

OCORRÊNCIA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM QUEIJO DO TIPO MINAS FRESCAL COMERCIALIZADO NA CIDADE DE BARRA MANSA, RJ*

DANIELE TAVARES VIEIRA DA SILVA¹
RAQUEL DE CASTRO TRINDADE²
CRISTHIANE MOURA FALAVINA DOS REIS³
SYLVIA EILEEN CARTES CABEZAS⁴
ÉRICA LOURO DA FONSECA⁵

1. Graduanda do Curso de Farmácia, Centro Universitário de Barra Mansa-UBM, Barra Mansa, RJ.
2. Pós graduada em Análises Clínicas, Centro Universitário de Barra Mansa-UBM, Barra Mansa, RJ.
3. Farmacêutica, Universidade Estácio de Sá, RJ.
4. Química, Universidade de Concepción, Chile. Pós Graduada, Ensino de Ciências, Universidade Federal Fluminense-UFF.
5. Doutora em Ciências, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

Autor concorrente: D.T.V. Silva. E-mail: danatvs@yahoo.com.br

* Trabalho classificado em primeiro lugar no Prêmio Jayme Torres de Farmácia 2010, categoria "Aluno de Farmácia", área de atuação "Alimentos: Importante contribuição profissional do Farmacêutico".

INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é transmitida diretamente, através dos alimentos infectados (carne e leite) ou indiretamente pela contaminação de vegetais, frutas e legumes com fezes contaminadas. A doença por ela provocada, denominada listeriose, é considerada uma zoonose que provoca aborto, infecções perinatais, septicemias e meningoencefalites. Ao contrário dos ruminantes, que apresentam a forma de encefalite, no homem, a forma mais comum é a meningite (LABACVET, 2007).

Apesar da baixa incidência, a doença ganhou importância como enfermidade de origem alimentar, devido à ocorrência dos primeiros surtos na Escócia, Holanda e EUA (JAY, 2005). No início dos anos 80 na América do Norte, foi responsável por casos de aborto, meningite e septicemia, diagnosticada principalmente em pessoas pertencentes a grupos de risco, tais como imunodeprimidos, idosos, crianças e mulheres grávidas. Em meados de 1990, uma nova forma da infecção não invasiva foi reconhecida com sintomas gastrointestinais suaves, afetando pessoas saudáveis, estabelecendo a necessidade de monitoramento sobre sua incidência (CRUZ *et al.*, 2008).

Os animais são fonte direta para a infecção no homem e epidemias humanas têm sido traçadas até fontes de alimentos, incluindo principalmente o leite, os queijos

macios e carnes processadas, conservados sob refrigeração. O crescimento seletivo de *L. monocytogenes* pode ocorrer mesmo durante longos períodos de refrigeração (LABACVET, 2007; PERES, 2007).

O queijo é considerado um veículo frequente de patógenos de origem alimentar e, em especial, os queijos frescos artesanais têm sido muito relatados em surtos de infecção e intoxicação alimentar. Dentre aqueles consumidos no país, o Minas frescal é tipicamente nacional e entrou definitivamente para a dieta do brasileiro, sendo consumido em lanches, café da manhã e até mesmo como sobremesa (BARCELLOS, 2006). Apesar de bastante semelhante ao "Queso Blanco" encontrado em outros países da América Latina, apresenta melhor rendimento (1Kg/7L de leite bovino), e por isso, é comercializado a preço mais acessível e consumido por todas as camadas da população (FURTADO, 1999; ARAÚJO, 2001; EMBRAPA, 2007).

Possui alto teor de umidade (50 a 62%), baixa acidez e sofre intensa manipulação, características favoráveis à contaminação e proliferação bacteriana. Além disso, é ofertado ao consumidor em embalagens plásticas lacradas com fecho metálico, sem vácuo, que acumulam o soro liberado pelo alimento, conferindo um ambiente propício à proliferação de microrganismos e ocasionando alterações em suas propriedades organolépticas (GRANDI, 2005^[12]). A associação desses fatores contribui para a baixa dura-

bilidade do produto, reduzindo seu prazo de validade, que corresponde a aproximadamente 7 dias, se mantido sob refrigeração de até 8°C (PERRY, 2004; MARTINS, 2001).

