando essa metodologia surgiram mostrando uma maior sensibilidade na detecção deste microrganismo. Nove anticorpos monoclonais capazes de detectar *Salmonella* sp viva em alimentos foram produzidos posteriormente (TAPCHAISRI *et al*. 1999). Não houve significância nas reações cruzadas com outras bactérias.

Dois “kits” comerciais receberam o “status” de oficiais pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists), desde 1989. Em comparação com o método convencional, o tempo total é reduzido em 2 dias e a análise estatística dos dados não tem indicado diferenças significativas (D’AOUST *et al*., 2003). Porém, o principal problema relatado por todos os métodos, que não o convencional, é o aparecimento de resultados falso-positivos e/ ou falso-negativos (BEUMER *et al*., 1991). De acordo com os mesmos autores, resultados falso-negativos no teste ELISA podem ser eliminados utilizando-se um anticorpo monoclonal de alta especificidade (TAPCHAISRI *et al*. 1999).

3.4 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

3.4.1 METODOLOGIA CONVENCIONAL

A detecção de *Salmonella* sp e *Listeria* sp em alimentos são freqüentemente realizadas pelo método tradicional chamado método clássico e foram desenvolvidos para a detecção de ambas as bactérias em situações desfavoráveis como é o caso de alimentos com a microbiota comprometida maior do que a população do microorganismo e/ou em alimentos nos quais as células bacterianas se encontrem em numero muito reduzido e/ou injuriadas por processo de preservação, como aplicação de calor, de congelamento ou de secagem (SILVA *et al.*, 1997; GIOMBELLI, 2000).

As técnicas convencionais para detecção de *Salmonella* sp e *Listeria* sp em alimentos, embora apresentem algumas variações na seleção dos meios de cultura e na forma de preparação das amostras envolvem basicamente quatro etapas que podem ser aplicadas a qualquer tipo de alimento: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento em meios seletivos sólidos, e identificação completa das colônias por meio de teste bioquímico e sorológicos (BAM, 1992; SILVA *et al.*, 1997; BOER E BEUMER, 1999; REIS *et al.*, 2002; GIOMBELLI E LOPES DA SILVA, 2002).

O pré-enriquecimento em caldo não seletivo objetiva a recuperação de células injuriadas por incubação da amostra por um período mínimo de 18 horas a 35-37°C. Vários meios podem ser utilizados nesta etapa, recomendados por órgãos nacionais e internacionais (SILVA *et al.*, 1997; AOAC, 2002, FORTUNA E FRANCO, 2005).

A etapa de enriquecimento em caldo seletivo objetiva inibir a multiplicação da microbiota acompanhante e promover a elevação do número de microrganismos, inoculando-se o pré-enriquecimento em caldo seletivo por 18 a 24 horas em temperaturas recomendadas para cada caldo utilizado. Recomenda-se a utilização de no mínimo dois tipos de caldos seletivos, pois a resistências a estes microrganismos varias de cepa para cepa. A eficácia do isolamento depende da interação entre meios de enriquecimento seletivo, temperatura e tempo de incubação (SILVA *et al*., 1997; AOAC, 2002, FORTUNA E FRANCO, 2005).

O plaqueamento seletivo e diferencial tem como objetivo o desenvolvimento preferencial de unidades formadoras de colônias (UFC) com características típicas

para posterior confirmação sorológica e bioquímica. Recomenda-se o plaqueamento com o mínimo três diferentes tipos de meios pelas mesmas razões citadas no parágrafo anterior (SILVA *et al.*, 1997; AOAC; 2002, FORTUNA E FRANCO, 2005).

A primeira confirmação (testes preliminares – triagem) é realizada com o objetivo de verificar se as colônias típicas desenvolvidas na placa são realmente as bactérias pesquisadas (SILVA *et al.*, 1997; AOAC, 2002, FORTUNA E FRANCO, 2005).

A segunda confirmação é efetuada através de provas bioquímicas e sorológicas utilizadas para a identificação da espécie. Colônias características nesses meios devem ser submetidas ao testes sorológicos e bioquímicos para confirmação (FORTUNA E FRANCO, 2005).

3.4.2 METODOLOGIA RÁPIDA / PRÁTICA

Nos últimos anos, vários métodos para detecção rápida foram propostos e dentre eles destacam-se as técnicas imunológicas. O primeiro ensaio imunoenzimático (EIA) foi reportado em 1977 com a necessidade de abreviar os resultados analíticos da *Salmonella* e melhorar a produtividade laboratorial (BEUMER *et al.*, 1991; FRANCO, 1996). Os imunoensaios enzimáticos (EIA) baseados em técnicas de triagem podem contribuir para acelerar e simplificar a detecção de diversos tipos de patógenos em alimentos (AOAC, 2002) e são muito empregados por apresentarem diversas vantagens: simplicidade, rapidez, sensibilidade, especificidade e conveniência como método de triagem (FRANCO, 1996).

As técnicas imunológicas, baseadas nas reações antígeno-anticorpo empregam anticorpos marcados com uma enzima cromogênica facilitadas por leitores automatizados sendo utilizado como método de triagem. Inúmeros ELISAS foram desenvolvidos, usando anticorpos policlonais e monoclonais que são capazes de detectar muitos sorotipos associados à infecção humana (BEUMER *et al.*, 1991; FRANCO, 1996; REIS *et al.*, 2001; ALCOCER E OLIVEIRA, 2003).

Os métodos imunológicos contam com a especificidade de ligação do anticorpo com o antígeno. Para detecção de um microrganismo ou toxina microbiana específica, uma variedade de anticorpos é aplicada em diferentes tipos de amostras. A adequação desses anticorpos depende geralmente de sua especificidade. Anti-

soro policlonais contém uma variedade de anticorpos originários de diferentes células e, portanto, de diferentes especificidades. Muitos anticorpos usados em imunoensaios são derivados do soro de coelho ou carneiro. Uma desvantagem no uso de anti-soro policlonal em imunoensaio é a inconstância da resposta imune do animal. O desenvolvimento de anticorpos monoclonais aumentou e muito o campo de imunoensaios devido á comprovação consistente e pesquisas confiáveis de caracterização de anticorpos (BOER E BEUMER, 1999).

Entre os vários tipos de testes imunoenzimáticos existentes, tipo não competitivo (tipo sanduíche) é o mais empregado nos sistemas de triagem de microrganismos patogênicos em alimentos. Todos os sistemas regentes de EIA disponíveis para análise até o momento são heterogêneos onde os patógenos investigados, se presentes no produto em teste, são capturados por aglutinação através de anticorpos específicos adsorvidos à superfície de uma matriz sólida que dependendo do sistema, pode ser esferas de poliestireno, placas de microtitulação, partículas metálicas, papel etc. Na etapa seguinte, o complexo antígeno-anticorpo reage com o conjugado preparado, através da ligação do anticorpo específico para o microrganismo a ser detectado e com uma enzima cromogênica. Após um período, o conjugado não ligado presente é lavado e uma substância é adicionada. Em seguida, o sanduíche formado reage com o substrato da enzima cromogênica, resultando no desenvolvimento de cor. Substratos fluorogênicos também podem ser empregados e mensurados diretamente pela quantidade de fluorescência. Se a enzima está presente, o substrato será modificado, resultando em um produto que pode ser detectado por técnicas colorimétricas ou fluorométricas (SILVA *et al.*, 1997; BOER E BEUMER, 1999; FRANCO, 1996).

Vários sistemas reagentes de ELISA têm sido empregados para detecção de *Salmonella* sp e *Listeria* sp. Estes geralmente requerem que o microrganismo alvo esteja em uma concentração 10^6 UFC/mL, apesar de alguns testes relatarem limite de sensibilidade de 10^4 (FORSYTHE, 2002). Tal requerimento justifica as etapas de pré-enriquecimento seletivo empregadas nas metodologias. O sistema reagente validado pela AOAC, para ambas as detecções, *Salmonella* sp e *Listeria* sp foi o sistema mini-VIDAS. Em comparação com métodos tradicionais, o tempo de ensaio é reduzido em até 2 dias e a análise estatística dos dados indica que não há diferença significativa entre eles. A essas vantagens aliam-se outras como: maior sensibilidade e especificidade, comparadas aos métodos convencionais. O maior

problema relatado com o método é a ocorrência de resultados falso-positivos ou falso-negativos. Resultados falso-positivos de ELISA podem ser eliminados usando combinações de anticorpos monoclonais de alta especificidade (BEUMER *et al.*, 1991; FRANCO, 1996; AOAC, 2002).

Historicamente, o sistema Vidas foi validado pela Association Française de Normalisation (AFNOR), em 17 de junho de 1994 como um método de análise rápida para todos os produtos para a alimentação humana. Esta validação foi obtida de acordo com o método de referência descrito na França NF EN ISO 11290-1 padrão. O método também foi validado como método oficial N º 999,06 pela Association of Analytical Chemists (AOAC), em maio de 1999. O método Vidas trata-se de um sistema de análise qualitativa imunoenzimática automatizada que utiliza pela técnica ELFA uma mistura de anticorpos monoclonais de captura com grande especificidade para detecção de antígenos (estirpes/cepas moveis e imóveis) nos produtos alimentares e nas amostras ambientais. Todas as etapas do teste são executadas automaticamente utilizando galerias plásticas descartáveis, constituídas de compartimentos contendo os reagentes necessários para o teste. A leitura e interpretação dos resultados também são automáticas (BOER E BEUMER, 1999; FRANCO, 1999; REIS *et al.*, 2001; AOAC, 2002).

No sistema mini-Vidas o cone de utilização única serve tanto de fase sólida como de suporte de pipetagem para teste. O interior do cone está revestido com os anticorpos anti- *Salmonella* e anti- *Listeria*, absorvidos na sua superfície. Os outros reagentes estão prontos a serem usados e pré-repartidos no barrete. Todas as etapas do teste são efetuadas automaticamente pelo aparelho. Uma fração das alíquotas do caldo de enriquecimento aquecido é colocada no barrete e a amostra é submetida a um ciclo de aspiração e dispensação cuja duração foi especificamente calculada para ativar a reação. Os antígenos presentes no meio vão fixar-se aos anticorpos monoclonais aderidos ao interior do cone. As etapas de lavagem eliminam os elementos não fixados. Em seguida, os anticorpos conjugados com fosfatase alcalina são aspirados e dispensados pelo cone e vão fixar-se aos antígenos, que já se encontram fixados aos anticorpos da parede do cone. Novas etapas de lavagem o substrato é aspirado e dispensado pelo cone; a enzima do conjugado catalisa a reação de hidrólise no substrato em um produto cuja fluorescência emitida é medida a 450 nm (AOAC, 2002).

3.4.3 SISTEMA API

É um sistema de identificação que utiliza testes miniaturizados e padronizados, sendo possível diferenciar todas as espécies das bactérias pesquisadas. O API possui microtubos contendo substratos desidratados para diversas provas bioquímicas, incluindo testes enzimáticos e fermentação de açúcares. Os resultados das reações são obtidos após 18 -24 h de incubação a 35 - 37 °C, identificando a espécie. As reações produzidas durante o período de incubação traduzem-se pelas mudanças de cor espontâneas ou reveladas pela adição de reagentes. A leitura destas reações é efetuada com o quadro de leitura e a identificação obtém-se consultando a lista de perfis do folheto informativo ou com um sistema de identificação. A interpretação dos resultados deve ser feito por um profissional capacitado, levando-se em consideração os resultados da análise das colônias e análise microscópica.

Os testes utilizados no presente estudo foram: API *Listeria* para identificação de *Listeria* sp e API 20-E que possibilita a identificação da família *Enterobacteriaceae*, o que possibilita o confirmação do patógeno *Salmonella* sp (BIOMERIEUX, 2008).

3.4.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

A busca por uma metodologia adequada e eficiente para detectar microrganismos em alimentos tem sido constante pelos pesquisadores da área (GIOMBELLI, 2000). Para utilização adequada de um critério microbiológico é necessária que a metodologia analítica a ser adotada seja relacionada corretamente. Muitos métodos podem ser utilizados para uma mesma determinação, conseqüentemente, a escolha do melhor método dependerá do método microbiológico adotado e da estrutura do laboratório (FRANCO E LANDGRAF,2004).

Inúmeros métodos laboratoriais de análise (convencionais e rápidos ou práticos) podem ser utilizados para um mesmo fim e por isso é importante considerar quais os objetivos da análise, uma vez que estes determinam o seu tipo (um indicador ou um patógeno), o método (rapidez, precisão, repetibilidade, reprodutibilidade, etc), a alíquota analisada (produto final ou da linha de produção), a

interpretação do resultado, as ações a adaptar e os reajustes do processo (FRANCO, 1996, ICMSF, 2002, FRANCO E LANDGRAF, 2004).

Recentemente a necessidade de creditação e o conceito de gerenciamento da qualidade total tem resultado em aumento da demanda para validação de métodos de controle da qualidade laboratorial. Entretanto, problemas associados com a microbiota não desejada, a injúria e estresse do microrganismo, e a influência dos constituintes dos alimentos na produtividade e seletividade dos meios de cultura ainda existem. A influência destes fatores pode ser minimizada se métodos validados para efeito do controle de qualidade para meios de cultura forem desenvolvidos e experimentados (CURTIS E BEUCHATS, 1998).

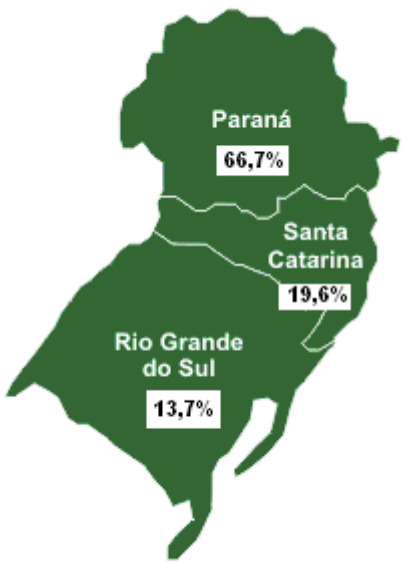
4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Foram coletadas 51 amostras de lingüiça resfriada (Anexo 01) adquiridas em diferentes estabelecimentos comerciais do estado Paraná, e produzidas na região Sul do país, como demonstrado na Figura 06, na forma embalada no período de agosto à dezembro de 2008. Foi adquirida, por amostra, a quantidade mínima de 250 g de forma a manter a representatividade preconizada pela RDC 12 de 02/01/2001. Após a coleta as amostras foram encaminhadas sob refrigeração durante o transporte para o laboratório e analisadas imediatamente ao seu recebimento. Somente foram analisadas as amostras que apresentaram a embalagem totalmente Íntegra.

FIGURA 06 DISTRIBUIÇÃO, EM PORCENTAGEM, DOS LOCAIS PRODUTORES DAS AMOSTRAS ANALISADAS



4.1.1 MEIOS DE CULTURA, SOLUÇÕES, REAGENTES E INSUMOS

Utilizaram-se meios de cultura formulados conforme Food and Drug Administration (FDA, 1995) e disponíveis comercialmente dos Laboratórios Difco Ltda, Oxoid e Merck na forma desidratada.

a) Pesquisa *Listeria* sp

- Frascos com 225mL de Caldo Half Fraser suplementado com SR 0166E (Citrato Férrico Amoniacal 112mg, Ácido Nalidíxico 2,25mg, Acriflavina 2,8125mg) (Oxoid);
- Tubos com 9 mL de Caldo Fraser suplementado com SR 0155E (Citrato Férrico Amoniacal 250mg, Ácido Nalidíxico 10mg, Acriflavina 12,5mg) (Oxoid);
- Placas de Ágar Palcam suplementado com SR 0150E (Polimixina B 5mg, Acriflavina HCl 2,5 mg) (Oxoid) ;
- Placas de Ágar Oxford seletivo para *Listeria* suplementado com Suplemento Seletivo Listeria (Formulação Oxford) SR0140E (Cicloheximida 200mg, Sulfato de Colistina 10mg, Acriflavina 2,5mg, Cefotetana 1mg, fosfomicina 5mg) (Oxoid);
- Placas de Ágar Base Listeria Cromogênico CM 1080 (Oxoid) suplementado com Suplemento Seletivo Listeria Cromogênico SR 0227E (Acido Nalidixico 13mg, Polimixina B 38,350 IU, Anfotericina 5mg, Ceftazidima 3mg) e SR 0228E Suplemento Diferencial Listeria Cromogênico (Solução de lecitina 20mL) ;
- Placas de Ágar Base Listeria Cromogênico (ISO) CM 1084 (Oxoid) suplementado com SR 0228E Suplemento Diferencial Listeria Cromogênico (Solução de lecitina 20mL) e Suplemento Seletivo Listeria Cromogênico (ISO) SR 0226E;
- Sistema Vidas Listeria (Biomerieux);
- Barrete LIS (Biomerieux);
- Tubos Sulfito Indol Motilidade com adição de 0,05% de cloreto de trifeniltetrazolium (SIM modificado);
- Tubos inclinados de Ágar tripticase de soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE);
- API Listeria (Biomerieux).

b) Pesquisa de *Salmonella* sp

- Água peptonada tamponada - ADPT (frasco de boca larga com 225 mL);
- Caldo Selenito-Cistina – SC (10 mL em tubos 16x160 com tampa de aço-inox);
- Caldo Rappaport-Vassiliadis Modificado - RV (10 mL em tubos 16x160 com tampa de aço-inox);
- Caldo M (ref. bioMerieux 42077)
- Sistema Vidas Salmonella
- Barrete SLM
- Cone SLM (Cones sensibilizados com anticorpos monoclonais específicos de antígeno de superfície das Salmonella)
- Calibrador SLM (Antígeno purificado e inativado de Salmonella +conservante + estabilizante protéico)
- Controle Positivo SLM (Antígeno purificado e inativado de Salmonella + conservante + estabilizante protéico)
- Controle Negativo (Tampão TRIS – NaCL 150 mmolL – Tween pH 7,6 + conservante)
- Cartão MLE (Ficha de especificações que contém os dados de fabricação necessários para a calibração do teste)
- 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).
- Soro polivalente somático;
- Soro fisiológico 0,85%.

4.2 MÉTODOS

Nas amostras coletadas foram realizadas as pesquisas de *Salmonella* sp e *Listeria* sp em 25 g de amostra.

Para a pesquisa de *Salmonella* sp através do método convencional utilizou-se metodologia convencional descrita no Bacteriological Analytical Manual (BAM), elaborado pelo Food and Drug Administratios (FDA); Compendium of Methods for the Microbiological

Examination of Foods, (1992) e método rápido, por meio do sistema mini Vidas (Biomerieux), onde este utiliza critérios de presença e ausência de colônias em 25 gramas da amostra.

Para a pesquisa de *Listeria* sp utilizou-se o método ISO 11290-1 (método convencional), e pelo sistema mini-VIDAS (Biomerieux), que caracteriza a presença e ausência do microorganismo em 25 gramas da amostra analisada.

4.2.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE

A preparação das amostras para análise se desenvolveu da seguinte maneira: a retirada da fração para análise foi feita de forma a garantir que a porção removida representasse o conteúdo da unidade de amostra. As frações para análise, porções de 25 g, foram retiradas assepticamente em cabine de segurança biológica, e colocados em sacos plásticos estéreis, próprios para o Stomacher, tendo seu peso descontado previamente em balança analítica.

4.2.2 PESQUISA *Listeria* sp

4.2.2.1 MÉTODO DE CULTURA CONVENCIONAL COMO RECOMENDADO PELA ISO 11290-1

- Enriquecimento primário

Para o enriquecimento primário em 25g da amostra foram adicionados 225mL de Caldo Half Fraser suplementado. Após homogeneização em Stomacher por 2 minutos, este foi incubado a 30°C por 24 horas.

- Enriquecimento secundário

Nesta segunda etapa, 1mL do enriquecimento primário foi adicionado em 9mL de Caldo Fraser suplementado, e incubado a 37°C por 48 horas.

- Plaqueamento seletivo

Após enriquecimento secundário procedeu-se o estriamento em duplicata em placas nos seguintes meios seletivos:

- Ágar Palcam suplementado;
- Ágar Oxford seletivo para Listeria suplementado;
- Ágar Base Listeria Cromogênico CM 1080 (Oxoid) suplementado;
- Ágar Base Listeria Cromogênico CM 1084 (Oxoid) suplementado.

