

## Quantificação de *Listeria monocytogenes* em salames fatiados embalados a vácuo

Ricardo Ichiro Sakate, Lina Casale Aragon, Fernanda Raghianti, Mariza Landgraf, Bernadette D. G. M. Franco, Maria Teresa Destro

Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Laboratório de Microbiologia de Alimentos. SP. Brasil

**RESUMO.** Pouco se sabe, no Brasil e na América do Sul, sobre a ocorrência de *Listeria monocytogenes* em embutidos cárneos fermentados, fatiados, embalados a vácuo. Por suas características de produção e armazenamento, estes produtos são potenciais veiculadores deste patógeno ao ser humano, principalmente imunodeprimidos, idosos e grávidas, levando a disfunções gastrointestinais e neurológicas. Neste trabalho, foram analisadas 45 amostras de diferentes tipos e marcas de salames fatiados embalados a vácuo, refrigerados, provenientes de diferentes pontos do comércio varejista da mais populosa cidade da América do Sul, São Paulo – Brasil. Do total de amostras analisadas, 3 (6,7%) apresentaram populações de *L. monocytogenes* de 9,2 NMP/g, sendo duas pertencentes ao sorotipo 1/2a e uma ao 1/2b, os mais frequentemente encontrados também em outros países. Esta contaminação demonstra a necessidade de um rastreamento maior e em nível nacional da presença desta bactéria em produtos pronto para consumo. Isto pode, no futuro, auxiliar os órgãos governamentais de fiscalização a adotarem níveis máximos permitidos de *Listeria monocytogenes* nestes alimentos e as indústrias e comércio a implementarem medidas de controle higiênico-sanitário como GMP e sistemas como HACCP, garantindo, assim, um produto seguro para a saúde do consumidor. **Palavras-chave:** *Listeria monocytogenes*, salame, alimento pronto para consumo

**SUMMARY.** Occurrence of *Listeria monocytogenes* in pre-sliced vacuum-packaged salami in São Paulo - Brazil. There is scarce information in Brazil and other South American countries about the occurrence of *Listeria monocytogenes* in food, mainly refrigerated ready-to-eat products. The consumption of sliced vacuum-packaged meat products has increased in the last few years. Nevertheless, a complete assessment of the risk associated with *L. monocytogenes* in these products is still necessary. Because of the production and storage characteristics of these products, they can be considered potential vehicles for *L. monocytogenes* to humans, mainly immunocompromised, elderly, and pregnant women. The objectives of this study was to evaluate the population of *L. monocytogenes* in salami, a ready-to-eat meat product with extended shelf life, acquired in retail stores in São Paulo - Brazil. The three-tube most probable number technique was used and the methodology was that from Health Canada. Strains were biochemically identified and serotyped. Among the 45 samples, 3 (6,7%) harboured 9,2 MPN/g of *L. monocytogenes* and the others < 0,3 MPN/g. All the strains belonged to serotypes 1/2a and 1/2b, the most frequent serotypes found in food everywhere. Even being low, the population of *L. monocytogenes* found in this product could be a cause of concern to public health authorities as it can pose a threat to population at risk. This contamination highlights the importance of implementing systems like HACCP to assure safe products to consumers. **Key words:** *Listeria monocytogenes*, salami, ready-to-eat food.

### INTRODUÇÃO

Mudança nos hábitos alimentares, aparecimento de novos produtos do tipo “pronto para consumo” e minimamente processados, aumento no número de refeições coletivas e o surgimento de novos processos de criação intensiva de animais têm feito com que o risco de surtos de doenças transmitidas por alimentos aumente e microrganismos pouco frequentes entrem em evidência, principalmente, quando se consideram indivíduos imunodeprimidos, idosos, crianças e neonatos, gestantes e enfermos com doenças degenerativas crônicas ou agudas.

Dentre os mais importantes e perigosos microrganismos causadores de infecções de origem alimentar destaca-se a

*Listeria monocytogenes*, agente precursor da listeriose, doença zoonótica grave que pode levar ao aborto, a problemas neurológicos e a disfunções gastro-intestinais. Alguns estudos sugerem que até 21% dos humanos sejam portadores desta bactéria nos intestinos (1). Ela tem sido encontrada mundialmente em pelo menos 42 espécies de mamíferos, tanto domésticos quanto silvestres, assim como em pelo menos 22 espécies de aves e também em algumas espécies de peixes e moluscos (2). *L. monocytogenes* é ubiqüitária podendo ser isolada do solo, água, silagem, plantas e outras fontes ambientais. Esta bactéria, mesmo não sendo esporulada, é bem resistente e suporta os efeitos deletérios do congelamento, desidratação, acidez e calor, (3). Ela pode ainda se desenvolver em ambientes com baixas tensões de

oxigênio, devido à sua característica microaerófila.

*L. monocytogenes* tem sido associada a alimentos tais como, leite cru ou pasteurizado, queijos, sorvetes, vegetais crus, embutidos de carne, frango cru e cozido, carne crua e peixes crus ou defumados. A habilidade de se desenvolver em temperaturas tão baixas quanto 3°C, permite sua multiplicação em alimentos refrigerados (4).

De acordo com Rocourt e Cossart (5), diversos alimentos têm sido envolvidos em casos esporádicos e surtos de listeriose, entretanto, alguns grupos de alimentos são mais importantes como veículos de *L. monocytogenes*. Entre eles, os produtos prontos para consumo, estocados à temperatura de refrigeração e com vida de prateleira longa são considerados os de maior risco, assim como alimentos contendo uma população elevada (>100 UFC/g ou ml) de *L. monocytogenes*. A incidência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos cozidos varia de 3,5 a 85% (6-10).

Produtos prontos para o consumo, principalmente derivados de carne e peixe, têm sido implicados como causa de listeriose em diferentes países (11-13).

O salame é um produto cárneo obtido de carne suína ou mistura de suína e bovina, adicionado de toucinho, condimentos e outros ingredientes, embutido em envoltórios naturais e/ou artificiais, curado, fermentado, maturado, defumado ou não e dessecado (14).

Este produto, que não passa por tratamento térmico, pode abrigar células de *L. monocytogenes*. Quando fatiado e embalado a vácuo, há o risco de ocorrer a contaminação durante o fatiamento e a multiplicação das células durante a estocagem sob refrigeração (15).

Baseado neste risco associado ao consumo de embutidos cárneos fermentados e devido à existência de poucos trabalhos, no Brasil, associando *L. monocytogenes* aos produtos "prontos para consumo", objetivou-se avaliar a população deste patógeno em vários tipos de salames fatiados embalados à vácuo, bem como identificar o sorotipo das cepas isoladas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

Foram adquiridas no comércio varejista da cidade de São Paulo, SP, Brasil, 45 amostras de vários tipos de salame fatiado embalados a vácuo e refrigerados. Todas as amostras foram produzidas por estabelecimentos sob Inspeção Federal e estavam dentro do período de validade estipulado pelo fabricante.

As amostras foram acondicionadas em recipientes isotérmicos com gelo reciclável, transportadas ao laboratório e mantidas sob refrigeração a 4 °C até o instante das análises, que foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, no período de outubro de 2001 a janeiro de 2002.

### Métodos

A população de *L. monocytogenes* foi determinada utilizando-se o método preconizado por Pagotto et al. (16) e a técnica do Número Mais Provável (NMP), de acordo com o descrito por Garthright (17).

Pesou-se assepticamente, em embalagem plástica estéril, 25g de cada amostra e adicionou-se 225ml de caldo de enriquecimento para *Listeria* (LEB, formulação UVM-1) (Oxoid, UK). Após homogeneização, diluições decimais foram inoculadas em séries de três tubos de caldo LEB, que foram incubados a 30°C por 24h. Alíquotas de 0,1ml foram transferidas para tubos contendo caldo Fraser (Oxoid), que foram incubados a 35°C por 24-48h.