Estes foram submetidos a incubação a 37°C por 48 horas.

As colônias típicas de *Listeria* em Ágar Oxford e Palcam apresentam se esféricas e circundadas por halos pretos resultantes de hidrólise da esculina.

Foram selecionadas 3 a 5 colônias de cada placa contendo colônias típicas para posterior confirmação.

Confirmação com colônias típicas

A confirmação das colônias típicas desenvolveu-se por meio da seleção de colônias típicas seguida pelo estriamento por esgotamento em tubos de Agar Tripticase de soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE), e incubadas a 30°C/ 24 e 48 horas.

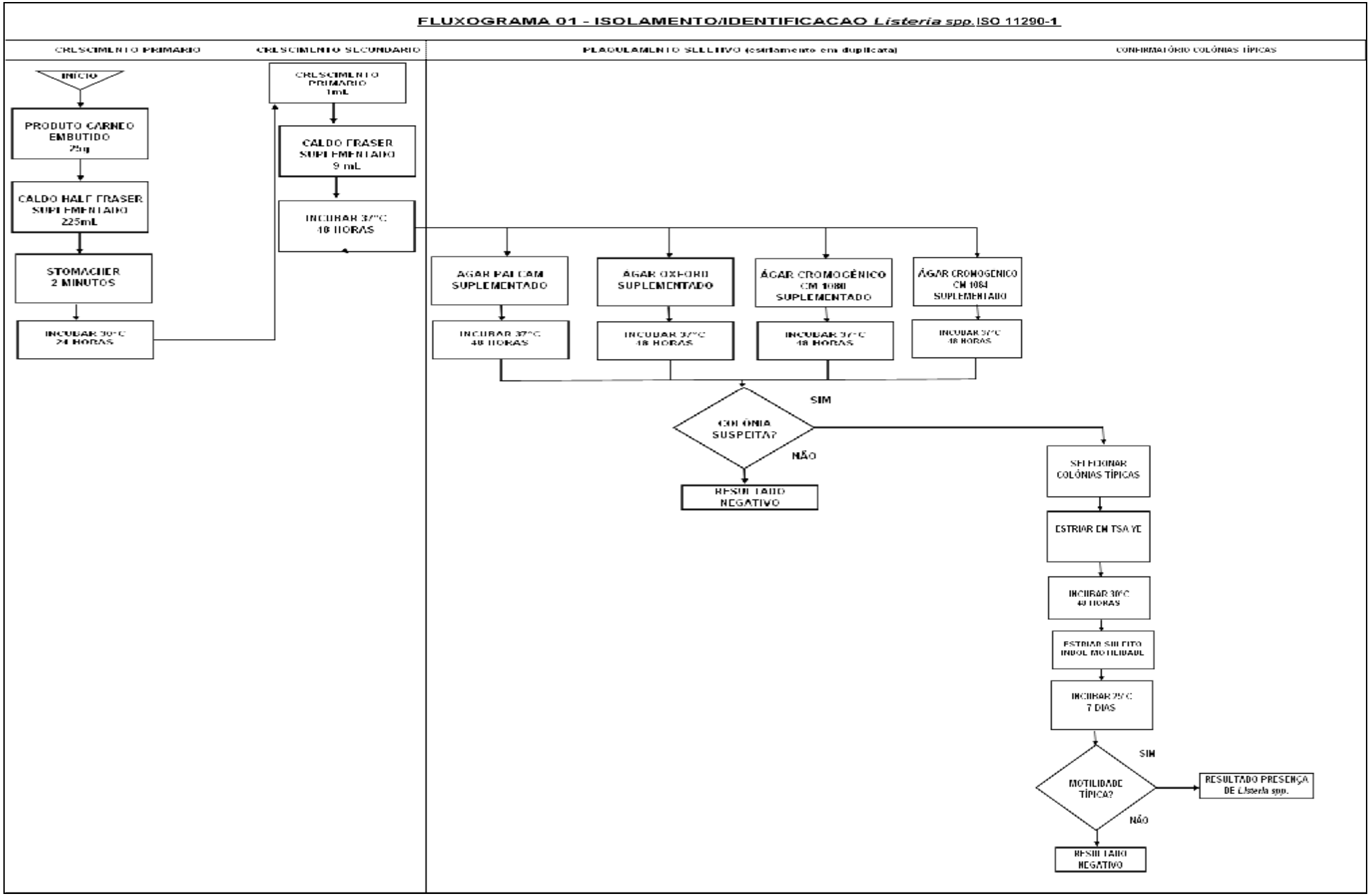
Inoculou-se, a partir do enriquecido, em tubos de sulfito indol Motilidade com adição de 0,05% de cloreto de trifeniltetrazolium (SIM modificado), em incubação a 25°C por ate 7 dias e observação diária, para realização da prova de motilidade.

As cepas de *Listeria* sp são móveis a temperatura de 25°C e desenvolvem uma zona de migração típica espalhando se na parte superior do meio e mantendo-se restritas à picada no fundo do tubo. Este tipo de migração produz uma massa de crescimento característico lembrando um guarda-chuva.

Paralelamente procedeu-se a identificação das cepas pelo sistema API Listeria.

O fluxograma de análise para detecção da *Listeria* sp em alimentos pelo método ISO está apresentado na figura 07.

FIGURA 07 FLUXOGRAMA DE ISOLAMENTO DE IDENTIFICAÇÃO DE *Listeria* sp PELO MÉTODO CONVENCIONAL ISO 11290-1


FLUXOGRAMA 01 - ISOLAMENTO/IDENTIFICACAO Listeria spp. ISO 11290-1
CRESCIMENTO PRIMARIO
CRESCIMENTO SECUNDARIO
PLAQUEAMENTO SELETIVO (estriamento em duplicata)
CONFIRMATÓRIO COLÔNIAS TÍPICAS
INICIO
PRODUTO CARNEO EMBUTIDO 25g
CALDO HALF FRASER SUPLEMENTADO 225mL
STOMACHER 2 MINUTOS
INCUBAR 30°C 24 HORAS
CRESCIMENTO PRIMARIO 1mL
CALDO FRASER SUPLEMENTADO 9 mL
INCUBAR 37°C 48 HORAS
AGAR PALCAM SUPLEMENTADO
AGAR OXFORD SUPLEMENTADO
ÁGAR CROMOGÊNICO CM 1080 SUPLEMENTADO
ÁGAR CROMOGENICO CM 1084 SUPLEMENTADO
INCUBAR 37°C 48 HORAS
INCUBAR 37°C 48 HORAS
INCUBAR 37°C 48 HORAS
INCUBAR 37°C 48 HORAS
COLÔNIA SUSPEITA?
SIM
NÃO
RESULTADO NEGATIVO
SELECIONAR COLÔNIAS TÍPICAS
ESTRIAR EM TSA YE
INCUBAR 30°C 48 HORAS
ESTRIAR SULFITO INDOL MOTILIDADE
INCUBAR 25°C 7 DIAS
MOTILIDADE TÍPICA?
SIM
NÃO
RESULTADO PRESENÇA DE Listeria spp.
RESULTADO NEGATIVO

4.2.2.2 MÉTODO MINI-VIDAS

- Enriquecimento primário

Para o enriquecimento primário em 25g da amostra foram adicionados 225 mL de Caldo Half Fraser suplementado, após homogeneização em Stomacher por 2 minutos, este foi incubado a 30°C por 24 horas.

- Enriquecimento secundário

Nesta segunda etapa 0,1mL do enriquecimento primário foi adicionado em 9mL de Caldo Fraser suplementado, e incubado a 30°C por 24 horas.

- Inativação celular

Após enriquecimento secundário transferiram-se 2 mL para tubo estéril, aqueceu-se em banho-maria a 95°C - 100°C por 15 minutos, arrefeceu-se o tubo imediatamente num banho de água fria.

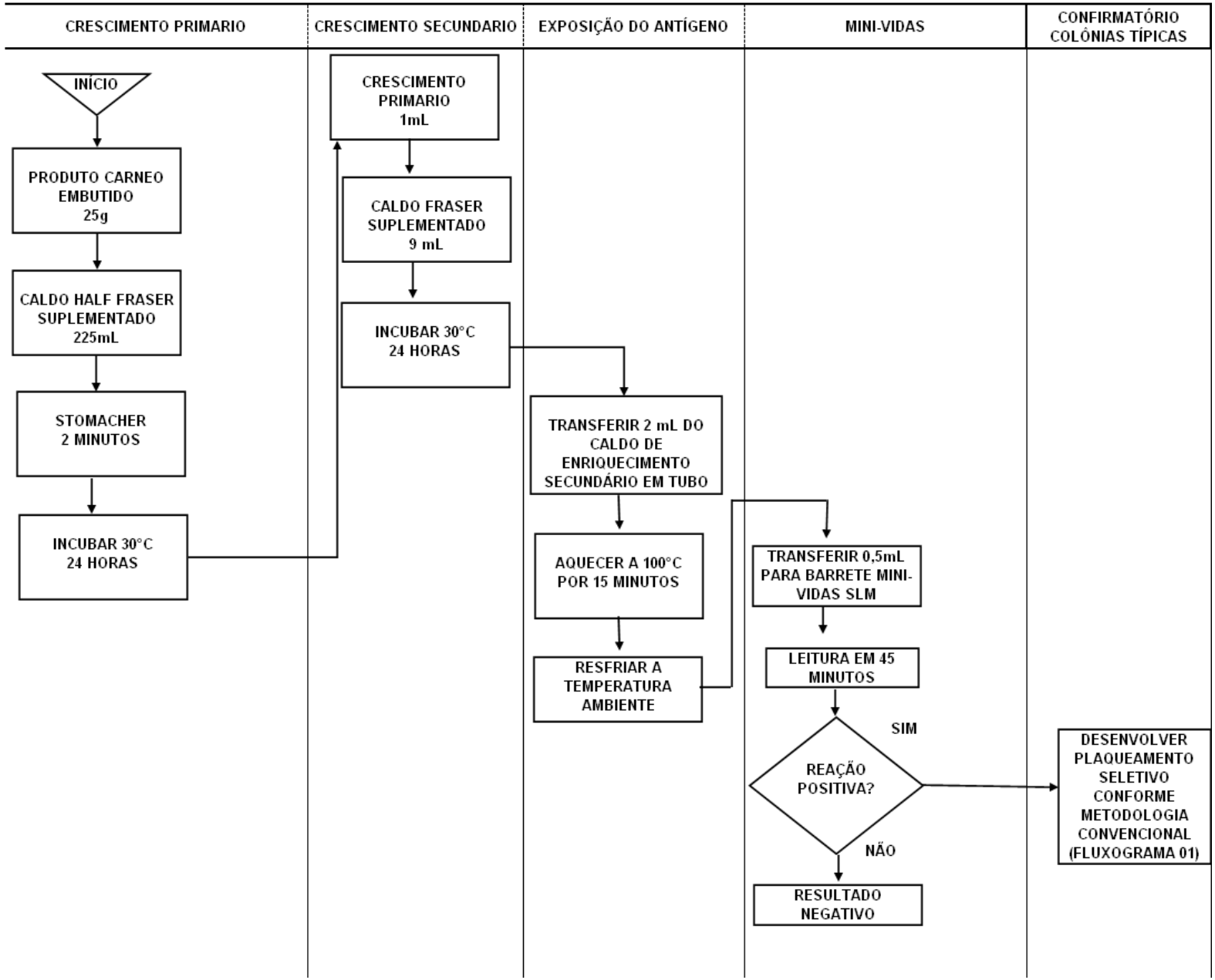
- Sistema mini-Vidas

Transferiu-se 0,5 mL da suspensão inativada para o poço-amostra do barrete mini-Vidas LIS (Desenvolvimento da metodologia conforme preconizado pelo fabricante). Conservou-se o resto do caldo a 4° C para confirmação em caso de resultado positivo. Nesta situação procedeu-se ao plaqueamento seletivo, identificação bioquímica e sorologia, adotando a mesma metodologia do procedimento convencional, e por fim avaliação confirmatório desenvolvida pela sistema API Listeria.

O fluxograma de análise para detecção da *Listeria* sp em alimentos pelo método mini-vidas está apresentado na figura 08.

FIGURA 08 FLUXOGRAMA DE IDENTIFICAÇÃO DE *Listeria* sp PELO MÉTODO MINI-VIDAS

FLUXOGRAMA 02 - IDENTIFICACAO *Listeria spp.* mini-VIDAS Listeria



4.2.2.3 CONFIRMATÓRIO DE *Listeria sp* ATRAVÉS DO API LISTERIA

- Purificação das colônias suspeitas de *Listeria* sp

As colônias típicas selecionadas para identificação bioquímica convencional foram também utilizadas para identificação através do API Listeria. Com uma alça de Henly, foi transferida uma colônia para um tubo de TSA-YE inclinado seguido de incubação a 35° C por 24 horas.

- Preparo do inóculo

Com uma alça de níquel-cromo foi transferida uma pequena quantidade de crescimento bacteriano do tubo de TSA-YE inclinado para uma ampola contendo 2 mL de água desmineralizada, obtendo-se uma suspensão bacteriana com uma turbidez de 0.5 pontos na escala de McFarland.

- Preparação da câmara úmida

A câmara úmida, onde foi incubada a galeria contendo os microtubos com ágar desidratado em atmosfera úmida, foi formada pela própria bandeja e tampa do kit, adicionando-se 5mL de água.

- Inoculação distribuída

Foi distribuída a suspensão bacteriana em cada microtubo, evitando-se a formação de bolhas. No primeiro teste, DIM, foram adicionados 100µL do inóculo e, nos demais, 50 µL. A exatidão da inoculação é muito importante, uma vez que, um microtubo com inóculo insuficiente, ou em excesso pode causar resultado falso-positivo ou falso-negativo. Incubou-se a câmara úmida, contendo a galeria inoculada, a 35° C - 37° C por 18 – 24 horas em condições aeróbicas.

- Leitura e Interpretação da galeria

Adicionou-se 1 gota de reagente ZYM B ao teste DIM e, após 3 minutos, foi realizada a leitura de todos os testes, conforme exemplo apresentado na Figura 09.

Anotaram-se todos os resultados obtidos em uma ficha de resultados, da qual configuraram-se os testes dos microtubos como positivo ou negativo, de acordo com a coloração formada.

Os resultados obtidos foram transcritos em um perfil numérico, onde a combinação numérica revela a identificação de espécie do microrganismo.

FIGURA 09 SISTEMA API LISTERIA – IDENTIFICAÇÃO: *Listeria monocytogenes*

Legenda: (Substrato enzimático) negativo, (Esculina Citrato de Ferro) positivo, (4-nitrofenil-D-manopiranosido) positivo, (D-arabitol) positivo, (D-Xylose) negativo, (L-Rhamnose) positivo, (Metil-D-glucopiranosido) positivo, (D-Ribose) negativo, (Glicose-1-Fosfato) negativo, (D-Tagatose) negativo,

4.2.3 PESQUISA DE *Salmonella* sp

4.2.3.1 MÉTODO CONVENCIONAL BAM

O fluxograma de análise para detecção da *Salmonella* sp em alimentos pelo método convencional está apresentado na Figura 10.

- Pré-enriquecimento em caldo não seletivo

Vinte e cinco gramas da amostra foram pesadas assepticamente e adicionadas a 225 mL de caldo de pré-enriquecimento (ADPT) com homogeneização em “Stomacher”. Os frascos foram incubados a 35 ± 0,2°C em estufa bacteriológica por 24 horas, com as tampas ligeiramente afrouxadas.

- Enriquecimento em caldo seletivo

Após incubação, o frasco com o caldo de pré-enriquecimento foi agitado delicadamente e foi transferido deste, 1,0 mL para 10,0 mL de Caldo Selenito Cistina (SC) e 0,1 mL para 10,0 ml de Caldo Rappaport -Vassiliadis Soja Peptona (RVS) os quais foram incubados em estufa bacteriológica a 42± 0,2°C por 24 horas.

- Plaqueamento seletivo diferencial

Os enriquecimentos em caldo seletivo foram estriados na superfície de placas de Agar SS e Agar HE que foram posteriormente incubadas de forma invertidas a 35± 0,2°C por 24 horas. Após período de incubação foi verificado o desenvolvimento de colônias típicas de *Salmonella.* Em HE as colônias típicas apresentam-se transparentes, verde-azuladas, com ou sem centro preto. As cepas fortemente produtoras de H_2S podem produzir colônias inteiramente negras. Em SS as colônias típicas apresentam-se transparentes geralmente com centro negro.

- Confirmação bioquímica e sorológica

Quando da ocorrência de colônias típicas foram selecionadas, duas colônias típicas de cada placa para confirmação preliminar nos tubos de Ágar LIA e Ágar TSI. Com o auxílio de uma agulha de inoculação, foi removida uma porção da massa de células, do centro da colônia típica que foi inoculada em tubos inclinados de Ágar LIA e Ágar TSI. A inoculação foi feita por picada e estrias na rampa, foi utilizada 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. Os tubos foram incubados a 35± 0,2°C por 24 horas e foi observada a ocorrência de reação típica de Salmonella.

Reação típica de *Salmonella* sp em TSI: rampa alcalina (vermelha) e fundo ácido (amarelo), com ou sem produção de H_2S (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 H_2S. Reação típica de *Salmonella* sp em LIA**:** fundo e rampa alcalinos (púrpura, sem alteração da cor do meio), com ou sem produção de H_2S (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 H_2S.

Quando as placas de HE ou SS apresentaram colônias típicas, porém não isoladas de *Salmonella,* foi estriada uma alçada da colônia, tomada no centro e sem tocar nas colônias adjacentes, em placas de HE e SS, para purificação da cultura. Somente então, a partir da cultura pura, foram inoculados os tubos de LIA e

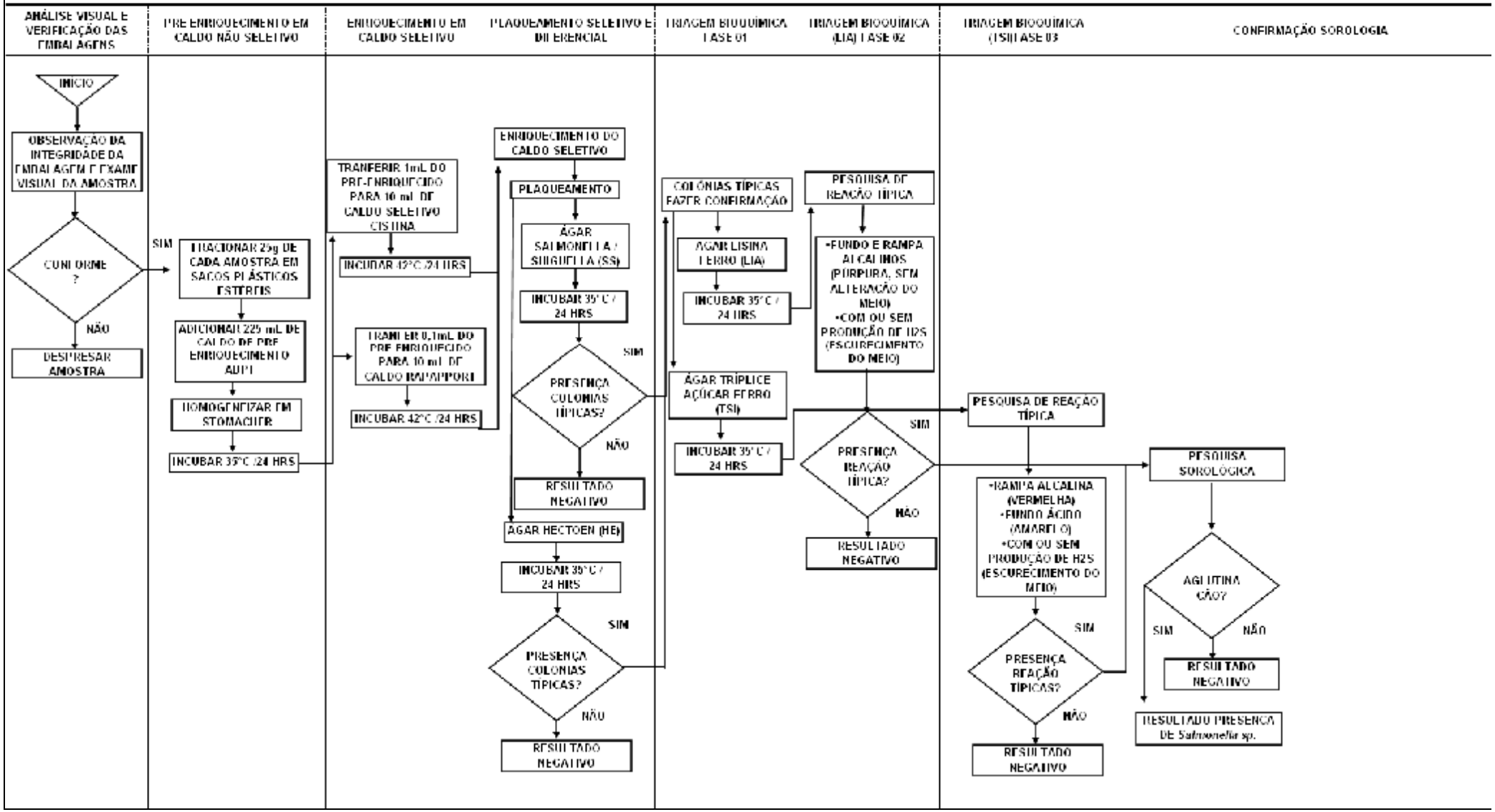
TSI.Os tubos de TSI utilizados foram inclinados com fundo de no mínimo 2,5 cm e incubados com a tampa ligeiramente afrouxada, para manter condições aeróbicas. Este cuidado objetivou prevenir a excessiva produção de H_2S e reações ácidas errôneas na rampa. Se ainda assim, ocorrendo excessiva produção de H_2S, mascarando a reação ácida do fundo, assumiu-se a reação como típica.

Os tubos de LIA utilizados foram inclinados com fundo de, no mínimo 2,5 cm, e incubados com a tampa bem fechada, porque a reação de descarboxilação da lisina ocorre em anaerobiose. 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* foi realizado o teste sorológico somático polivalente em lâmina de vidro ou placa de Kline. Em dois quadrados foram colocadas duas gotas de soro fisiológico e uma alçada do microrganismo a partir o Agar TSI. A cultura foi bem emulsionada. Sobre um dos quadrados foi adicionada uma gota de anti-soro polivante anti-*Salmonella* e foi bem emulsionado. Segurando a lâmina contra um fundo preto bem iluminado, foram feitos delicados movimentos de inclinação e rotação da lâmina, para movimentar a emulsão, por um minuto, foi então observada a ocorrência de aglutinação no quadrado com o anti-soro (prova positiva). Foi comparado o resultado obtido 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.

FIGURA 10 FLUXOGRAMA DE IDENTIFICAÇÃO DE *Salmonella* sp PELO MÉTODO CONVENCIONAL BAM

FLUXOGRAMA 03: DETECÇÃO DE *Salmonella sp.* PELO MÉTODO CONVENCIONAL



4.2.3.2 MÉTODO RÁPIDO MINI-VIDAS

O fluxograma de análise para detecção da *Salmonella* sp em alimentos pelo método mini-vidas está apresentado na Figura 12.

Adicionam-se assepticamente 25 g da amostra em 225 mL do caldo de ADPT. Homogeneizou-se utilizando um saco Stomacher e incubou-se 24 ±2 horas a 35°C. Após incubação, o frasco com o caldo de pré-enriquecimento foi agitado e foi transferido deste 1,0 mL para 10,0 mL de Caldo SC e 0,1 mL para 10,0 mL de Caldo Rappaport-Vassiliadis Soja Peptona (RVS) os quais foram incubados em estufa bacteriológica a 42± 0,2°C por 24 horas.

Após incubação, transferiu-se 1 mL de cada caldo de enriquecimento seletivo para tubo contendo caldo M, incubou-se a 42± 0,2°C por 24 horas. Transferiram-se 2 mL do enriquecido para tubo estéril, desenvolveu-se técnica de inativação do antígeno, fazendo-se aquecimento em banho-maria a 100° C durante 15 minutos. Em seguida resfriou-se em água fria, transferiu-se 0,5 mL para a barrete /tira VIDAS SLM (conforme preconizado pelo fabricante). Conservou-se o resto do caldo a 4° C para confirmação em caso de resultado positivo. Nesta situação procedeu-se ao plaqueamento seletivo – diferencial e à confirmação bioquímica através do sistema API 20E e sorologia somática polivalente e lamina de vidro**.**

4.2.3.3 CONFIRMATÓRIO DE *Salmonella* sp ATRAVÉS DO API 20E

- Purificação das colônias suspeitas de *Salmonella* sp

As colônias típicas selecionadas para identificação bioquímica convencional foram também utilizadas para identificação através do API 20E (Figura 11). Com uma alça de níquel-cromo, foi transferida uma colônia para ágar nutriente seguida de incubação a 35° C por 24 horas.

- Preparo do inóculo

Com uma alça de níquel-cromo foi transferida uma pequena quantidade de crescimento bacteriano do ágar nutriente para uma ampola contendo 2 mL de água

desmineralizada, obtendo-se uma suspensão bacteriana com uma turbidez de 0.5 pontos na escala de McFarland.

- Preparação da câmara úmida

A câmara úmida, onde foi incubada a galeria contendo os microtubos com ágar desidratado em atmosfera úmida, foi formada pela própria bandeja e tampa do kit, adicionando-se 5mL de água.

- Inoculação distribuída

Foi distribuída a suspensão bacteriana em cada microtubo, evitando-se a formação de bolhas. Nos testes Citrato de Sódio, Piruvato de Sódio, e Gelatina Bovina, foram adicionados 100µL do inóculo e, nos demais, 50 µL. Com a utilização de óleo de parafina desenvolveu-se anaerobiose nos testes L-arginina, L-lisina, L-ornitina. A exatidão da inoculação é muito importante, uma vez que, um microtubo com inóculo insuficiente, ou em excesso pode causar resultado falso-positivo ou falso-negativo. Incubou-se a câmara úmida, contendo a galeria inoculada, a 35° C - 37° C por 18 – 24 horas em condições aeróbicas.

- Leitura e Interpretação da galeria

Adicionaram-se os seguintes reagentes:

- Reagente TDA, sobre o teste L-triptofano (1 gota);
- Reagente JAMES, sobre o teste L-triptofano (1 gota);
- Reagentes VP 1 e VP 2, sobre o teste VP (1 gota de cada).

Após 3 minutos, foi realizada a leitura de todos os testes.

Anotaram-se todos os resultados obtidos em uma ficha de resultados, da qual se configuram os testes dos microtubos como positivo ou negativo, de acordo com a coloração formada.

Os resultados obtidos foram transcritos em um perfil numérico, onde a combinação numérica revela a identificação de gênero e espécie do microrganismo.

FIGURA 11 SISTEMA API 20 E PRONTO PARA USO (DESIDRATADO)

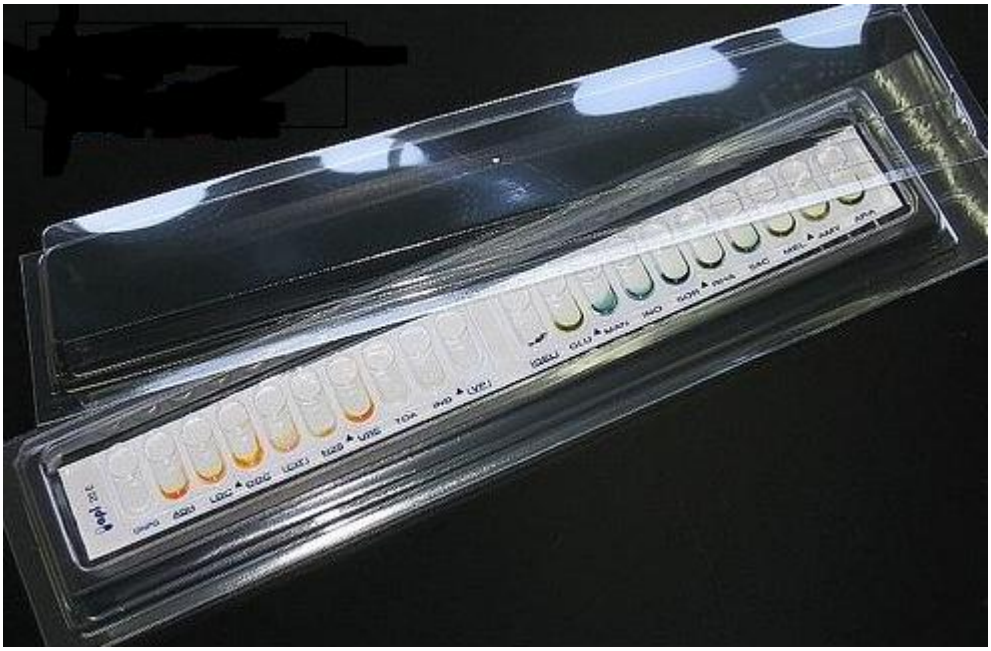
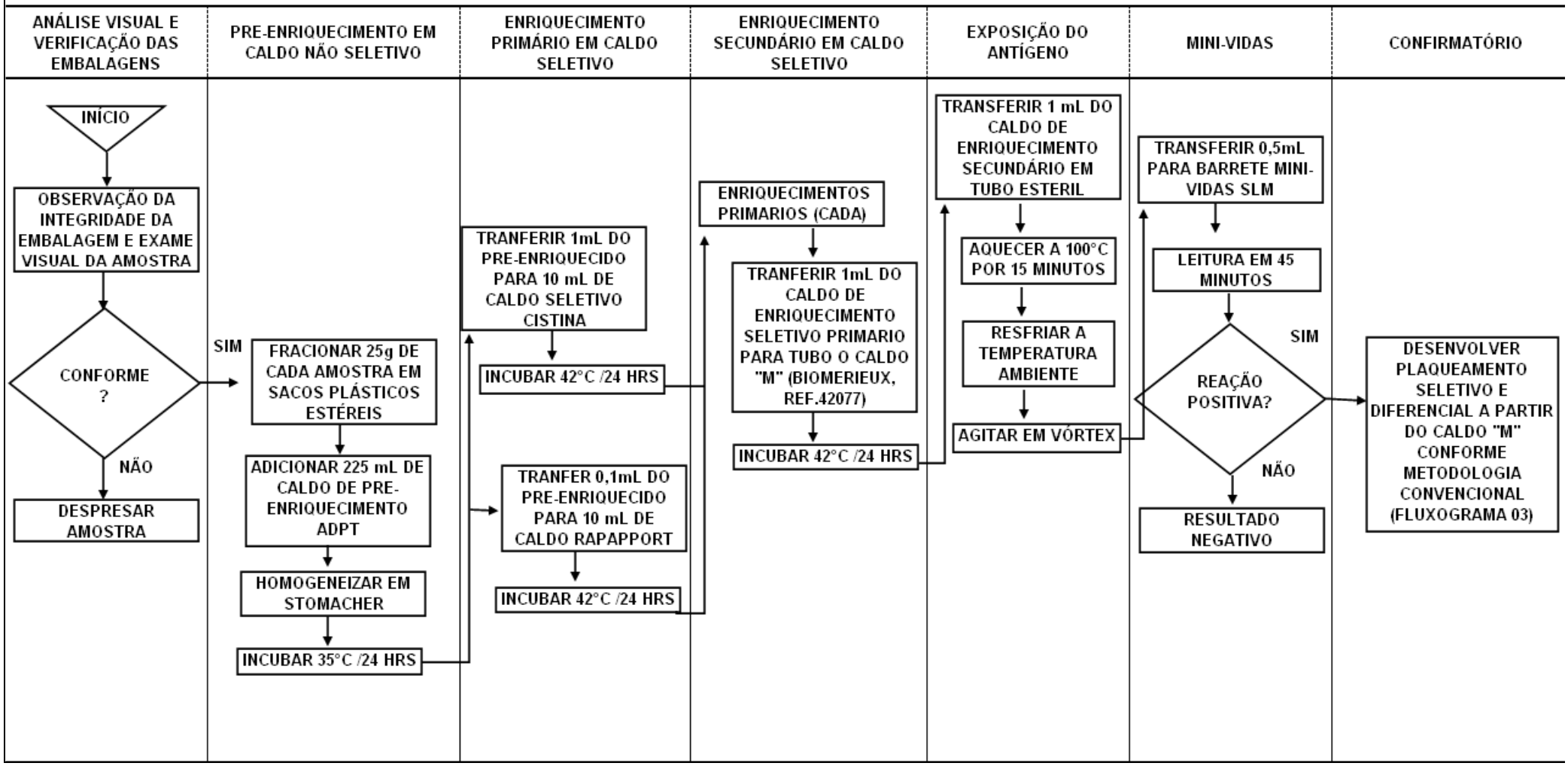


FIGURA 12 FLUXOGRAMA DE IDENTIFICAÇÃO DE *Salmonella* sp PELO MÉTODO MINI-VIDAS

FLUXOGRAMA 04: DETECÇÃO DE *Salmonella sp.* PELO MÉTODO RÁPIDO MINI-VIDAS



4.2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Para a análise de concordância entre resultados positivos e negativos na comparação do método ISO em relação aos ágares clássicos (PALCAM e Oxford) e cromogênicos (CM1080 e CM1084) para pesquisa de *Listeria* sp em lingüiça resfriada, foi calculada a porcentagem global de concordância, que é a porcentagem de diagnósticos positivos e negativos em concordância com as duas avaliações concordância positiva e também descrita como concordância positivo/positivo considerou-se o número de resultados positivos para os dois métodos.

Concordância negativa, também chamada de concordância negativo/negativo, foi considerada pelo número de resultados negativos nos dois métodos. Discordância positiva ou também chamada discordância positivo/negativo apresentou-se por meio do número de resultados positivos observados pelo padrão comparativo e negativos para o analisado.

Discordância negativa ou também chamada discordância negativo/positivo foi considerado o número de resultados negativos identificados no padrão de comparação e positivos no método a ser comparado.

Foi também utilizado o teste *kappa* não ponderado para comparação entre duas avaliações. *Kappa* é uma medida de concordância que não requer suposição acerca da classificação correta e que inclui uma correção para as concordâncias que seriam devidas apenas ao acaso. *Kappa* varia de -1 a +1. O valor de *kappa* +1 indica concordância perfeita.

Pode se considerar uma condição como concordante quando os valores de concordância ficam acima de +0,75, enquanto que valores abaixo de +0,40 representam concordância ruim. Os valores entre +0,40 e +0,75 representam concordância aceitável pouca ou boa. Um valor de *kappa* negativo seria indicativo de discordância sistemática. O valor zero representa concordância casual (JEKEL *et al*, 1999).

Levando-se em conta os métodos convencionais considerados como padrão de comparação, para as observações positivas e negativas para pesquisa de *Listeria* sp e *Salmonella* sp em lingüiça resfriada, foram calculadas as estimativas de sensibilidade, especificidade, prevalência, taxa de erro falso positivo e taxa de erro falso negativo.

A sensibilidade (S) de um método está relacionada com a sua capacidade de um método de não apresentar resultados falso-negativos (FN) e, a especificidade (E), com sua capacidade de não apresentar resultados falso-positivos (FP).

Neste experimento foram considerados verdadeiros positivos, os resultados identificados como *Listeria* ou *Salmonella*, em ambas as metodologias. Foram considerados falso-negativos quando o método analisado apresentou resultado negativo em relação ao resultado positivo do método padrão. No entanto, falso positivo considerou-se quando as amostras do método analisado apresentadas como positivas, não foram confirmadas através do método padrão como *Listeria* sp ou *Salmonella* sp.

Sensibilidade e especificidade dos métodos foram avaliadas pela equação de BEUMER *et al*., (1991).

Todos os cálculos estatísticos foram efetuados utilizando-se a planilha eletrônica Excel (Microsoft®), com programação apropriada.

4.2.5 MÉTODO EMPREGADO PARA AVALIAÇÃO DOS MEIOS SELETIVOS DE *Listeria* sp PELO MÉTODO ISO 11.290-1

Considerando o terceiro passo da metodologia ISO 11290-1 para identificação de *Listeria* sp, este descrito como plaqueamento seletivo, consiste no processo de isolamento da bactéria, onde, no presente estudo desenvolveu-se avaliação com quatro ágares disponíveis comercialmente, sendo estes:

- Ágar Palcam suplementado;
- Ágar Oxford seletivo para Listeria suplementado;
- Ágar Listeria Cromogênico CM 1080 (Oxoid) suplementado;
- Ágar Listeria Cromogênico CM 1084 (Oxoid) suplementado.

Para a avaliação dos resultados expressos pelos quatro ágares analisados, optou-se por dividi-los conforme suas características. A análise comparativa desenvolveu-se por dois grupos: os ágares cromogênicos (CM 1080 e CM 1084) e os ágares clássicos (PALCAM e Oxford). Realizou-se análise de concordância entre resultados positivos e negativos na comparação do método ISO em relação aos ágares clássicos e cromogênicos para pesquisa de *Listeria* sp em lingüiça resfriada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OCORRÊNCIA DE *Listeria* sp e *Salmonella* sp EM LINGÜIÇA RESFRIADA

Considerando as duas metodologias de análise, das 51 amostras analisadas, a ocorrência de *Listeria* sp em lingüiça resfriada foi de 52,9% (Figura 13), sendo que destas, 13,7% corresponderam à ocorrência de *L. monocytogenes,* enquanto que, *L. grayi* foi descrita em 19,7% das amostras analisadas e *L. innocua* e *L. welshimeri,* foram identificadas, 13,7% e 5,9% dos casos respectivamente (Figura 13). A presença de *Salmonella* sp foi registrada em 3,9% das amostras pesquisadas (Figura 14).

Os resultados acima descritos correspondem a amostras verdadeiramente positivas, ou seja, as amostras que apresentaram-se positivas para ambos os métodos analisados e confirmadas as espécies pelo sistema API.

Os dados respectivos aos métodos empregados para identificação de *Listeria* sp e *Salmonella* sp estão tabulados nos anexos 2 e 3 respectivamente.