A partir de cada tubo de caldo Fraser enegrecido (positivo), procedeu-se à semeadura em placas dos ágar seletivos Oxford (OXA) e PALCAM (PAL) (ambos Oxoid), que foram incubadas a 35°C por 48h.

De 3 a 5 colônias típicas de cada placa foram purificadas em ágar soja triptona adicionado de 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE) (ambos Oxoid) e submetidas aos testes de produção de catalase, de hemólise, fermentação de dextrose, xilose, ramnose e manitol e motilidade em ágar semi sólido a 25 °C (16).

Após a confirmação das cepas como sendo *L. monocytogenes*, calculou-se o Número Mais Provável por grama (NMP/g) do microrganismo, consultando-se a tabela de NMP (17).

As cepas de *L. monocytogenes* isoladas foram sorogrupadas utilizando-se antisoros tipo 1 e 4 (Difco, USA) e sorotipadas empregando-se o kit "Listeria antisera Seiken" (Denka Seiken, Japão).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

*L. monocytogenes* foi detectada em 3 (6,7%) amostras das 45 analisadas, sendo a população de 9,2 NMP/g para todas as amostras positivas.

Resultados semelhantes foram encontrados por Moreno et al. (9), na Espanha, que analisando 559 amostras de produtos cárneos, encontraram 6,6% das amostras com *L. monocytogenes* e por Vorster et al. (18), na África do Sul, que encontraram 8,2% das amostras de carnes processadas contaminadas com *Listeria*.

Em um levantamento realizado entre 1990 e 1999, pelo "Food Safety and Inspection Services (FSIS)" dos EUA, em 1800 estabelecimentos, verificou-se que a prevalência de *L. monocytogenes* variou de 0,52% a 5,16%, nos diferentes tipos de derivados de aves e de carnes prontos para o consumo. Embutidos fermentados secos, ou semi-secos, só foram avaliados entre 1997 e 1999 e a prevalência de *L. monocytogenes* foi de 3,25% (19).

No Brasil, Borges et al. (20) analisaram 81 amostras de 4

tipos diferentes de salame (Friolan, Hamburguês, Italiano e Milanês), de 5 marcas comerciais diferentes, compradas no Rio de Janeiro. Dentre as amostras positivas para *Listeria* sp, *L. monocytogenes* foi isolada em 13,3%.

A ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos embalados a vácuo foi estudada por Grau e Vanderlinde (21). Eles verificaram que 78 (44%) das amostras examinadas abrigavam *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* não foi encontrada nas 19 amostras de salame analisadas.

Becker et al. (22), na Alemanha, analisaram 287 amostras de embutidos cárneos cozidos e encontraram *L. monocytogenes* em 30 (10,5%) destas amostras.

Campillo et al (23) pesquisaram, na Espanha, a incidência de *L. monocytogenes* em 8 tipos de produtos cárneos e observaram que das 175 amostras analisadas, o patógeno foi encontrado em 11,4%.

Dados sobre a população de *L. monocytogenes* em produtos cárneos embalados à vácuo ainda são escassos. A maioria dos estudos refere-se à presença ou ausência do microrganismo. O plaqueamento direto em ágar seletivo de alíquotas do produto pode não ser eficaz pois as células de *L. monocytogenes* podem estar estressadas ou podem estar presentes em número pequeno, não sendo possível sua enumeração. A técnica do número mais provável permite a recuperação das células estressadas e a detecção do microrganismo mesmo quando a população é baixa. Entretanto é laboriosa e de alto custo. A população de *L. monocytogenes* encontrada nas amostras de salame na presente pesquisa ficou entre <0,3 NMP/g a 9,2 NMP/g. Esta população, apesar de aparentemente baixa, deve ser considerada com cautela, uma vez que a dose infecciosa necessária para provocar a listeriose ainda não está estabelecida.

Nos estudos onde a população foi avaliada, os dados são bem variados. Schmidt (24) encontrou *L. monocytogenes* em 17% das amostras de embutidos cozidos embalados a vácuo. As populações variaram entre <100 UFC/g e 200 UFC/g.