FIGURA 13 OCORRÊNCIA DE AMOSTRAS POSITIVAS E NEGATIVAS PARA *Listeria* sp EM LINGÜIÇA RESFRIADA

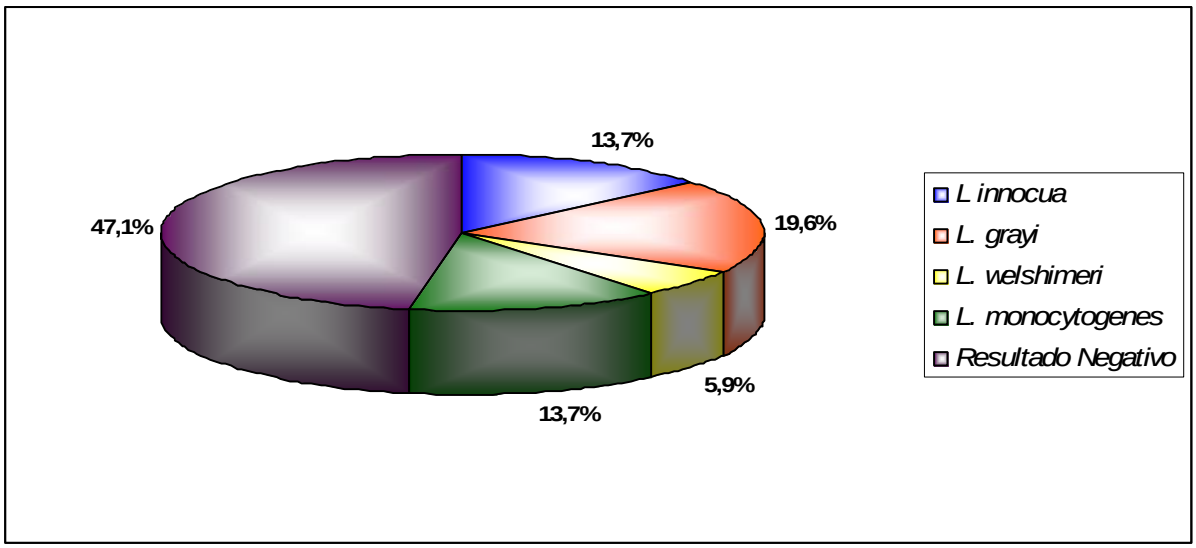
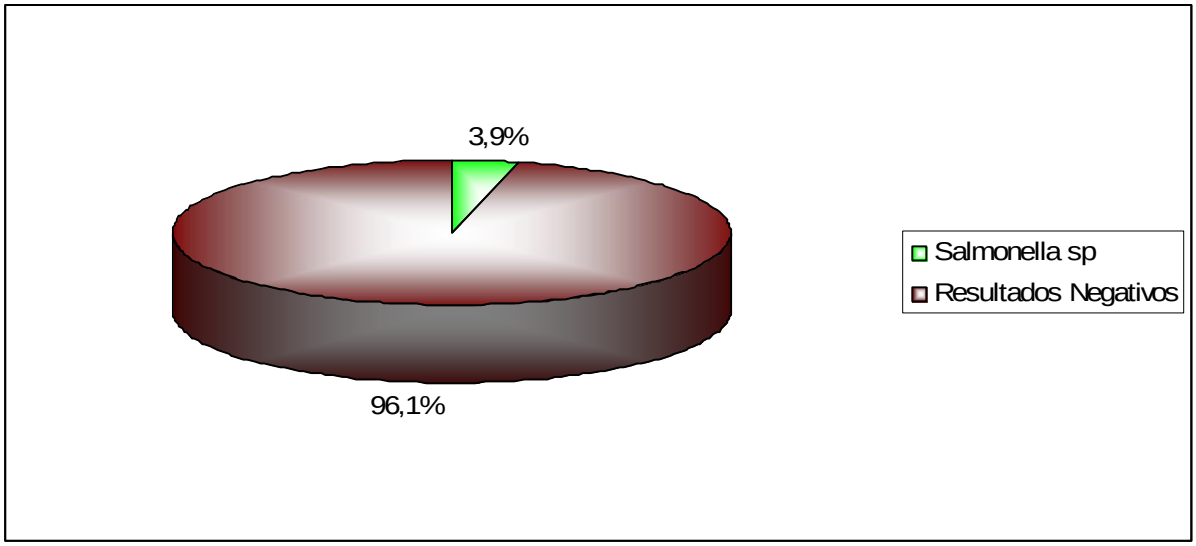


FIGURA 14 OCORRÊNCIA DE AMOSTRAS VERDADEIRAMENTE POSITIVAS PARA *Salmonella* sp EM LINGÜIÇA RESFRIADA



Os resultados obtidos em pesquisas, no Brasil, quanto à presença de *Salmonella* sp em produtos cárneos, são bastante variados. Sousa *et al*., 2000, avaliando a qualidade microbiológica de trinta amostras de carne bovina moída *in natura* do município de Macapá-AP, não detectaram a presença da bactéria. Por outro lado, Reis *et al*. (1995) avaliaram cinqüenta amostras de produtos cárneos comercializados no município de Cuiabá-MT, e isolaram *Salmonella* sp em 26,0% das amostras. Em trabalho semelhante, Magnani *et al*. (2000) analisaram um total de cinqüenta amostras de carne suína e cinqüenta amostras de salame colonial e revelaram a presença de *Salmonella* sp em 6,0% em ambas as amostras.Trindade *et al.* (2004) isolaram *Salmonella* sp em 7,14% das amostras analisadas, sendo que, das amostras positivas, 5,17% foram provenientes de lingüiça de carne suína, 0,71% de lingüiça mista frescal, resultado semelhante ao obtido nessa pesquisa; Trindade e colaboradores (2004) mencionam que das 18 amostras de lingüiças de carne suína analisadas, 3 foram positivas para *Salmonella* sp, o que demonstra que 16,67% dessa categoria de produto apresentava-se imprópria para o consumo.

Por outro lado, Dias (2008) isolou Salmonella sorotipos Typhimurium e Infantis de duas (9,5%) amostras de lingüiça suína e sorotipos Typhimurium, Infantis e Derby de três (13,6%) amostras de lingüiça de frango. No entanto, Malti (2007) não identificou a presença de *Listeria* sp e *Salmonella* sp nas amostras de lingüiça analisadas.

Esteves (2006) relata a positividade de 3% para *Salmonella* sp, das amostras de lingüiça avaliadas, e índice de 8% para a pesquisa de *Listeria* sp, sendo que ambas avaliações utilizaram como forma de detecção, o método ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay), com sistema automatizado multiparamétrico de imunoanálise (VIDAS BioMerrieux), sendo que as amostras positivas foram confirmadas usando galerias bioquímicas API Listeria (BioMerrieux).

Fatos estes bastantes variados, mas que constatam a redução da incidência da *Salmonella* em nosso país, Johnston (1982) avaliam esta redução entre os anos de 1969 e 1979, quanto à incidência de *Salmonella* sp em embutidos frescais. No presente estudo, foram isoladas 162 das 566 (28,6%) amostras analisadas. Para as amostras analisadas em 1979, 74 das 603 amostras (12,4%) foram positivas para *Salmonela* sp. A redução de 16,2% em 1979 indica uma redução na incidência de *Salmonella* nos produtos analisados, fato este constatado pelas legislações e inspeções que tiveram início nos anos acima descritos.

Estudos realizados no Brasil demonstram que a presença de *L. monocytogenes* em alimentos cárneos é freqüente. Silva *et al*. (2004) estudando plantas industriais do processamento de lingüiças mistas do tipo frescal, na região de Pelotas-RS, observou *Listeria* sp em 100% das amostras analisadas, sendo 29,3% caracterizada com *Listeria monocytogenes*. Lima, Rossini e Popermayer (2003) verificaram a ocorrência de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos, através da análise de 106 amostras de cinco tipos diferentes de lingüiça (de carne suína, de carne de frango, tipo calabresa, tipo mista, e tipo toscana). A presença de *Listeria* sp foi evidenciada em 62 amostras (58,5%), e *L. monocytogenes* em 11 amostras (10,4%), resultado este similar ao encontrado na presente pesquisa.

A presença de *Listeria monocytogenes* em aproximadamente 13,7% das amostras examinadas é bastante preocupante principalmente por ser a lingüiça um produto de amplo consumo em nosso país. Sendo as lingüiças mistas do tipo frescal, alimentos intensamente manipulados, são freqüentemente responsáveis pela veiculação de enfermidades transmitidas por alimentos. Esta contaminação pode ser procedente da matéria-prima, ou decorrente de contaminação pós-processamento.

Rocourt e Cossart (1997) relataram dados que explicam a procedência de tal contaminação, demonstrando desta forma que entre 11 e 52% dos animais abatidos nos diversos países eram portadores de *L. monocytogenes*, e a contaminação da

carcaça poderia ocorrer pelo contato do conteúdo gastrointestinal com o músculo durante o abate. Portanto, as condições higiênicas na obtenção da carne bovina, suína, etc., poderão determinar uma maior ou menor contaminação inicial que interferirá na qualidade do produto final.

Segundo Barreto (2006) o maior risco de contaminação tanto de *Listeria monocytogenes* como de *Salmonella* sp provém da contaminação pós processamento depois da cocção, quando não observados os cuidados necessários, no que se refere à manipulação de alimentos crus e mal cozidos, como é o caso de leite e produtos lácteos (queijos brancos), ovos, sorvetes, hortaliças (adubadas com fezes de animais), mariscos, mexilhões, carnes e produtos cárneos (fiambre, salsicha, embutidos de carne de porco) e, ainda, dos próprios manipuladores de alimentos, onde os instrumento de corte ou o recipiente de acondicionamento, os quais foram utilizados no alimento cru, possivelmente passam por processos inadequados de higienização, favorecendo a contaminação o produto cozido. Contudo, a preocupação é intensificada quando observamos dados obtidos pelo estudo de Mattick (2002) que verificou a ocorrência de *Salmonella* sp em salsichas mesmo após a processo de cozimento.

Trabalhos relatados na literatura (McEVOY *et al***.** (1998), WALSH *et al***.** (1998), LACIAR E CENTORBI, (2002), que citam como mais comumente encontrada, tanto em alimentos, quanto em amostras ambientais, *L. monocytogenes* foi isolada em 7,7%, 30,8% e 46,7% das amostras, nos frigoríficos A, B e C, respectivamente. Já *L. welshimeri* foi isolada em 23,1% no frigorífico A, 15,4% no B e 33,3% no C. A presença de *L. innocua* foi significativamente superior (p= 0,05) que a de *L. monocytogenes* e de *L. welshimeri,* não havendo diferença significativa entre os dois últimos microrganismos em relação à ocorrência nos frigoríficos analisados.

Tais índices podem ser explicáveis pela lingüiça do tipo frescal ser um produto de origem animal que apresenta alta atividade de água, ser intensamente manipulado e não ser submetido a tratamento térmico.

Conforme observado nas diferentes pesquisas realizadas com *L. monocytogenes* em lingüiças, os percentuais de isolamento foram bastante elevados, condizendo desta forma com um alto risco a saúde pública brasileira.

São descritas na Tabela 02 os dados obtidos na identificação de *Salmonella* sp e *Listeria* sp. Em avaliação comparativa entre os métodos empregados para identificação de *Salmonella* sp observamos 06 amostras verdadeiramente positivas e 05 amostras que apresentaram-se positivas somente pelo método mini-VIDAS. Quando avaliado a pesquisa de *Listeria* sp observa-se que 31 amostras foram verdadeiramente positivas e uma amostra foi positiva somente para o método mini-VIDAS, e uma amostra foi positiva para o método ISO.

Conforme mostra na Tabela 03, pode se detectar *Salmonella* sp pelo método mini-VIDAS em 11 amostras (21,6%), 40 (78,4%) das amostras foram negativas. Contudo, através do método BAM encontrou-se 06 (11,8%) amostras positivas, 45 (88,2%) amostras negativas.

No entanto, a Tabela 04 descreve os dados obtidos na identificação de *Listeria* sp, ambos os métodos apresentaram 32 (62,7%) de amostras positivas, 19 (37,3%) amostras negativas.

TABELA 02 OCORRÊNCIA DE *Listeria* sp E *Salmonella* sp ATRAVÉS DO MÉTODO RÁPIDO, E MÉTODO CONVENCIONAL EM LINGÜIÇA RESFRIADA

Pesquisa:	Amostras exclusivamente positivas pelo método mini-VIDAS	Amostras exclusivamente pelo positivas método convencional	Amostras positivas método mini-VIDAS e convencional
Salmonella sp	05	00	06
Listeria sp	01	01	31

TABELA 03 AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS DADOS OBTIDOS NA DETECÇÃO DE *Salmonella* sp ATRAVÉS DO MÉTODO BAM E MÉTODO MINI-VIDAS

Resultados:	Método BAM	Método mini-VIDAS
Positivos	6	11
Negativos	45	40

TABELA 04 AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS DADOS OBTIDOS NA DETECÇÃO DE *Listeria* sp ATRAVÉS DO MÉTODO ISO E MÉTODO MINI-VIDAS

Resultado:	Método ISO	Método mini-VIDAS
Positivo	32	32
Negativo	19	19

Das 51 amostras analisadas através do método mini-VIDAS, 12 (23,5%) foram identificadas como *Listeria grayi*, 10 (19,6%) como *Listeria innocua,* 7 (13,7%) como *Listeria monocytogenes* e 3 (5,9%) *Listeria welshimeri.* Pelo método ISO, identificaram-se 11 (21,6%) *Listeria grayi*, 7 (13,7%) *Listeria innocua*, 7 (13,7%) *Listeria monocytogenes* e 3 (5,9%) *L. welshimeri* (TABELA 05). Pode-se observar que *Listeria grayi* predominou em ambos os métodos de análise com valores de 23,5% e 21,6%, respectivamente, e que *Listeria monocytogenes* demonstrou resultados expressivos, sendo constatado 13,7% de positividade em ambos os métodos.

TABELA 05 PERCENTUAL DE ESPÉCIES DE *Listeria* sp DETECTADAS ATRAVÉS DA METODOLOGIA MINI-VIDAS E METODOLOGIA ISO

Resultado:	Método ISO	Resultado	Método mini-VIDAS
L. innocua	10 (19,6%)	*L. innocua*	7 (13,7%)
L. grayi	12 (23,5%)	*L. grayi*	11 (21,6%)
L. welshimeri	3 (5,9%)	*L. welshimeri*	3 (5,9%)
L. monocytogenes	7 (13,7%)	*L. monocytogenes*	7 (13,7%)

Resultado semelhante ao encontrado foi descrito por Comir (1992) onde das 490 amostras de produtos à base de carne avaliados, 241(49,1%) estavam contaminadas por *Listeria* sp*,* 65 (13,2%) das amostras apresentaram se contaminadas por *L. monocytogenes*, 176 (35,9%) por outras *Listeria* tais como *L. innocua, L. grayi e L. welshimeri.*

Estes resultados podem não apresentar efetivamente proporção de organismos presentes nas amostras uma vez que, o crescimento de *Listeria monocytogenes* é cultivada em meio de enriquecimento seletivo e meio não seletivo (DUTH E SCHAFFNER, 1993; PETRAN E SWANSON, 1993).

Além disso, segundo Johnson e Lattuada (1993), as espécies não patogênicas de *Listeria* são comumente encontradas em produtos de carne e frango, principalmente *Listeria innocua*. Todavia, o fato de isolar apenas espécies não patogênicas de alimentos, não impede *Listeria monocytogenes* de estar presente na amostra, embora não seja detectada (PETRAN; SWANSON, 1993), o que pode ser comprovado pelo estudo realizado por Cassolari *et al.* (1994), que detectaram dentre

as espécies encontradas, 47% de *Listeria innocua* e 16% de *Listeria monocytogenes*.

Apesar de existir esta variação em função da técnica e local de pesquisa, a ocorrência de 53,9% de *Listeria* sp nas lingüiças resfriadas comercializadas no estado do Paraná, os dados sugerem falta de controle sobre este microrganismo na indústria, bem como, falhas durante o processo de comercialização. Estes problemas podem aumentar o risco de listeriose, agravado ainda mais pelo crescente consumo de lingüiça resfriada.

A presença de *Salmonella* sp foi registrada em 3,9%, sendo que estas correspondem ao grupo das amostras verdadeiramente positivas, ou seja, as amostras que se apresenta positivas para ambos os métodos analisados e que possuem correspondência na análise confirmatória registrada pelo método API. No entanto, a avaliação da positividade do "suposto" grupo de *Salmonella* sp para os métodos mini-VIDAS, e metodologia clássica BAM, apresentou respectivamente a positividade de 21,6% e 11,8% (TABELA 03).

Das 51 amostras analisadas pelo método mini-VIDAS, *Proteus* sp e *Salmonella* sp demonstraram maior expressividade ambos com 5 (9,8%) amostras positivas cada, também foi relatado a presença de amostra única de *Citrobacter* sp, com incidência de 2,0% (TABELA 06).

TABELA 06 PERCENTUAL DA FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEAE DETECTADO ATRAVÉS DA METODOLOGIA MINI-VIDAS E METODOLOGIA BAM

Pesquisa:	Método BAM	Método mini-VIDAS
Salmonella sp	5 (9,8%)	5 (9.8%)
Proteus sp	1(2,0%)	5 (9.8%)
Citrobacter sp	0 (0,0%)	1 (2,0%)

No entanto, a metodologia BAM demonstrou uma maior correlação com a identificação do patógeno *Salmonella* sp, com incidência de 9,8%, e um único caso relatado de *Proteus* sp*,* o que corresponde a 2,0%.

De acordo com os dados obtidos foi possível verificar que a metodologia mini-VIDAS empregada para a triagem do grupo *Salmonella*, demonstrou-se eficaz para a detecção do seu patógeno alvo, no entanto, foi observada desvantagem na

utilização desta metodologia pelo reconhecimento de outras bactérias, pertencentes estas à família *Enterobacteriaceae*.

Oktay e Heperkan (2006), avaliando manteiga, batata cozida, e queijo verificaram a presença de *Salmonella* sp, pela metodologia clássica e metodologia mini-VIDAS *Salmonella*, e encontraram resultado similar, em que o microorganismo *Salmonella* não foi observado em nenhuma das amostras, no entanto, outros membros da família *Enterobacteriaceae* foram isolados. No mesmo estudo, Oktay e Heperkan (2006), desenvolveram um experimento de inoculação com *Salmonella* Typhi utilizando as mesmas amostras e como resultado não encontraram nenhuma diferença na eficiência da metodologia clássica e mini-VIDAS no que diz respeito à identificação de *Salmonella*.

Poelma *et al.* (1976), descreveram em seu estudo a eficácia da metodologia confirmatória do sistema API E20. O trabalho consistiu na avaliação de 110 culturas de *Salmonella* sp para cinco metodologias comercialmente disponíveis sugeridas para bioquímicamente diferenciar os membros da família Enterobacteriaceae. A média global correspondente para todos os testes bioquímicos ou substratos avaliados dentro de cada sistema foi a seguinte: API, 99%; Enterotube, 99%; Minitek, 99%; PathoTec, 97%; e R / B, 96%. Demonstrando desta forma, a eficiência do sistema API, na detecção de *Salmonella* sp*,* mesmo quando pesquisado todos os membros da família *Enterobacteriaceae*.

Lepper (2002) desenvolveu estudo similar comparando o sistema VIDAS *Salmonella* com a cultura clássica BAM, em 6 tipos de produtos: chocolate ao leite, leite em pó, ovo desidratado, farinha de soja, pimenta preta e “terra crua”. O pesquisador observou que os 2 métodos foram concordantes para 1266 das 1440 amostras analisadas.

Blackburn (2008) promoveu a detecção de *Salmonella* sp utilizando o sistema mini-VIDAS que foi comparado com um método convencional para a detecção de *Salmonella* em 141 amostras de alimentos contaminadas artificialmente e naturalmente. Como resultado houve um acordo global de 92,9% entre os métodos.

5.2 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS MÉTODOS ANALISADOS

A análise comparativa entre o método mini-VIDAS Salmonella e o método convencional BAM, considerando-se este como padrão para identificação de *Salmonella* sp*,* esta descrita nas Tabelas 07 e 08.

TABELA 07 RESULTADOS POSITIVOS E NEGATIVOS NA COMPARAÇÃO ENTRE O MÉTODO MINI-VIDAS E MÉTODO CONVENCIONAL BAM (PADRÃO) PARA PESQUISA DE *Salmonella* sp EM LINGÜIÇA RESFRIADA

Diagnóstico	*Salmonella* sp
Verdadeiro positivo	6
Verdadeiro negativo	40
Falso positivo	5
Falso negativo	0
Total	51

TABELA 08 TESTE DE EXATIDÃO ENTRE O MÉTODO MINI-VIDAS E MÉTODO CONVENCIONAL BAM (PADRÃO) PARA PESQUISA DE *Salmonella* sp EM LINGÜIÇA RESFRIADA

Teste de exatidão	*Salmonella* sp
Sensibilidade (S)	100%
Especificidade (E)	88,89%
Prevalência (P)	11,76%
Taxa de erro falso positivo (TEFP)	11,11%
Taxa de erro falso negativo (TEFN)	0,00%

A prevalência de *Salmonella* sp foi de 11,76%, sendo esta calculada pela razão entre os resultados totais positivos do padrão, e os resultados totais. O método mini-VIDAS comparado com o método BAM para identificação de *Salmonella* sp produziu uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 88,89%. A sensibilidade do presente trabalho condiz com a ausência de resultados falso-negativos, no entanto a especificidade relaciona-se diretamente aos 5 resultados falso-positivos. Condizendo desta forma, a taxa de falso-positivo expressa em 11,11%.

Os dados apresentados demonstram a eficácia do método mini-VIDAS, quando comparado do método BAM.

Moro (2006) descreve em seu experimento dados muitos similares aos encontrados quando avaliou-se a sensibilidade e especificidade do método mini-VIDAS comparado ao convencional. Em seu experimento Moro (2006), descreve uma avaliação comparativa entre as seguintes metodologias: mini-VIDAS, imuno-concentração e imunoensaio para *Salmonella*, filtro baseado em PCR, e metodologia convencional para identificação de *Salmonella* sp (SM ID) precedida por uma etapa de pré-enriquecimento, estas foram avaliadas em lingüiças para a presença de *Salmonella* sp*.* Cada método foi então comparado quanto a sua capacidade para detectar *Salmonella* artificialmente. *Salmonella* foi isolada em 68 amostras das amostras cultivadas em SM ID e testes foram positivos para Salmonella usando filtro à base de PCR e VIDAS, resultando em positividade de 77 e 65 amostras, respectivamente. Usando SM ID como o método de referência, a especificidade e sensibilidade foram 97% e 94% e 73% e 98,5% para VIDAS e PCR, respectivamente.

Estudo semelhante ao descrito por Moro, 2006, foi desenvolvido por Uyttendaele *et al.*, 2003, em que amostras contaminadas artificialmente (carne de ave e carne bovina) foram submetidas ao frio e ao congelamento absoluto; 120 amostras naturalmente contaminadas foram testadas para *Salmonella* sp usando o diagnóstico semi-sólido (DIASALM), o ensaio VIDAS e iQ Check-PCR após 24 horas de enriquecimento em água peptonada tamponada. Tanto o iQ Check-PCR como ensaio VIDAS apresentaram-se como um excelente método rápido e de triagem para detecção de *Salmonella* sp*.* O acordo com o percentual DIASALM o método foi correspondente respectivamente em 92% para o iQ-Check PCR e 95% para o método VIDAS.

Uma avaliação comparativa entre isolamento convencional, imunoensaio e reação em cadeia da polimerase (PCR), para *Salmonella* sp foi desenvolvido por Rückert *et al.*, (2007). A freqüência de isolamento de *Salmonella* sp entre as metodologias foi avaliada considerando a sua aplicabilidade como ferramentas para o acompanhamento programas de controle da qualidade, como a análise de pontos críticos de controle (HACCP). Como resultado pode se observar que além de serem mais sensíveis e específicos, imunoensaios e PCR foram mais rápidos e mais práticos na detecção de *Salmonella* sp, quando comparados à metodologia convencional.

No entanto, o estudo realizado por Elizaquível *et al.* (2008) demonstrou discrepância com os resultados obtidos no presente trabalho, o estudo desse autor avaliou em tempo real com utilização do método de reação em cadeia polimerase (RTI-PCR), e o mini-VIDAS *Salmonella* comparando os resultados obtidos com a metodologia convencional para a detecção de *Salmonella* sp em alimentos prontos para consumo, como resultado o sistema mini-VIDAS demonstrou sensibilidade de 14,29%, especificidade de 94.34%, enquanto que o método RTI-PCR apresentou sensibilidade de 80%, e especificidade de 100%, desta forma o método RTI-PCR destacou-se como um método de detecção para *Salmonella* sp em relação ao sistema mini-VIDAS.

A análise comparativa entre o método mini-VIDAS *Listeria* e método convencional ISO, considerando-se este como padrão, para identificação de *Listeria* sp*,* está descrita nas Tabelas 09 e 10.

TABELA 09 RESULTADOS POSITIVOS E NEGATIVOS NA COMPARAÇÃO ENTRE O MÉTODO MINI-VIDAS E MÉTODO CONVENCIONAL ISO (PADRÃO) PARA PESQUISA DE *Listeria* sp EM LINGÜIÇA RESFRIADA

Diagnóstico	*Listeria* sp
Verdadeiro positivo	31
Verdadeiro negativo	18
Falso positivo	1
Falso negativo	1
Total	51

TABELA 10 TESTE DE EXATIDÃO ENTRE O MÉTODO MINI-VIDAS E MÉTODO CONVENCIONAL ISO (PADRÃO) PARA PESQUISA DE *Listeria* sp EM LINGÜIÇA RESFRIADA

Teste de exatidão	*Listeria* sp
Sensibilidade (S)	96,80%
Especificidade (E)	94,70%
Prevalência (P)	62,74%
Taxa de erro falso positivo (TEFP)	5,26%
Taxa de erro falso negativo (TEFN)	3,12%

A prevalência de *Listeria* sp foi de 62,74%. O método mini-VIDAS comparado com o método ISO para identificação de *Listeria* sp produziu uma sensibilidade de

96,7% e uma especificidade de 94,70%. A sensibilidade do presente trabalho produziu um 1 resultado falso-negativo, e a especificidade relaciona-se diretamente a 1 resultado falso-positivo. Condizendo desta forma, a taxa de falso-negativo expressa em 3,12% e a taxa de falso-positivo em 5,26%.

Os dados descritos pela análise comparativa entre os método mini-VIDAS e o método ISO apresentaram-se como métodos muito similares, sendo estes excelentes métodos de detecção para *Listeria* sp.

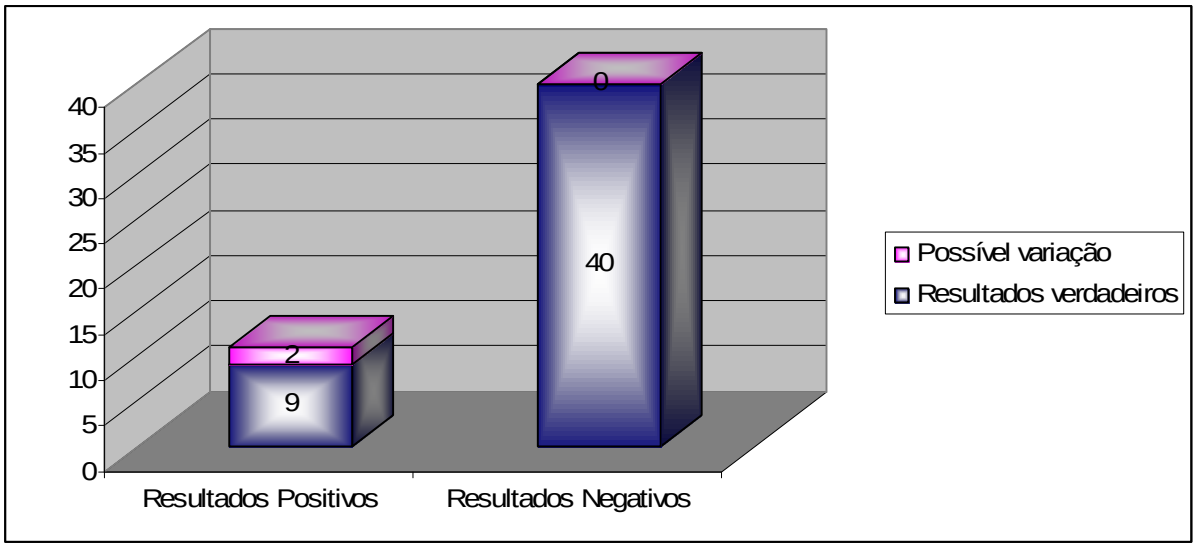
O método mini-VIDAS quando comparado ao método ISO, considerado com padrão, demonstrou que é capaz de identificar concentrações muito baixas dos microrganismos viáveis na amostra. Cabe ressaltar que nem sempre uma amostra positiva para *Listeria* sp é patogênica, fazendo parte deste grupo somente a *Listeria monocytogenes* que corresponde à incidência de somente 13,7% dos 53,9% do total de amostras positivas para *Listeria* sp.

Oktay e Heperkan (2006) desenvolveram estudo muito similar ao presente trabalho, no entanto, envolveram a avaliação de queijo e manteiga e as batatas cozidas. Todas foram examinadas para a presença de *Listeria monocytogenes* com método descrito pela Organização Internacional de Normalização (ISO) 11290, e mini-VIDAS. *L. monocytogenes* não foi encontrada nas amostras de manteiga e batata cozida, ao passo que foram identificadas em três amostras do queijo, sendo que, mini-VIDAS foi determinado por ser muito eficiente na identificação de *L. monocytogenes* em amostras com baixa contagem bacteriana.

Por meio dos dados obtidos na análise de exatidão pode-se desenvolver uma avaliação mais precisa dos dados obtidos. A avaliação desenvolveu-se pela análise de exatidão baseando-se na avaliação comparativa entre as metodologias convencionais (BAM e ISO) e metodologias rápidas (mini-VIDAS *Salmonella* e mini-VIDAS *Listeria*), tendo como padrão a ser comparado o método convencional.

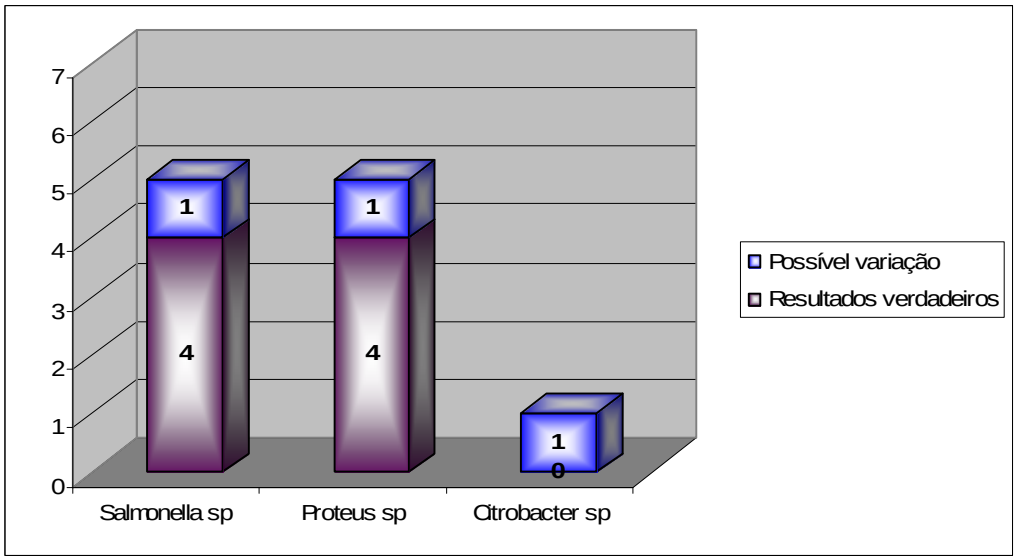
Os dados obtidos estão descritos nas figuras 15,16,17,e 18.

FIGURA 15 ANÁLISE DO MÉTODO MINI-VIDAS SALMONELLA AVALIANDO POSSÍVEIS VARIAÇÕES



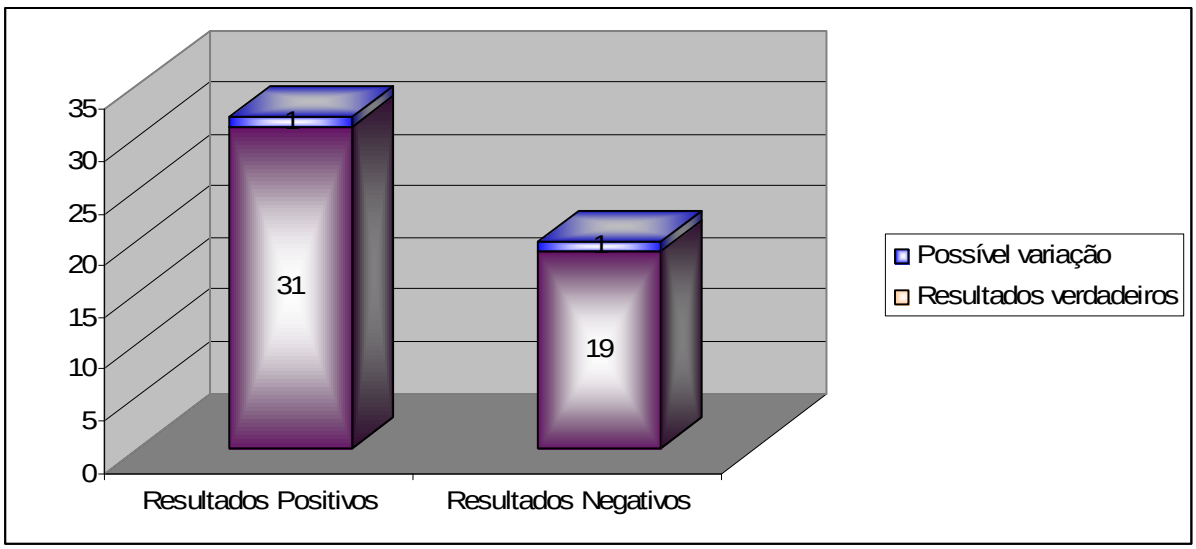
Avaliando os resultados obtidos na identificação de *Salmonella* sp pelo método mini-VIDAS comparado ao método BAM, observamos que a sensibilidade foi de 100%, correspondendo, desta forma, que as 40 amostras analisadas foram realmente negativas, no entanto, a especificidade de 88%, corresponde que das 11 amostras positivas, 22% possivelmente seriam falso-positivas, ou seja, 2 amostras, como demonstrado na figura 15.

FIGURA 16 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DO MÉTODO MINI-VIDAS SALMONELLA PARA IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES AVALIANDO POSSÍVEIS VARIAÇÕES



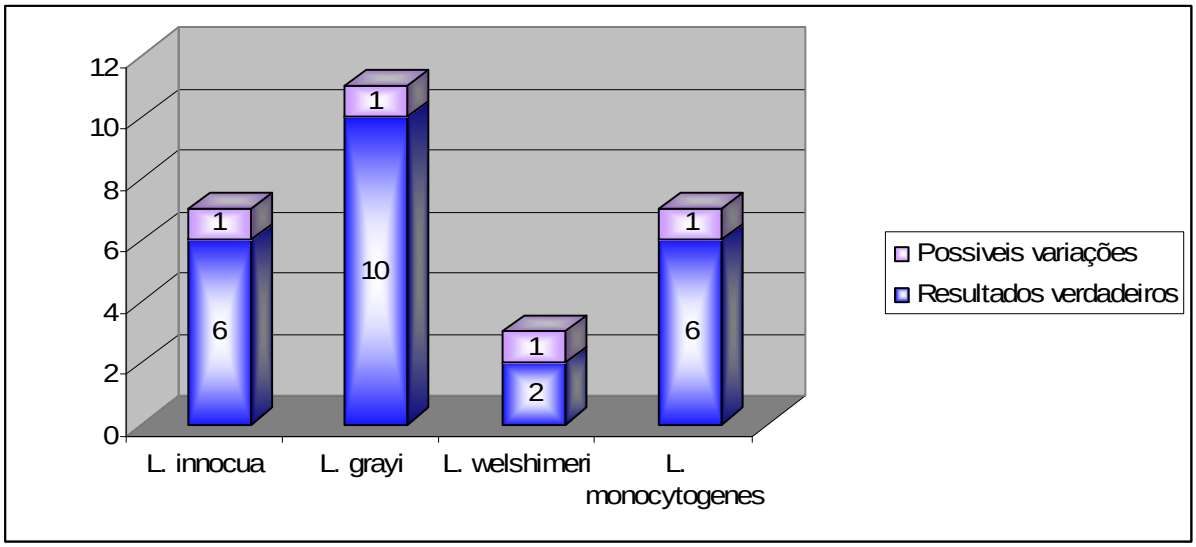
A figura 16 descreve a comparação de espécie, bem como, variações obtidas pelo método mini-VIDAS *Salmonella*. Observa-se na avaliação da *Salmonella* sp e *Proteus* sp*,* ambas apresentaram 5 amostras positivas, onde possivelmente 1 amostra seria falso-positiva, *Citrobacter* sp apresentou 1 amostra positiva, no entanto pela avaliação de especificidade possivelmente esta amostra seria falso-positiva.

FIGURA 17 ANÁLISE DO MÉTODO MINI-VIDAS LISTERIA AVALIANDO POSSÍVEIS VARIAÇÕES



Avaliando os resultados obtidos na identificação de *Listeria* sp pelo método mini-VIDAS comparado ao método ISO, observa-se que a sensibilidade foi de 96,8%, das 19 amostras negativas, destas 3,2% possivelmente seriam falso-negativas, correspondendo a aproximadamente 1 amostra. Contudo a especificidade da metodologia foi de 94,7%, sendo que das 31 amostras positivas, 5,3% poderiam ser consideradas falso-positivas, condizendo a aproximadamente 1 amostra, como demonstrado na figura 17.

FIGURA 18 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DO MÉTODO MINI-VIDAS LISTERIA AVALIANDO POSSÍVEIS VARIAÇÕES



A figura 18 descreve a comparação de acordo com a espécie, bem como, variações obtidas pelo método mini-VIDAS Listeria. Observamos que das 11 amostras positivas para *L. grayi* possivelmente 1 seria falso-positiva, na avaliação da *L. innocua* e L. *monocytogenes,* ambas apresentaram 7 amostras positivas, onde possivelmente 1 amostra seria falso-positiva, *L. welshimeri* apresentou 3 amostras positivas, onde 1 possivelmente seria falso-positiva.

A análise de exatidão avaliando o sistema mini-VIDAS para ambas as bactérias apresentaram se como excelente metodologia de triagem.

5.3 AVALIAÇÃO DOS MEIOS EMPREGADOS PELO MÉTODO ISO 11290-1 PARA ISOLAMENTO DE *Listeria* sp

A descrição dos meios utilizados para a análise, bem como a forma com a qual se desenvolveu a avaliação estão descritos no item 4.2.5.

A análise comparativa entre os ágares cromogênicos, para identificação de *Listeria* sp*,* está descrita nas Tabelas 11 e 12.

TABELA 11 RESULTADOS POSITIVOS E NEGATIVOS NA COMPARAÇÃO DO MÉTODO ISO EM RELAÇÃO AOS ÁGARES CROMOGÊNICOS PARA PESQUISA DE *Listeria* sp EM LINGÜIÇA RESFRIADA

Diagnóstico	CM1080 Vs. CM1084
concordância positiva	32
discordância positiva	1
discordância negativa	0
concordância negativa	18
Total	51

TABELA 12 TESTE DE CONCORDÂNCIA ENTRE RESULTADOS POSITIVOS E NEGATIVOS NA COMPARAÇÃO DO MÉTODO ISO EM RELAÇÃO AOS ÁGARES CROMOGÊNICOS PARA PESQUISA DE *Listeria* sp EM LINGÜIÇA RESFRIADA

Índices de concordância	CM1080 Vs. CM1084
Perc. global de concordância	98,0%
Kappa	96,0%

Na Tabela 11 observa-se a comparação dos resultados observados nos meios cromogênicos verificando-se concordância positiva de 32 amostras (62,7%) e concordância negativa em 18 amostras (35,3%), condizendo à percentagem global de concordância apresentada na Tabela 12 de 98,0%.

Discordância positiva foi relatada em somente uma amostra correspondendo a 2,0%, e nenhuma discordância negativa foi relatada.

O teste *kappa* foi utilizado como meio de comparação entre os ágares cromogênicos, apresentando concordância em 96,0%, representando uma concordância excelente entres resultados obtidos pelos ágares analisados, ou seja, houve uma forte concordância entre as correlações analisadas.

Apesar de haver algumas diferenças nas composições dos meios analisados, estas não pareceram influenciar nas concordâncias entre os resultados expressos.

TABELA 13 RESULTADOS POSITIVOS E NEGATIVOS NA COMPARAÇÃO DO MÉTODO ISO EM RELAÇÃO AOS ÁGARES CLASSICOS PARA PESQUISA DE *Listeria* sp EM LINGÜIÇA RESFRIADA

Diagnóstico	PALCAM Vs, OXFORD
concordância positiva	34
discordância positiva	4
discordância negativa	1
concordância negativa	12
Total	51

TABELA 14 RESULTADOS POSITIVOS E NEGATIVOS NA TESTE DE CONCORDÂNCIA ENTRE RESULTADOS POSITIVOS E NEGATIVOS NA COMPARAÇÃO DO MÉTODO ISO EM RELAÇÃO AOS ÁGARES CLASSICOS PARA PESQUISA DE *Listeria* sp EM LINGÜIÇA RESFRIADA

Índices de concordância	PALCAM Vs, OXFORD
Perc. global de concordância	90,0%
Kappa	76,0%

A análise comparativa entre os ágares clássicos, para identificação de *Listeria* sp*,* está descrita nas Tabelas 13 e 14.