Grau e Vanderlinde (21), na Austrália, enumeraram *L. monocytogenes* em 130 amostras de produtos cárneos embalados à vácuo e encontraram populações maiores que 1000 UFC/g em sete amostras.

Todas as cepas isoladas neste estudo pertenceram ao sorogrupo 1, sendo duas 1/2a e uma 1/2b. Este dado é preocupante pois sabe-se que a maioria (>95%) dos casos de listeriose humana é provocada por cepas de *Listeria monocytogenes* pertencentes aos sorotipos 1/2a, 1/2b ou 4b (1).

Farber et al. (25), pesquisando a presença de *Listeria* em alimentos, encontraram *L. monocytogenes* em 20% das amostras de embutidos curados secos analisados, sendo mais de 80% das *L. monocytogenes* isoladas pertencentes ao sorogrupo 1.

O predomínio de cepas de *L. monocytogenes* do sorogrupo 1 em carnes e produtos cárneos pesquisados em diversos países foi relatado por Farber e Peterkin (26). A razão para que isso ocorra ainda não está determinada.

A ocorrência de *L. monocytogenes* em salames pode ser decorrência da presença deste patógeno na matéria prima e sobrevivência ao processo tecnológico (27, 28, 29) ou devida à contaminação cruzada durante o processo de fatiamento. Uyttendaele (30) observou, na Bélgica, que a incidência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos aumentava de 1,56% no produto íntegro para 6,65% no produto fatiado.

A implantação de programas de Boas Práticas de Fabricação (Good Manufacturing Practices) e de sistemas como o HACCP, que permitem atuar nas diversas etapas da produção, são fundamentais para que se obtenha alimentos prontos para o consumo de baixo risco para a saúde do consumidor.

## AGRADECIMENTO

À Oxoid do Brasil pela doação do kit para sorotipagem de *L. monocytogenes*.

## REFERÊNCIAS

1. Ryser ET, Marth EH. *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1999.
2. Anônimo. Recommendations by the National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods: The ecology of *Listeria monocytogenes*. USDA, FSIS, Washington, D.C. Inter. J. Food Microbiol. 1991; 14: 194-201.
3. Roberts TA, Baird-parker AC., Tompkin RB. Microorganisms in foods 5 – Microbiological specifications of food pathogens. London: Blackie Academic & Professional; 1996.
4. Norrung B, Andersen JK, Schlundt J. Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. Int. J. Food Microbiol. 1999; 53: 195-203.
5. Rocourt J, Cossart P. *Listeria monocytogenes*. En: Doyle MP; Beuchat LR., Montville TJ. Food Microbiology – Fundamentals and Frontiers. Washington D.C.: ASM Press; 1997. p. 337-52.
6. Destro MT, Serrano AM, Kabuk DY. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. Food Control 1991; 2: 110-2.
7. Farber J.M, Daley E. Presence of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated meats. Int J Food Microbiol. 1994; 22: 33-42.
8. Mañeru L, García-Jalón I. *Listeria monocytogenes* en alimentos disponibles en el mercado de Pamplona. Alimentaria 1995; 33: 39-43.
9. Moreno P, Plá S, Fagoaga F, García M, Torregrosa A. Calidad microbiologica de los productos carnicos de las areas de salud de Alcoi y Xativa durante el trieno 1993-1995. Alimentaria 1997; May: 37-41.