Na Tabela 13 observa-se a comparação dos resultados dos meios clássicos verificando-se concordância positiva de 34 amostras (66,5%) e concordância negativa em 18 amostras (23,5%), correspondendo à percentagem global de concordância apresentada na Tabela 14 de 90,0%, refletindo com a superior capacidade do ágar PALCAM em identificar concentrações muito baixas de *Listeria* sp quando comparado ao ágar Oxford.

Discordância positiva foi relatada em 4 amostras correspondendo a 7,8%, e a discordância negativa ocorreu em somente uma amostra, representando 2,0%.

O teste *kappa* foi utilizado como meio de comparação entre os ágares clássicos, apresentando concordância em 76,0%, condizendo com uma excelente concordância entre os resultados dos ágares analisados.

A eficácia dos quatro ágares para o isolamento de *L. monocytogenes* a partir de amostras de lingüiça resfriada demonstraram-se satisfatórias.

Gunasinghe (1993), descreveu análise comparativa entre os ágares seletivos para *Listeria* sp, Oxford (Oxoid) e PALCAM (Merck), por meio de estudo de cinqüenta e dois diferentes variedades de salsicha, salame e patê. Sete (13,0%) das amostras foram positivas para *Listeria monocytogenes* e 14 (27,0%) amostras foram positivas para *Listeria* outras espécies, enquanto 31 (59,0%) amostras foram negativas para *Listeria* outras espécies. A eficácia do ágar PALCAM e ágar Oxford para o isolamento de *L. monocytogenes* a partir de amostras de carne foi comparado. PALCAM demonstrou se consistentemente mais eficaz na supressão de outros microrganismos, aumentando assim a possibilidade de detecção de espécies de Listeria presentes em número reduzido. O isolamento de *Listeria* também apresentou se mais fácil usando PALCAM.

Capita (2001), desenvolveu análise comparativa entre os meios PALCAM e Oxford para identificação de *Listeria* sp em retalhos de carne de frango cru. Percentagens de amostras de *Listeria* sp foram significativamente mais elevadas no ágar PALCAM quando comparadas com o ágar Oxford (95,0% e 87,0%), respectivamente. Percentagens mais elevadas de amostras contaminadas com *Listeria monocytogenes* também foram obtidas com ágar PALCAM (31,0%) do que com ágar Oxford (27,0%).

5.4 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE ANÁLISE DOS MÉTODOS

A avaliação descritiva do tempo de análise dispensado para identificação de *Salmonella* sp e *Listeria* sp para os métodos convencionais (BAM e ISO) e métodos rápidos (mini-VIDAS Listeria e mini-VIDAS Salmonella) esta descritas nas Tabelas 15 e 16 respectivamente.

TABELA 15 DESCRIÇÃO DO TEMPO DE ANÁLISE PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Salmonella* sp

		Atividade	Tempo dispensado	Tempo Total
BAM	Resultado Negativo	Pré-enriquecimento em caldo não seletivo	24 horas	72 horas (3 dias)
		Enriquecimento em caldo seletivo	24 horas	
		Plaqueamento seletivo e diferencial	24 horas	
	Resultado Positivo	Atividades envolvendo resultado negativo	72 horas	96 horas (4 dias)
		Cultura em TSI e LIA	24 horas	
Mini-VIDAS Salmonella	Resultado Negativo	Pré-enriquecimento em caldo não seletivo	24 horas	72 horas (3 dias)
		Enriquecimento em caldo seletivo	24 horas	
		Cultura em caldo “M”	24 horas	
	Resultado Positivo	Atividades envolvendo resultado negativo	72 horas	120 horas (5 dias)
		Plaqueamento seletivo e diferencial	24 horas	
		Cultura em TSI e LIA	24 horas	

Comparando o tempo de resposta dos métodos para identificação de *Salmonella* sp (Tabela 15), observou-se que, com a utilização do método mini-VIDAS Salmonella, obteve-se resultados de ausência do microrganismo em 72 horas, mesmo tempo utilizado para identificação pelo método clássico BAM. No entanto, quando se avaliou o tempo para pesquisa com resultado positivo observou-se que o método clássico BAM é mais efetivo comparado ao método mini-VIDAS, pois necessita de 24 horas a menos para obter o mesmo resultado, isto se deve, a dispensação adicional de 24 horas para a cultura do caldo “M”, utilizado no confirmatório do método mini-VIDAS.

TABELA 16 DESCRIÇÃO DO TEMPO DE ANÁLISE PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Listeria* sp

		Atividade	Tempo dispensado	Tempo Total
ISO	Resultado Negativo	• Enriquecimento primário	24 horas	120 horas (5 dias)
		• Enriquecimento secundário	48 horas	
		• Plaqueamento seletivo	48horas	
	Resultado Positivo	• Atividades envolvendo resultado negativo	120 horas	288 horas (12 dias)
		• Cultura em Indol para avaliação da motilidade	168 horas	
Mini-VIDAS Listeria	Resultado Negativo	• Enriquecimento primário	24 horas	48 horas (2 dias)
		• Enriquecimento secundário	24 horas	
	Resultado Positivo	• Atividades envolvendo resultado negativo	48 horas	264 horas (11 dias)
		• Plaqueamento seletivo	48 horas	
		• Cultura em Indol para avaliação da motilidade	168 horas	

Comparando o tempo dispensado para o desenvolvimento das metodologias utilizadas para identificação de *Listeria* sp (Tabela 16), observou-se que, com a utilização do método rápido mini-VIDAS Listeria, obteve-se o resultado de ausência em 48 horas e presença em 264 horas após o inicio da análise, seguida de identificação à nível de espécie através do teste bioquímico API Listeria, totalizando 288 horas.

Todavia, com a utilização do método convencional ISO obtém-se resultados de 120 horas para ausência e 288 horas para presença de *Listeria* sp, e resultados confirmatórios à nível de espécie com 312 horas, através do teste API Listeria. Esta diferença de 72 horas, na identificação de resultados presuntivos pelo método convencional ISO, é devido ao tempo de incubação do enriquecimento secundário que requer 48 horas, e a inclusão de uma terceira etapa, o plaqueamento seletivo, que necessita de 48 horas de incubação.

A diferença entre o tempo de análise dos métodos estudados é de no mínimo 72 horas para ausência de *Listeria* sp; no entanto, como a legislação internacional determina ausência do gênero *Listeria*, o método rápido mini-VIDAS apresenta vantagem após 48 horas do inicio da análise para detectar esse gênero, o que ocorre somente após 120 horas, utilizando o método convencional ISO.

Os métodos de investigação laboratorial para microrganismos patogênicos em alimentos são criticados pelos analistas por serem laboriosos, desta forma o presente trabalho contribui para a introdução de uma metodologia mais rápida (especialmente quando pesquisado o patógeno *Listeria* sp) com a confiabilidade esperada pelos analistas, desenvolvendo desta forma uma nova realidade voltada à precisão de resultados, favorecendo a satisfação do produtor por enviar ao mercado um produto seguro, assegurando vantagens na comercialização, e de forma direta aos consumidores garantindo maior confiabilidade nos produtos a serem consumidos.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Um total de 52,9% das amostras de lingüiça resfriada estavam contaminadas com *Listeria* sp, sendo 13,7% com *L. monocytogenes*, 19,7% com *L. grayi*, 13,7% *L. innocua*, e 5,9% *L. welshimeri*, enquanto que 3,9% das amostras apresentaram-se contaminadas com *Salmonella* sp.

Em avaliação comparativa entre metodologia BAM e mini-VIDAS Salmonella, observou-se que através da metodologia BAM houve uma maior correlação com a identificação de *Salmonella* sp (9,8%), no entanto, a metodologia mini-VIDAS demonstrou maior expressividade na identificação de *Proteus mirabilis* e *Salmonella* sp*,* ambos com 9,8% de positividade.

Em avaliação comparativa entre ISO e mini-VIDAS Listeria, observou-se que *Listeria grayi* predominou em ambos os métodos de análise com valores de 19,6% e 13,7%, respectivamente, e de que a *Listeria monocytogenes* demonstrou resultados expressivos, sendo constatadas em 13,7% em ambas as metodologias.

O método mini-VIDAS comparado com o método BAM para identificação de *Salmonella* sp apresentou uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 88,89%.

O método mini-VIDAS comparado com o método ISO para identificação de *Listeria* sp apresentou uma sensibilidade de 96,7% e uma especificidade de 94,70%.

Por meio da análise de exatidão na identificação de *Salmonella* sp avaliando o método mini-VIDAS Salmonella, constatou-se que as 40 amostras negativas realmente foram negativas, e que das 11 amostras constatadas positivas, possivelmente 2 seriam falso-positivas.

Na identificação de *Listeria* sp pelo método mini-VIDAS Listeria constatou-se, pela análise de exatidão, que das 19 amostras negativas possivelmente 1 seria falso-negativa, e das 31 amostras positivas, possivelmente 1 seria falso-positiva.

Os métodos mini-VIDAS Salmonella e mini-VIDAS Listeria apresentaram-se como excelentes métodos de triagem.

Os ágares cromogênicos (CM1080 e CM1084), foram avaliados entre si, verificando-se, concordância positiva de 62,7% e concordância negativa em 35,3%, condizendo à percentagem global de concordância de 98,0%. Contudo os ágares clássicos (PALCAM e Oxford) também foram avaliados, apresentando concordância

positiva de 66,5%, e concordância negativa de 23,5%. O teste de *kappa* apresentou concordância de 96% e 76% respectivamente, representando uma excelente concordância entres resultados obtidos.

Comparando o tempo de resposta dos métodos para identificação de *Salmonella* sp, observou-se que não existe diferença em resultados de ausência do microrganismo entre os métodos mini-VIDAS Salmonella e BAM. No entanto quando avaliou-se o tempo para pesquisa com resultado positivo observou-se que o método clássico BAM é mais efetivo comparado ao método mini-VIDAS.

Comparando o tempo para identificação de *Listeria* sp observou-se que o método mini-VIDAS apresenta ausência do microrganismo em 72 horas a menos quando comparado ao método ISO. Contudo, quando se avaliou a presença do microrganismo obtém-se resposta em 24 horas a menos, quando se compara o método mini-VIDAS com o método ISO.

A incidência de 53,9% de *Listeria* sp das amostras analisadas, sugere a necessidade de implementar ações de inspeção industrial e fiscalização por órgãos competentes nos produtos produzidos e comercializados por estas empresas, haja visto que uma vez que estes microrganismos adentram as plantas industriais dificilmente seriam eliminadas, além da *L. monocytogenes* representar um serio risco à saúde da população. Igualmente, é preciso alertar as autoridades de saúde e o público em geral para o risco de listeriose, em particular para gestantes, recém-nascidos, imunodeprimidos e idosos que constituem a população mais vulnerável.

A profunda transformação do modo de vida dos países industrializados, marcadamente pela utilização mais freqüente da cadeia de frio, contribui indubitavelmente para um aumento da contaminação dos alimentos por microrganismos psicotróficos. Desta forma, a redução do grau de contaminação de matérias-primas e um programa adequado de higiene e sanitarização, consistem medidas básicas de prevenção na linha de produção dos alimentos.

7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

ABIA - Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos. **Indústria da Alimentação: principais indicadores econômicos**. São Paulo: ABIA. Disponível em: *http://www.abia.gov.br*/ Acesso em: 17 abr.2007.

ABIPECS – Associação Brasileira de Produção e Exportação de Carne Suína. **Participação do Brasil perante a produção mundial de carne**. São Paulo: ABIPECS, 2005. Disponível em: *http://www.abipecs.com.br/foco_45.pdf*. Acesso em: 12 set. 2008.

ABIPECS (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA). **Produção Mundial de Carne Suína**. Disponível em: *http://www.abipecs.org.br/* Acesso em 27 dez. 2008.

ACHA, P.N. & SZYFRES, B. Bacterioses y Micosis. In:__ **Zoonosis y enfermidades transmisbles communes al hombre y a los animales**. 3 ed, parte 1, v.1, Washington: OPS, 2001.

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Microbiología de los alimentos.** Zaragoza: Acribia S.A., p.464,1995.

ALMEIDA, P.F; ALMEIDA, R.C. C.; RODRICK, G.E. **Listeria monocytogenes: importância e distribuição nos alimentos. Higiene Alimentar**, v.17, p.19-23, 1999 a.

ALMEIDA, P. F. **Biossensores para detecção de microrganismos e poluentes ambientais.** Salvador, 2001. (Apostila).

ALMEIDA, P. F.; ALMEIDA, R. C. C.; BARBALHO, T. C. F.; MELO, C. G.; ALMEIDA, A. O.; MAGALÃES, E. R.; OLIVEIRA, I. C.; HOFER, E. **Development of protocols for the bacteriophage amplification assay for rapid, quantitative and sensitive detection of viable Listeria cells.** In: AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 103rd General Meeting Washington. Convention Center May, 18.,2003.Washington, DC. Abstracts.Washington: ASM Press, 2003, 16-17p.

ANON E., **Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health on *Listeria monocytogenes*.** Brussels, Belgium: European Commission. Health and Consumer Protection Directorate-General, 1999.

AOAC INTERNATIONAL (AOAC). *Listeria monocytogenes* – Chapter 15: In **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 16th. ed., PA Cunniff, p. 94a-98. AOAC International, Gaithersburg, MD, 993.12, 1999. Disponível em: http://seafood.ucdavis.edu/HACCP/Compendium/Chapt15.htm. Acesso em: 30 abr. 2008.

BAHK, J.; MARTH, E.H. Listeriosis and Listeria monocytogenes. In: CLIVER DO (ed.), **Foodborne diseases**. 1. ed. Food Institute, WHO, University of Wisconsin Madison, 247-57p., 1990.

BAIRD, R.M., CORRY, J.E.L., CURTIS, G.D.W., MOSSEL, D.A.A., SKOVGAARD, N. Pharmacopeis of culture Media. Additional Monographs. **International Journal of Food Microbiology,** 9. p. 85-144, 1989.

BALBANI, A. P. S. & BUTUGAN, O. Contaminação biológica de alimentos. **Pediatria**, (São Paulo), 23(4): 320- 08, 2001.

BANWART, J. **Basic food microbiology**. 2 ed. New York: Van: Nostransd Reinhold, p.773, 1989.

BANWART, G.J. Glasware apparatus for determining motile bacteria. I. Salmonella**. Poultry Science,** v. 47, p. 1209-1212, 1968.

BARBALHO, T. C. F. de. Listeria em abatedouro de frangos: ocorrência, disseminação e proposição de um método rápido para confirmação e identificação das espécies. 2002. 73 f. **Dissertação (Mestrado em Nutrição**) – Universidade Federal da Bahia, Salvador.

BARBUTI, S.; MERCADANTI, I.; MUTTI, P.; QUINTAVALLA, S. Deteminazione rápida di *Listeria monocytogenes* in prodotti carnei: valutazione del metodo Gene-track®. **Ind. Cons**., Parma, v.75, p.3-11, 2000.

BARRETO, E. DE S. S. **Patógenos emergentes: salmonelose, 2006.** Site: Saúde-Rio- Secretaria Municipal de Saúde. Acesso em: 15 set. 2008.

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. Listeria Zaragoza: Acribia, 1998. 173p.

BELLO-PÉREZ, L.A. Serotipos de Salmonella identificadosen chorizos que se expenden em Acapulco, Guerrero, Mexico, **Revista Latino-Americana de Microbiologia** , n. 35, p. 377-381, 1993.

BENITEZ, L. B. Monitoramento de Pontos Críticos de Controle (PCCs) no Abate de Frangos através de Indicadores Microbiológicos, 2000. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos)-** Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2000.

BENNETT, A.R., GREENWOOD, D., TENNANT, C., BANKS, J.G., BETTS, R.P. Rapid and definitive detection of Salmonella in foods by PCR. **Letters in Applied Microbiology,** v. 26, p. 437-441, 1998.

BERSOT, L.S.; LANDGRAF, M.; FRANCO, D.D.G.; DESTRO, M.T. Production of mortadella: behavior of *L. monocytogenes* during processing and storage conditions. **Meat Science**. v. 57, p.19-26, 2001

BEUCHAT, L.R. *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. **Food Control**,Letchworth, v.7, n.4/5, p.223-228, 1996b.

BEUMER, R.R.; BRINKMAN, E.; ROMBOUTS, F.M. Enzyme-linked immunoassays for the detection of *Salmonella* sp: a comparison with other methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v112, p.363-374, 1991.

BILLE, J. Epidemiology of human listeriosis in Europe with special reference to the Swiss outbreak. In: MILLER, A.J.; SMITH, J.L.; SOMKUTI, G.A. **Foodborne Listeriosis**. New York: Elsevier, 1990. cap. 12, p. 71-74.

BILLE,J.; BLANC, D.S.; SCHMID, H.; BOUBAKER, K.; BAUMGARTNER, A.; SIEGRIST, H.H.; TRITTEN, M.L.; LIENHARD, R.; BERNER, D.; ANDERAU, R.; TREBOUX, M.; DUCOMMUN, J.M.; MALINVERNI, R.; GENNÉ, D.; ERARD, P.H.; WAESPI,U. Outbreak of human listeriosis associated with tome cheese in northwest Switzerland, 2005. **Euro Surveill**, vol 11 (6): p. 91-3, 2006.

BLACKBURN C. W.; CURTIS L. M.; HUMPHESON L.; PETITT S. B., Evaluation of the Vitek Immunodiagnostic Assay System (VIDAS) for the detection of Salmonella in foods, **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, p. 32 – 36, 28 June 2008.

BOGGS, G. D.; WHITWAM, R. E.; HALE, L. M.; BRISCOE, R. P.; KAHN, S. E. Outbreak of Listeriosis associated with homemade mexican-style cheese – North Carolina. **Morbidith and Mortality weekly report**. V. 50, n. 26, 2001.

BOLDERDJIK, R.F., MILAS, J.E. Salmonella detection in Dried Milk products by Motility Enrichment on Modifie Semisolid Rappaport-Vassiliadis Medium. Collaborative Study. **J. AOAC Int**. v. 79, p. 441- 450, 1996.

BRENNER, F. W.; VILLAR, R. G.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. Salmonella nomenclature. **Journal Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2465- 2467, 2000.

BUSSE, MARTIN. Media for salmonella. **International Journal of Food Microbiology,** v. 26, p. 117-131. 1995.

CAFFER, M. I.; EIGUERT, T. ***Salmonella enteritidis*** in Argentina. **Inf. J. Food Microb.**, v.21, p. 15-19, 1994.

CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C.; PRIETO, M.; GARCI´A FERNA´NDEZ, M.C.; MORENO, B., Comparison of PALCAM and modified Oxford plating media for isolation of Listeria species in poultry meat following UVM II or Fraser secondary enrichment broths. **Food Microbiology**, v. 18, p. 555–563, 2001.

CARROLL, S.A., CARR, L.E., MALLINSON, E.T., LAMICHANNE, C., RICE, B.E., ROLLINS, D.M. AND JOSEPH, S.W., Development and evaluation of a 24-hour method for the detection and quantification of Listeria monocytogenes in meat products. **Journal of Food Protection,** v. 63, p. 347–353, 2000.

CASSOLARI, C. *et al* Characterization of *Listeria monocytogenes* strains detected in meat and meat products, **Higiene moderna**, v. 101, n. 2, p. 193-205, 1994.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Salmonellosis – General Information. Division of Bacterial and Mycotic Disease.** Disponível em: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/samonellosis_g.htm Acesso em: 08 agosto de 2008

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Multistate outbreak of listeriosis – United States**. Disponível em: http://www.cdc.gov/od/oc/media/pressrel/r990114.htm. Acesso em: 17 dez. 2008.

CHAU, P.Y., HUANG, C.T. A one-day selective migration procedure for detecting salmonellae in faeces**. Journal of Clinical Pathology**, v. 27, p. 405- 407, 1974.

CHAVES, G.M.C. *et al*. Avaliação bacteriológica de lingüiça frescal suína comercializado no Município do Rio de Janeiro, RJ, **Higiene Alimentar**, v.14, n.73, p.48-52, 2000.

COCOLIN, L.; RANTSIOU, K.; IACUMIN, L.; CANTONI, C.; COMI, G. Direct identification in food samples of *Listeria sp* and *Listeria monocytogenes* by molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6273-6282, 2002.

COMIR G.; FRIGERIO C.; C . CANTON**,** *Listeria monocytogenes* serotypes in Italian meat products, **Letters in Applied Microbiology**, v. 15, p. 168-171, 1992.

CORRÊA, W.M. & CORRÊA, C.N.M. Listeriose. Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos. **MEDSI**, cap. 24, p. 367- 373, 2 ed. Rio de Janeiro, 1992.

CURTIS, G.D.W., MITCHELL, R.G., KING, A.F., GRIFFEN, E.J. A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes***. Letters in Applied Microbiology,** n. 8, p. 95-98, 1989.

D'AOUST, J. Salmonella species. In: DOYLE M.P.; BEUCHAT L. R.; MONTVILLE T, **International Journal of Food Microbiology**, Washington, ASM Press, Cap 8, p. 129- 158, 1997.

D'AOUST, J.Y., SEWELL, A., JEAN, A. Limited sensitivity of short (6h) selective enrichment for detection of foodborne **Salmonella**. **J Food Prot**, v.53, n.7, p.562-565, 2000.

D'AOUST, J.Y., SEWELL, A., DALEY,E. Inadequacy of small transfer volume and short (6h) Selective Enrichment for the detection of foodborne **Salmonella**. **J Food Prot**, v.55, n.5, p.326-328, 2002.

D'AOUST, J.Y., SEWELL, A., GRECO, P. Detection of **Salmonella** in dry foods using refrigerated pre-enrichment and enrichment broth cultures: Interlaboratory study. **J AOAC Int**, v.76, n.4, p.814-821, 2003.

DAVIES, R.H., et al. National survey for Salmonella in pigs, cattle and sheep at slaughter in Great Britain (1999-2000). **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 750-760, 2004.

DAWSON,S.J.;EVANS,M.R.W.;WILBY,D.;BARDWELL,J.;CHANBERLAIN, N.; LEWIS, D.A. Listeria outbreak associated with sandwich consumption from a hospital retail shop, United Kingdom. **Euro Surveill**, vol 11 (6): p. 89-91, 2006.

DE SMEDT, J.M. BOLDERDIJK, R.F., RAPPOLD, H., LAUTENSCHLAEGER, D., Rapid Salmonella detection in foods by motility enrichment on a modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis Medium. **Journal of Food Protection,** v. 49, p. 510-514, 1986.

DE SMEDT, J.M., BOLDERDIJK, R., MILAS, J. Salmonella detection in cocoa and chocolate by motility enrichment on modified semi solid Rappaport- Vassiliadis medium: Collaborative study**. J. AOAC Int., Arlington**, v. 77, n. 2, p. 365-373, 1994.

DESTRO, M. T.; KABUKI, D. Y.; SERRANO. A. M; Isolation of Listeria species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control 2**, 110-112,1991.

DEVER, F.P.; SCHAFFNER, D.W.; SLADE, P.J. Methods for the detection of foodborne *Listeria monocytogenes* in the U. S. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v. 13, n. 4, p. 263-292, Dec., 1993.

DHANASHREE B.; OTTA S.K.; KARUNASAGA I., GOEBEL W.; KARUNASAGAR I. Incidence of *Listeria* sp in clinical and food samples in Mangalore, India, **Food Microbiology**, v. 20, p. 447-453, 2008.

DIFCO & BBL **MANUAL**. 1ed. Becton, Dickinson and Company**.** MarylandUSA. 2003.

DOMAŃSKA B. P.; BOGUSŁAWSKA E.; SZAKIEL M. W.; KOTŁOWSKI R.; RÓŻALSKA B.; CHMIELA M.; KUR J.; DĄBROWSKI W.; RUDNICKA W., Evaluation of the API test, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity and PCR method in identification of *Listeria monocytogenes* in meat foods, **FEMS Microbiology Letters,** v. 171, p. 209 – 214, 1998.

DONNELLY, C.W. Conventional methods to detect and isolate *Listeria monocytogenes*. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis, and food safety**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1999. p.225-260.

DOROZYNSKI, A. Seven die in French Listeria outbreak. **British Medical Journal**, v. 320, p. 601, 2000.

DUFFY, G.; CLOAK, O.M.; SHERIDAN, J.J.; BLAIR, I.S.; McDOWELL, D.A. The development of a combined surface adhesion and polymerase chain reaction technique in the rapid detection of *Listeria monocytogenes* in meat and poultry. **Int. J. Food Microbiol**., Amsterdam, v.49, p.151-159, 1999.

DUTH, Y. H.; SCHAFFNER, D. W., Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag time of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. **Journal of food protection**, v.56, p.205-210, 1993.

ECKNER, K.F., DUSTMAN, W.A., CURIALE, M.S., ***et al***. Use of an elevated temperature and novobiocin in modified enzyme-linked immunoabsorbent assay for the improved recovery of Salmonella from foods. **J Food Prot**, v.55, n.10, p.758-762, 2002.

ELIZAQUÍVEL P., GABALDÓN J. A., AZNAR R. Comparative Evaluation of RTi-PCR and Mini-VIDAS SLM System as Predictive Tools for the Routine Detection of *Salmonella* sp in Naturally Contaminated Food Products**. Food Anal. Methods**. P. 122-132, June 2008.

EMOND, E.; FLISS, I.; PANDIAN, S. A ribossomal DNA fragment of *Listeria monocytogenes* and its use as a genus-specific probe in na aqueous-phase hybridizacion assay. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, p. 2690-7, 1993.

Entis, P.;Lerner, I.,Twenty-four-hour direct presumptive enumeration of *Listeria monocytogenes* in food and environmental samples using the ISO-GRID method with LM-137 agar. **Journal of Food Protection** v. 63, p. 354–363, 2000.

ESCATÍN, E.F. et al. Prevalence of Salmonella in chorizo and its survival under different storage temperaturas. **Food Microbiology**, v. 16, p. 479-486, 1999.

ESTEVES, A.; SARAIVA, C.; FONTES, M. C.; MARTINS, C. Hygienic quality and safety of traditional meat products from particular producers of Trás-os-Montes, **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 101 p. 109-114, 2006

ERICSSON, H,; EKLOW, A., DANIELSSON-THAM, M. L.; LONGAREVIC, S.; MENTZING, L. O.; PERSSON, I.; UNNERSTAD, H.; THAM, W. An outbreak of Listeriosis suspected to have been caused by Rainbow Trout. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.11, p. 2904-7, Nov., 1997.

FABER, J.M. A review of foodborne listeriosis. **Journal of Food Protection**, Ames, 49.10: 838, 1986.

FARBER, M. & PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**. v. 55, n. 3, p. 476-511, 1991.

FENLON, D.R.; *Listeria monocytogenes* in the natural environment. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H.; eds. Listeria, Listeriosis and Food Safety, 2 ed. Marcel Dekker, New York, 1999, Pg. 21-37.

FLEMING, D.W.; COCHI, S.L.; MAC DONALD, K.L.; BRONDUM, J.; HAYES, P.S.; PLIKAYTIS, B.D.; HOLMES, M.B.; AUDURIER, A.; BROOME, C.V.; REINGOLD, A.L. Pasteurized milk as a vehicle of infeccion in an outbreak of listeriosis. **The New England Journal of Medicine**, v.312, n. 7, p. 404-407, Feb., 1985.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar.** Artmed Editora, 2002,p. 65.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods**. Disponível em: http://www.cfsan.fda.gov./~dms/lmr2-2.html#Listeriosis. Acesso em: 21 nov. 2008.

FRANCO, B.D.G.M. **Métodos rápidos de análise microbiológica de alimentos**: estudo crítico e avaliação de novas metodologias. São Paulo; 1994. 128p. Tese de Livre-Docência - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. p.182

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. p.182

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiología de los alimentos.** 4. ed., Zaragoza: Acribia, 1993, 681p.

FUNK, J. A.; DAVIES, P. R.; NICHOLS, M. A. Longitudinal study of *Salmonella enterica* in growing pigs reared in multiple- site swine production systems. **Veterinary Microbiology**, n. 83, p. 45- 60, 2001.

GIOVANNINNI, A. et al. Quantitative risk assessment of *Salmonella* sp Infection for the consumer of pork products in a Italian region. **Food Control**, v. 15, p. 139-144, 2004.

GOOSSENS, H., WAUTERS, G., DE BOECK, M., JANSSENS, M.E. BUTZLER, J.P. Semisolid selective - motility enrichment medium for isolation of Salmonella from fecal specimens**. Journal of Clinical Microbiology**, v. 19, p 940-941, 1984.

GORTON, S.J.; KLIEBENSTEIN, J.B.; BERAN, G.W. Cost of on-farm microbial testing for Salmonella: An application by farm size and prevalence level. **ISU Swine Research Report**, 1996. Disponível em: http://www.extension.iaistate.edu/Pages/ansci/swinereports/al1-1413.pdf. Acesso em: 05 dez. 2008.

GOUIN, E.; MENGAUD, J.; COSSART, P. The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, na animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species. **Infect. Immun**., Washington, v.62, p.3550-3553, 1994.

GOULET, V.; HEDBERG, C.; MONNIER, A.; VALK, H. Increasing Incidence of Listeriosis in France and Other European Countries. **Emerging Infectious Diseases**, Vol. 14, No. 5, May 2008.

GRAY, M.L.; STAFSETH, H.J.; THORP Jr., F.; SHOLL, L.B.; RILEY Jr., W.F. A new technique for isolating listerellae from the bovine brain. **J. Bacteriol.**, Washington, v.55, p.471-476, 1948.

GRAVANI, R., Incidence and control of Listeria in food processing facilities. In Listeria, **Listeriosis and Food Safety,** ed. Ryser, E.T. and Marth, E.H. p. 657–709. New York: Marcel Dekker, 1999.

GUNASINGHE C. P. G. L.; , HENDERSON C.; RUTTER M. A., Comparative study of two plating media (PALCAM and Oxford) for detection of Listeria species in a range of meat products following a variety of enrichment procedures**, Letters in Applied Microbiology,** v. 18 p. 3156 – 158, 1993.

HAACK, O.N.; VARGS, C.R.; STIFELMANN, R. **Produção de embutidos cozidos.** Porto Alegre: UFRGS, ICTA, 1987. p.56.

HAACK, O.N.; BERNARDI R.; RIVERO, M. **Embutidos crus**. Porto Alegre: UFRGS, ICTA, 1991. p.39.

HAJDENWURCEL, J.R. **Atlas de microbiologia de alimentos**. São Paulo : Higiene Alimentar, 1997. 96 p.

HALD, T.et al. A Bayesian approach to quantify the contribution of animal-food sources to human salmonellosis, **Risk Analysis**, v. 24, p. 251-265, 2004.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. 2.ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory, p.453 1988.

HEIN, I.; KLEIN, D.; LEHNER, A., BUBERT, A.; BRANDL, E.; WAGNER, M., Detection and quantification of the iap gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay. **Research in Microbiology** v.152, p. 37–46, 2001.

HENSYL, W.R., ed. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. [edited by] John G. Holt...[et al.].- Edição 9th.ed. Imprenta Baltimore: Willians & Wilkins, 1994. 787p.

HITCHINS, A.D. *Listeria monocytogenes*. In: UNITED STATES. Food and Drug Administration. **Bacteriological analytical manual**. Edição 8th.ed. Imprenta Gaithersburg, Md.: AOAC International, 1998. cap.10, p.10.01-10.13.

HO, J.H.; SHANDS, K.N.; FRIEDLAND, G.; ECKIND, P.; FRASER, D.W. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving pacients from eight Boston Hospitals. **Archives of International Medicine**, v.146, p.520, 1986.

HOCHBERG, A.M.; ROERING, A.; GANGAR, V.; CURIALE, M.; BARBOUR, W.M.; MROZINSKI, P.M. Sensitivity and specificity of the BAX• for screening/*Listeria monocytogenes* assay: Internal validation and independent laboratory study. **J. AOAC Int**., Gaithersburg, v.84, n.4, p.1087-1097, 2001.

HOFER, C.B.; MELLES, C.E.A.; HOFER, E. *Listeria monocytogenes* em pacientes pós-transplante renal. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, vol. 41, no. 6, pp. 375-377, 1999.

HUGHES, C.; GILLESPIE, I.A.; O´BRIEN, S.J. Foodborne transmission of infectious intestinal disease in England and Wales. **Food Control**, v.18, p.766-772, 2007.

KACMARSKI, E.B., JONES, D.M. Listeriosis and ready-cooked chicken. **The Lancet**, London, v. 1, n. 8635, p. 549, Mar. 1989.

KALAPOTHAKI, V., VASSILIADIS, P., MAVROMMATI,C.H., TRICHOPOULOS, D. Comparison of Rappaport-Vassiliadis enrichmentmedium and tetrathionate brilliant green broth for isolation of Salmonella from meat products**. Journal of Food Protection,** v.46, p. 618-621, 1983.

KERR, K. G.; DEALLER, S.F.; LACEY, R.W. Maternofetal listeriosis from cook-chill and refrigerated foods. **The Lancet,** v. 2, n. 8620, p. 1113, 1988.

KUNKEL, D. **Micrsocopia**, px, Inc. Disponível em: http://www.listeirablog.com/artivles/listeria_resoucres. Acesso em: 12 janeiro de 2008.

INGIANNI, A.; FLORIS, M.; PALOMBA, P.; MADEDDU, M.A.; QUARTUCCIO, M.; POMPEI, R. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in foods, by a combination of PCR and DNA probe. **Mol. Cell. Probes**, Amsterdam, v.15, p.275-280, 2001.

INTERNATIONAL COMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS- ICMSF. **Microrganismos de los alimentos.** Características de los patógenos microbianos. Zaragoza: Acribia, 1996, 606p.

INTERNATIONAL COMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS- ICMSF. **Microorganisms in foods 7**. Mirobiological testing in foods safety management, 1ed. Zaragoza, Editora Acribia, 2002.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **Microbiology of food and animal feeding stuffs** – **Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*** – Part 1: Detection method, International Standard ISO 11290-1: 1996, Geneva, Switzerland. Disponível em: http://www.iso.org/iso/em/CatalogueListPage.CatalogueList?ICS1=07&ICS2=100&ICS3=30&scopelist=. Acesso em: 30 abr. 2008.

JAY, J.M. **Modern food microbiology**. 5 ed. New York: Champman & Hall, 1992, p. 661, 1992.

JAY, J.M. **Microbiología moderna de los alimentos.** Tercera edición. Zaragoza: Acribia,1994, p.651- 668.

JAY, J.M. **Listerioses de origem animal**. In: Microbiologia de alimentos. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, cap. 25, p. 517-542.

JOHNSTON R. W.; GREEN S. S.; CHIU J.; PRATT M.; RIVERA J., Incidence of Salmonella in Fresh Pork Sausage in 1979 Compared with 1969, **Journal of Food Science** v. 47, p. 1369 – 1371, 1982.

JUBB K. V.; KENNEDY P. C.; PALMER N. Pathology of domestic animals. 4 ed. San **Diego: Academic**, p. 780, 1985.

LANDGRAF, M. **Fundamentos e perspectivas da irradiação de alimentos visando ao aumento de sua segurança e qualidade microbiológica**. São Paulo, 2002. Tese de Livre-Docência – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

LAZARO, N.S., TIBANA, A., HOFER, E. *Salmonella* sp. In healthy swine and in abattoir environments in Brazil. **J Food Prot**, v.60, n.9, p.1029-1033, 1997.

LEE, W. H.; McCLAIN, D. Improved *Listeria monocytogenes* selective agar**. Applied and Environmental Microbiology,** v. 52, p. 1215-1217, 1986.

LIMA, A.T.F.; ROSSINI, E.M.M.; POMPERMAYER, D.M.C. Incidência de *Listeria s*. e *L. monocytogenes* em produtos cárneos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22, Florianópolis, 2003. **Resumos**. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003.

LINNAN, M.J.; MASCOLA, L.; LOU, X.D.; GOULET, V.; MAY, S.; SALMINEN, C.; HIRD, D.W.; YONEKURA, M.L.; HAYES, P.;WEAVER, R.; AUDURIER, A.; PLIKAYTIS, B.D.; FANNIN, S.L.; KLEKS, A.; BROOME, C.V. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 319, n. 13, p. 823-828, Sept.1988.

LIRIO, V.S. et al Freqüência de 17 sorotipos de Salmonella isolados em alimentos, **Revista Higiene Alimentar**, v. 12, n.55, p.36-42, 1999.

LOBO, M.V. et al. Avaliação microbiológica de salames coloniais comercializados no município de Santa Maria - RS. **Higiene Alimentar**, v. 15, n.88, p.57-61, 2001.

L' MONO DE FORET Q.C.; DOREY, J.F. Rapid and Effective Method for preparation of Fecal Specimens for PCR Assays. **Journal of Clinical Microbiology**, Jan, p. 281-283, 1997.

McEVOY, J. M. et al**. The incidence of *Listeria* sp and *Escherichia coli* O157:H7 on beef carcasses**. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY-ICoMST, 44., 1998, Barcelon, Spain. Barcelon : n.i., 1998. p.346-347.

MAGNANI, A. L.; GIOMBELLI, A.; SCHUCK, M. S.; BUSATO, M. A.; SILVA, N. L.; Incidência de *Salmonella* e *Escherichia coli* em carne suína in natura e salame

colonial, consumidos pela população de Chapecó - SC. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 73, p. 44-47; 2000.

MAIJALA, R.; LYYTIKAINEN, O.; JOHANSSON, T. Exposure of *Listeria monocytogenes* in an outbreak caused by butter. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PROBLEMS OF LISTERIOSIS (ISOPOL), 14, Mannheim, 2001. **Book of abstracts**. Alemanha, 2001. p.165. S.l.: s.n.

MAIJALA, R.; LYYTIKAINEN, O; JOHANSSON, T.; AUTIO, T.; AALTO, T.; HAAVISTO, L.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Exposure of *Listeria monocytogenes* within an epidemic caused by butter in Finland. International **Journal of Food Microbiology ,** v. 70, p. 97-109, 2001.

MALTI J. ; AMAROUCH H., Microbiological and physicochemical characterization of natural fermented camel meat sausage, **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 32, p. 159 – 177, 2007.

MARTH, E. H., Disease characteristic of *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, v. 42, n. 51, p. 165-168, 1988.

MARTÍN B.; JOFRE A., GARRIGA M.; HUGAS M.; AYMERICH T., Quantification of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages by MPN-PCR method, **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, p. 290–295, 2004.

MARTINS, J.F.; TERRA, N.N. **Curso sobre biotecnologia do processo de salames e outros embutidos curados.** Santa Maria: UFSM, 1985. p.94.

MATTICK K. L.; BAILEYR. A.; JØRGENSEN F.; HUMPHREY T. J., The prevalence and number of Salmonella in sausages and their destruction by frying, grilling or barbecuing, **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 541 – 547, 2002.

McBRIDE, M.F., GIRARD, K.F. A selective method for the isolation of *Listeria monocytogenes* from mixed bacterial populations**. Journal of laboratory and Clinical Medicine,** v. 55, p. 153-157, 1960.

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

MEAD, P. S. ; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; Mc CAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, O.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food- related illness and death in the United States. **Emergency Infect Disease**, v. 5, n. 5, p.607- 625, 1999.

MIELE, M.; GIROTTO, A.F.; **A suinocultura brasileira 2007 e cenários para 2008.** Disponível em: http://www.cnpsa.embrapa.br/?ids=Sq4r54z6x&ano=2007. Acesso em: 26 de out. 2008.

MIETTINEN, M. K.; SHTONEN, A.; HEISKANEN, P.; HAAJANEN, H.; BJORKROTH, K. J.; KORKEALA, H. J. Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.7, p. 2358-60, July, 1999.

MORO C. V.; DESLOIRE S.; ROZAND C. V.; CHAUVE C.; ZENNER L., Comparison of the VIDAS® system, FTA® filter-based PCR and culture on SM ID for detecting Salmonella in sausage, **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 431 – 436, 2006.