10. Rigiens NP, Jannes G, Herman LMF. Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat chicken and turkey products determined by polymerase chain reaction and line probe assay hybridization. *J Food Prot.* 1997; 60: 548-50.
11. Center for Disease Control (CDC) Multistate outbreak of listeriosis – United States [citada 2000, December 22]. Se consigue en: URL: <http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/wk/mm4950.pdf>
12. Vaillant V, Valk H, Rocourt J, Stainer F, Pierre O, Goulet V. Two consecutive nationwide outbreaks of Listeriosis, France, October 1999 - February 2000, Proceedings of the XIV ISOPOL; 2001 May 13-16; Mannheim, Germany. p. 171.
13. Tham W, Ericsson H, Helmersson S, Netterby T, Unnerstad H, Danielsson-Tham ML. Vacuum packed gravad or cold-smoked rainbow trout / salmon once more the cause of an outbreak of listeriosis?, Proceedings of the XIV ISOPOL; 2001 May 13-16; Mannheim, Germany. p. 168.
14. Brasil. Ministério da Agricultura. Instrução Informativa de 03/08/00 publicada no Diário Oficial da União, de 03/08/00 – Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Salame. Anexo V. Se consigue em: URL: [http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/instnorm22\\_salame5.htm](http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/instnorm22_salame5.htm)
15. Johnson JL, Doyle MP, Cassens RG. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products – A review. *J. Food Prot.* 1990; 53: 81-91.
16. Pagotto F, Daley E, Farber J, Warburton D. Isolation of *Listeria monocytogenes* of all food and environmental samples. En: Compendium of Analytical Methods. Vol.3. Se consigue em: URL: <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/english/publications/compendium/index.html>
17. Garthright WE. Most Probable Number from Serial Dilutions In: Bacteriological Analytical Manual – FDA 8<sup>th</sup> Ed. Revision A – AOAC International, USA, Appendix 2, 1998.
18. Vorster SM, Greebe RP, Nortjé GL. The incidence of *Listeria* in processed meats in South Africa. *J Food Prot.* 1993; 56: 169-72.
19. Levine P, Rose B, Green S, Ranson G, Hill W. Pathogen testing of ready-to-eat meat and poultry products collected at federally inspected establishments in the United States, 1990 to 1999. *J Food Prot.* 2001; 64: 1188-93.
20. Borges MF, Siqueira RS, Bittencourt AM, Vanetti MCD, Gomide LAM. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in salami. *Revista de Microbiologia* 1999; 30: 362-4.
21. Grau FH, Vanderlinde PB. Occurrence, numbers, and growth of *Listeria monocytogenes* on some vacuum-packaged processed meats. *J. Food Prot.* 1992; 55: 4-7.
22. Becker B, Trierweiler B, Fechner J, Holzapfel WH. Presence of *L. monocytogenes* in samples of cooked sausages. Proceedings of the XIV ISOPOL; 2001 May 13-16; Mannheim, Germany. p. 132-5.
23. Campillo JIG, Domínguez Fernández MC, Zumalacárregui Rodríguez JM. Incidencia de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7 en carnes y productos carnicos comercializados en Castilla y Leon. *Alimentaria* 1999; Jun: 71-5.
24. Schmidt U, Kaya M. Bedeutung des Vorkommens von Listerien bei Fleisch und Fleischerzeugnissen. Apud: Becker B, Trierweiler B, Fechner J, Holzapfel WH. Presence of *L. monocytogenes* in samples of cooked sausages, Proceedings of the XIV ISOPOL; 2001 May 13-16; Mannheim, Germany. p. 132-5.
25. Farber JM, Sanders GW, Johnston MA. A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. *J. Food Prot.* 1989; 52: 456-8.
26. Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. *Microbiol. Rev.* 1991; 55: 476-511.
27. Nissen H, Holck A. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* kentucky in Norwegian fermented, dry sausage. *Food Microbiol.* 1998; 15: 273-9.
28. Campaninni M, Pedrazzoni I, Barbuti S, Baldini P. Behavior of *Listeria monocytogenes* during the maturation of naturally and artificially contaminated salami: effect of lactic-acid bacteria starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 1993; 20: 169-75.
29. Lahti E, Johansson T, Honkanen-Buzalski T, Hill P, Nurmi E. Survival and detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* during the manufacture of dry sausage using two different starter cultures. *Food Microbiol.* 2001; 18: 75-85.
30. Uyttendaele M, De Troy P, Debevere J. Incidence of *Listeria monocytogenes* in diferents types of meat products on the Belgian retail market. *Int. J Food Microbiol.* 1999; 53: 75-80.

Recibido: 24-04-2002

Aceptado: 29-10-2002