O'DONOGUE, D., MORGAN, R., PUGH, S., DAVDA, C. Comparison of the MSRV method with various rapid and conventional Salmonella detection methods for chocolate, confectionery and biscuit ingredients**. Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 15, p. 92-95, 1992.

OGGEL, J.J., NUNDY, D.C., RANDALL, C.J. Modified 1-2 Test system as a rapid screening method for the detection of Salmonella in foods and feeds. **Journal of Food Protection,** v. 53, p. 656-658, 1990.

OKTAY H. I.; HEPERKAN D., Evaluation of ISO method and VIDAS automated system for identifying Listeria and Salmonella in selected foods, **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, v. 14, p. 133 – 145, 2006.

OLIVEIRA, A.N. Bactérias do Gênero Listeria em Leite e derivados no Comércio Varejista de Goiânia – Goiás. Belo Horizonte, 1993. 101f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, 1993.

OTTAVIANI, F.; OTTAVIANI, M.; AGOSTI, M. Differential Agar médium for *Listeria monocytogenes.* **"Quimper Froid Symposium proceedings" P6 A.D.R.L.A.** Quimper (F), p. 16-18, 1997.

OXOID MANUAL, 8ª Edição. Oxoid Limited. Hampshire, Inglaterra, 2006; PARDI, M.C., SANTOS, F.I., SOUZA, E.R., PARDI, H.S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne.** Goiânia, UFG, v. 1, p. 294-308, 2008.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F. dos; SOUZA, E. R. de; PARDI, H. S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne.** Volume I, Editora UFG, 1ª edição, 1995.

PELCZAR, M. J. Jr; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R., **Microbiologia: conceitos e aplicações.** v. 2, 2. ed., São Paulo: MAKRON Books, 1997.

PERALES, I., AUDICANA, A**.** Evaluation of semisolid Rappaport medium for detection of Salmonella in meat products. **Journal of Food Protection,** v. 52, p. 316-319, 1989.

PETRAN, R. L.; SWANSON, K. M. J. Simultaneos growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. **Journal of food protection**, v. 56, n.7, p. 616-618, 1993.

RICHARDS, N. S. P. S. Segurança Alimentar- Como prevenir contaminações na indústria. **Food Ingredients**, p. 16- 30, 2003.

PEREIRA, M.L.; ROCOURT, J. *Listeria monocytogenes* – uma revisão sobre os aspectos taxonômicos, importância médica e em alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 7, p. 5-12, 1993.

PETRAN, R.L.; SWANSON, K.M.J. Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. **J. Food Prot**., Des Moines, v.7, p.616-618, 1993.

POELMA P. L.; ROMERO A.; ANDREWS W. H., Rapid identification of Salmonella and related foodborne bacteria by five biochemical multitest systems, Journal of **Food Science**, **v.** 42 , p. 677 – 680, 1976.

PRICE, J. F. Y SCHWEIGERT, B. S. Ciência de la Carne y de los Productos Cárnicos. **Editorial ACRIBIA**, S.A., 2ª edición, 1994.

REIS, R. B.; KRUGER, C. S.; MACIEL, M. S.; *Salmonella* spp. em produtos cárneos comercializados no município de Cuiabá-MT. Avaliação da metodologia de pesquisa. Modelos de resistência a drogas antimicrobianas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 15, p. 74-78; 1995.

RIJPENS, N.P.; JANNES, J.; VAN ASBROECK, M.; HERMAN, L.M.; ROSSAU, R. Simultaneous detection of *Listeria* sp and *Listeria monocytogenes* by reverse hybridization with 16S-23Sr RNA spacer probe**. Molecular and Celular Probes**, v. 9, p. 423-32, 1995.

ROCOURT, J. Taxonomy of the Listeria genes and typing of *L. monocytogenes*. **Pathol. Biol.**, v.44, p.749-56, 1996.

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

RORVIK, L.M.; AASE, B.; ALVESTAD, T.; CAUGANT, D.A. Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in broilers and poultry products. **Letters in Applied Microbiology**, 94 (4), 663-640, 2003.

RYSER, E.T.; DONNELLY, C.W. *Listeria*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: APHA, 2001. p.343-353.

RÜCKERT D. A; S. V., PINTO P. S. A.; VANETTI M. C. D.; MORAES M. P.; JUNIOR S. A.; NERO L. A., Assessment of conventional detection method, immunoanalysis and polymerase chain reaction for *Salmonella* sp monitoring in chicken, **Journal of rapid method and automation in microbiology**, v. 16, p. 185 – 195, November 9, 2007.

SALAMINA, G.; DONNE, E.D.; NICCOLINI, A.; PODA, G.; CESARONI, D.; BUCCI, M.; FINI, R.; MALDINI, M.; SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BIBB, W.; ROCOURT, J.; BINKIN, N.; SALMOSO, S. A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. **Epidemiol. Infect**., Cambridge, v.117, p.429- 436, 1996.

SÃO PAULO (SP) Decreto n. 12342 de 27 de setembro de 1978. Código sanitário de São Paulo, **Imprensa Oficial**, São Paulo, p.376, 1978.

SANTOS, L.A.G. *et al*, Detecção de *Listeria monocytogenes* como subsidio a determinação de pontos críticos de controle no abate de suínos. **Biosci. J.**, v.21, n.2, p. 131-135, Uberlândia, 2005.

SAUER, C.J. *et al*. Food-borne illness outbreak associated with a semi dry fermented sausage product. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 60, n. 12, p. 1612-1617, 1997.

SCHLECH III, W. F.; LAVIGNE, P. M.; BORTOLUCCI, R. A.; ALIEN, A. C.; HALDANE, E. V.; HIGHTOWER, A. W.; JOHNSON, S. E.; KING, S. H.; NICHOLLS, E. S.; BROOME, C. W. Epidemic listeriosis. Evidence for transmission by food. **New England Journal of Medicine**, v. 308, p. 203-206, 1983.

SCUDERI G.; SQUARCIONE S.; GRECO D. Tossinfezioni alimentari da Salmonella in Italia: il sistema di notifica dei focolai epidemici. **Papporti ISTISAN**, v. 93, n.30, p.17-38, 1993.

SEELIGER, H.P.R.; JONES, D. Genus Listeria. In: **Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology**, 9.ed., Baltimore: Williams & Wilkins, v.2, p. 1235-45 , 1986.

SILVA, W.P.; LIMA, A.S.; GANDRA, E.A.; ARAÚJO, M.R.; MACEDO, R.P.; DUVALL, E.H. *Listeria* sp no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Br. **Ciência Rural**. v.34, n. 3, 2004.

SLUTSKER, L.; SCHUCHAT, A. Listeriosis in humans. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. ***Listeria*, listeriosis, and food safety**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1999. p.75-96.

SOUSA, C. L.; JOELLE, M. R. S. P.; Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química de carne bovina moída em açougues do município de Macapá – AP. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 72, p. 60-65; 2000.

STARBUCK, M.A. B.; HIL, P.T.; STEWART, G. S.A.B. Ultrasensitive detection of *L. monocytogenes* in milk by the polymerase chain reaction trans PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 15, p. 248-52, 1992.

STRAPAZZON, R. **Apostila técnica duas rodas para frigoríficos**. Jaraguá do Sul, SC, Frigo representações, 1997, p.79.

STUART, P.F., PIVNICK, H. Isolation of Salmonella by Selective Motility Systems**. Applied Microbiology,** v. 13, p. 365-372, 1965.

SWAMINATHAN, B. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J., eds. **Food microbiology fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 2001. p.383-409.

TAPCHAISRI, P., WANGROONGSARB, P., PANBANGRED, W., ***et al***. Detection of **Salmonella** contamination in food samples by dot-ELISA, DNA amplification and bacterial culture. **Asian Pac J Allergy Immunol**, v.17, n.1, p.41-51, 1999.

TAVECHIO, A.T. *et al*. A Salmonella setypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 throught 2000. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 1041-1044, 2002.

THORBERG, B. M. & ENGVALL, A. Incidence of Salmonella in five Swedish slaughterhouses. **Journal Food Protection**, 64(4), p. 542- 545, 2001.

TIEJEN, M., FUNG, D.Y.C. Salmonella and Food Safety. **Crit. Rev. Microbiol**. Cleveland, v. 21, p. 53-83, 1995.

TOYOSHIMA, M.T.K. *et al*. Peritonite bacteriana espontânea causada por *Listeria monocytogenes* em pacientes com cirrose: primeiro relato de caso no Brasil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, vol. 48, no. 5, pp. 291-293, 2006.

TRINDADE, P. S. ; NALÉRIO, E. S. ; MACEDO, M. R. P. ; JANTZEN, M. M. ; ZOCCHE, F. ; LIMA, A. S. ; SILVA, W. P. . *Salmonella* sp em derivados cárneos comercializados na cidade de Pelotas-RS. In: XIII CIC - Congresso de Iniciação Científica - VI ENPOS - Encontro de Pós Graduação, 2004, Pelotas. Anais do XIII CIC - Congresso de Iniciação Científica - VI ENPOS - Encontro de Pós Graduação, 2004.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Microbiology Laboratory Guidebook**, 3rd. ed. Chapter 8, 1989. U.S. Department of Agriculture, Pittsburg, PA *apud* HOCHBERG, A.M.; ROERING, A.; GANGAR, V.; CURIALE, M.; BARBOUR, W.M.; MROZINSKI, P.M. Sensitivity and specificity of the BAX• for screening/*Listeria monocytogenes* assay: Internal validation and independent laboratory study. **J. AOAC Int**., Gaithersburg, v.84, n.4, p.1087-1097, 2001.

UYTTENDAELE M.; VANWILDEMEERSCH K.; DEBEVERE J., Evaluation of real-time PCR vs automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of Salmonella***,*** **Letters in applied microbiology**, v. 37, p. 386 – 391, 17 October, 2003.

VASSILIADIS, P. The Rappaport-Vassiliadis (RV) enrichment medium for the isolation of Salmonellas: in overview**. Journal Applied Bacteriology**, v. 54, p. 69-76, 1983.

VASSILIADIS, P., PATERNAKI, E., PAPAICONOMON, N., PAPADAKIS, J.A.,TRICHOPOULOS, D. Noveau procede d'enrichissement de Salmonella**.** Ann**. Microbiol. Inst. Pasteur**, v. 127B, p. 195-200, 1976.

VAN NETTEN, P., PERALES, I., VAN DE MOOSDIJK, A., CURTIS, G.D.W., MOSSEL, D.A.A., Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* sp**. International Journal of Food Microbiology,** n.8, p. 299 – 316, 1989.

VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. *Listeria monocytogenes*. In: **Foodborne pathogenes**. London: Mosby Year Book, 1991. p. 327-345.

VIDON, D. J. M.; DONZE, S.; MULLER, C.; ENTZMANN, A.; ANDRE, P. A simple chemiluminescence-based method for rapid enumeration of *Listeria* sp microclonies. **Journal of Applied Microbiology,** v. 90, p. 988-993, 2001.

VLAEMYNCK, G., LAFARGE, V., SCOTTER, S. Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of Aloa, a diagnostic, chromogenic isolation medium**. Journal of Apllied microbiology**, v. 88, p. 430-441, 2000.

WALSH, D. et al**.** Comparison of selective and non selective media for the isolation of Listeria species from retail foods. **Journal Food Safety**, v.18, p.85-89, 1998.

WEGENER, H. C. & BAGER, F., Pork as a source of human salmonellosis, In: International Symposium on Epidemiology and control of Salmonella in Pork, Copenhagen, p. 3- 8, 1997.

XIROUCHAKI, E., VASSILIADIS, P., TRICHOPOULOS & MAVROMMATI, C.H., A note on the performance of Rappaport's medium, compared with Rappaport-Vassiliadis broth, in the isolation of Salmonella from meat products, after pre-enrichment**. Journal of Applied Bacteriology,** v. 52, p. 125-127, 1982.

ZHANG, W.; HUGHES, A.; WILT, G.; KNABEL, S.J. The BAX® PCR assay for screening *Listeria monocytogenes* targets a partial putative gene *Imo*2234. **J. Food Prot**., Des Moines, v.67, n.7, p.1507-1511, 2004.

8. ANEXOS

ANEXO 01 AMOSTRAS DE LINGÜIÇA RESFRIADA POR LOCAL DE PRODUÇÃO, TIPO E LOCAL DE COLETA

Amostra	Local de Produção	Tipo de amostra	Local de coleta
1.	Morretes/PR	Lingüiça Blumenau	Supermercado
2.	Irati/PR	Lingüiça Pura Defumada	Hipermercado
3.	Curitiba/PR	Lingüiça Blumenau	Supermercado
4.	Curitiba/PR	Lingüiça Frescal	Supermercado
5.	Curitiba/PR	Lingüiça Frescal	Supermercado
6.	Curitiba/PR	Lingüiça de Frango	Supermercado
7.	São Jose dos Pinhais/PR	Lingüiça Frescal	Mercado Municipal
8.	São Jose dos Pinhais/PR	Lingüiça Frescal	Mercado Municipal
9.	Toledo/PR	Lingüiça Frescal Caseira	Hipermercado
10.	Toledo/PR	Lingüiça Frescal	Hipermercado
11.	Toledo/PR	Lingüiça Seca Caseira	Estabelecimento comercial de pequeno porte
12.	Foz do Iguaçu/PR	Lingüiça Frescal	Estabelecimento comercial de pequeno porte
13.	Curitiba/PR	Lingüiça Frescal	Feira livre
14.	Curitiba/PR	Lingüiça Frescal	Hipermercado
15.	Curitiba/PR	Lingüiça Pura	Hipermercado
16.	Curitiba/PR	Lingüiça Frescal	Hipermercado
17.	Curitiba/PR	Lingüiça Frescal	Feira livre
18.	Curitiba/PR	Lingüiça Suína	Feira livre
19.	Curitiba/PR	Lingüiça Suína	Hipermercado
20.	Frederico Westphalen/RS	Lingüiça Toscana	Hipermercado
21.	Frederico Westphalen/RS	Lingüiça Suína	Hipermercado
22.	Concórdia/SC	Lingüiça de Cordeiro	Supermercado
23.	Curitiba/PR	Lingüiça Defumada	Hipermercado
24.	Pitanga/PR	Lingüiça Mista	Hipermercado
25.	Irati/PR	Lingüiça Pura	Hipermercado
26.	Curitiba/PR	Lingüiça Mista	Hipermercado
27.	Curitiba/PR	Lingüiça Pura	Açougue
28.	São Jose/SC	Lingüiça Pura	Açougue
29.	Concórdia/SC	Lingüiça Mista	Açougue
30.	Bom Retiro do Sul/RS	Lingüiça Pernil	Hipermercado
31.	Bom Retiro do Sul/RS	Lingüiça Toscana	Hipermercado
32.	Bom Retiro do Sul/RS	Lingüiça de Frango	Hipermercado
33.	Curitiba/PR	Lingüiça Suína	Mercado Municipal

34.	Bom Retiro do Sul/RS	Lingüiça Suína	Mercado Municipal
35.	Chapecó/ SC	Lingüiça Suína	Mercearia
36.	Medianeira/PR	Lingüiça Toscana	Supermercado
37.	Pinhais/PR	Lingüiça Suína	Açougue
38.	Medianeira/PR	Lingüiça Toscana	Açougue
39.	Curitiba/PR	Lingüiça Toscana	Hipermercado
40.	Medianeira/PR	Lingüiça Pura Suína	Hipermercado
41.	Curitiba/PR	Lingüiça Toscana	Supermercado
42.	Bom Retiro do Sul/RS	Lingüiça Pernil	Hipermercado
43.	Concórdia/SC	Lingüiça Pernil	Supermercado
44.	São Jose/SC	Lingüiça Mista	Hipermercado
45.	Chapecó/SC	Lingüiça Lista	Mercado Municipal
46.	Cafelândia/PR	Lingüiça Frango	Hipermercado
47.	Concórdia/SC	Lingüiça Mista	Supermercado
48.	São Jose/SC	Lingüiça Toscana	Açougue
49.	Curitiba/PR	Lingüiça Pura	Hipermercado
50.	Curitiba/PR	Lingüiça Pura	Açougue
51.	Concórdia/SC	Lingüiça Pernil	Supermercado

ANEXO 02 RESULTADOS OBSERVADOS PELO EMPREGO DO MÉTODO ISO 11.290-1 E MINI-VIDAS LISTERIA CONFIRMADOS PELO SISTEMA API LISTERIA

Amostras	ISO	Confirmatório	mini-VIDAS	Confirmatório
1	+	*L. innocua*	+	*L innocua*
2	+	*L. innocua*	+	Não Identificada
3	+	*L. innocua*	+	Não Identificada
4	+	*L. grayi*	+	*L. grayi*
5	-	-	-	-
6	+	*L. welshimeri*	+	*L. welshimeri*
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	+	*L. grayi*	+	*L. grayi*
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	+	*L. grayi*	+	*L. grayi*
15	+	*L. innocua*	+	*L. innocua*
16	-	-	-	-
17	+	*L. grayi*	+	*L. grayi*
18	+	*L. grayi*	+	*L. grayi*
19	+	*L. monocytogenes*	+	*L. monocytogenes*
20	-	-	-	-
21	+	*L. monocytogenes*	+	*L. monocytogenes*
22	-	-	-	-
23	-	-	-	-
24	-	-	-	-
25	+	*L. grayi*	-	-
26	+	*L. innocua*	+	*L. innocua*
27	+	*L. grayi*	+	*L. grayi*
28	+	*L. welshimeri*	+	*L. welshimeri*
29	+	*L. innocua*	+	*L. innocua*
30	-	-	-	-
31	-	-	-	-
32	+	*L. innocua*	+	*L. innocua*
33	+	*L. welshimeri*	+	*L. welshimeri*
34	-	-	-	-
35	-	-	-	-
36	-	-	-	-
37	+	*L. innocua*	+	*L. innocua*
38	-	-	+	Não Identificada
39	+	*L. grayi*	+	*L. grayi*
40	+	*L. monocytogenes*	+	*L. monocytogenes*
41	+	*L. grayi*	+	Não Identificada
42	+	*L. monocytogenes*	+	*L. monocytogenes*
43	+	*L. innocua*	+	*L. innocua*
44	+	*L. innocua*	+	*L. grayi*
45	-	-	-	-
46	+	*L. monocytogenes*	+	*L. monocytogenes*
47	+	*L. grayi*	+	*L. grayi*

48	+	*L. grayi*	+	*L. grayi*
49	+	*L. monocytogenes*	+	*L. monocytogenes*
50	+	*L. monocytogenes*	+	*L. monocytogenes*
51	+	*L. grayi*	+	*L. grayi*

ANEXO 03 RESULTADOS OBSERVADOS PELO EMPREGO DO MÉTODO BAM E MINI-VIDAS SALMONELLA CONFIRMADOS PELO SISTEMA API 20-E

Amostras	BAM	Confirmatório	mini-VIDAS	Confirmatório
1	+	*Salmonella* sp	+	*Salmonella* sp
2	-	-	-	-
3	-	-	+	*Salmonella* sp
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	+	*Salmonella* sp	+	*Proteus* sp
7	+	*Salmonella* sp	+	*Proteus* sp
8	-	-	+	*Proteus* sp
9	-	-	+	*Salmonella* sp
10	+	*Salmonella* sp	+	*Citrobacter* sp
11	+	*Salmonella* sp	+	*Salmonella* sp
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	-	-	-	-
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	-	-	-	-
24	-	-	-	-
25	-	-	-	-
26	-	-	-	-
27	-	-	-	-
28	-	-	-	-
29	-	-	-	-
30	-	-	-	-
31	-	-	-	-
32	-	-	-	-
33	-	-	-	-
34	-	-	-	-
35	-	-	-	-
36	-	-	-	-
37	-	-	-	-
38	-	-	-	-
39	+	*Proteus* sp	+	*Proteus* sp
40	-	-	-	-
41	-	-	+	*Salmonella* sp
42	-	-	-	-
43	-	-	-	-
44	-	-	-	-
45	-	-	-	-
46	-	-	-	-
47	-	-	-	-

48	-	-	+	*Proteus* sp
49	-	-	-	-
50	-	-	-	-
51	-	-	-	-