Diferentes vias podem determinar a contaminação do alimento, destacando-se a produção artesanal por pessoas não treinadas (SILVA & LEITÃO, 1980; LOGUERCIO & ALEIXO, 2001). Sua qualidade muitas vezes é prejudicada pela condição precária de higiene nas fazendas de gado leiteiro, como a ausência de antissepsia dos úberes antes da ordenha e emprego da ordenha manual, aumentando o risco de contaminação do produto (JAY, 2005). Além disso, durante a sua fabricação é necessária a manipulação direta da coalhada para a verificação da coagulação, e com isso, a chance de veiculação de microrganismos ao alimento é aumentada (EMBRAPA, 2007).

Esses riscos inerentes à fabricação deste gênero alimentício são avaliados segundo os padrões microbiológicos sanitários estabelecidos na RDC nº 12/01 (ANVISA), que recomenda a pesquisa de coliformes a 45°C, estafilococos coagulase positivos, *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes*, como indicadores da qualidade deste tipo de produto. Ressaltando-se que o resultado de *Listeria monocytogenes*, e também de *Salmonella spp.*, deve ser expresso como presença/ausência na alíquota analisada.

Tendo em vista que o queijo avaliado não apresentava em seu rótulo qualquer especificação da utilização de leite pasteurizado em sua produção, como o determinado pela legislação vigente (Portaria 352/97, Ministério da Saúde), a possível detecção de *Listeria monocytogenes*, cujo critério é ausência, tornaria este alimento impróprio para consumo (ANVISA, 2001). Em adição, a frequente comercialização de queijo do tipo Minas Frescal sem tal determinação foi o que motivou este estudo, com o objetivo de avaliar a qualidade microbiológica do queijo ofertado à população local, tendo como foco a pesquisa deste microrganismo patogênico, indicador de precariedade higiênico-sanitária, particularmente durante a produção do alimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Foram coletadas 15 amostras de queijo do tipo Minas Frescal de mesma marca, com selo do S.I.F. (Serviço de Inspeção Federal), no período de outubro a dezembro de 2009, em um supermercado localizado no município de Barra Mansa, na região Sul Fluminense. A cada amostragem foram adquiridos 5 queijos com peso médio de 300g, do qual foram retirados aproximadamente 5g de cada para compor a unidade analítica de 25g.

No ponto de coleta, os queijos estavam armazenados em temperaturas que variavam de 1-4°C, e seu transporte foi efetuado utilizando caixa isotérmica contendo conservador biológico para manutenção da temperatura até o momento da análise. Antes da abertura, a área externa das embalagens foi desinfetada com etanol 70% (v/v), a fim de remover os contaminantes e sujidades. O tempo decorrido entre coleta e análise não ultrapassou uma hora.

Com relação à conformidade de rotulagem, os lotes dos queijos estavam ilegíveis, sendo necessário utilizar as datas de fabricação e validade como parâmetro. Não havia indicação na embalagem que o leite utilizado na fabricação dos queijos havia sido pasteurizado.

Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

A metodologia empregada para avaliar a qualidade dos alimentos obedeceu a legislação vigente, salientando-se que a Portaria nº01/87 da Divisão Nacional de Vigilância de Alimentos (DINAL) estabelece como oficiais todos os métodos de análise microbiológica de alimentos da American Public Health Association (APHA) e Food and Drug Administration (FDA), publicados nas últimas edições do Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods e no Bacterial Analytical Manual, respectivamente. Assim, foram utilizadas como referência as etapas de análise descritas no Bacterial Analytical Manual (FDA, 2007; SILVA et. al.,2007), além da qualidade dos alimentos, pautada nos parâmetros fornecidos na RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

As unidades analíticas de 25g foram retiradas assepticamente, com o auxílio de utensílios previamente esterilizados e transferidas para um frasco de homogeneização contendo 225mL de Caldo de Enriquecimento para *Listeria* Tamponado, sem agentes seletivos. A mistura foi homogeneizada e deixada em repouso por 4 horas em temperatura ambiente.

Após este período, foram adicionados os agentes seletivos: 0,455mL de solução de acriflavina 0,5%, 1,8mL de solução de ácido nalidíxico 0,5%, 1,15mL de solução cicloeximida 1%, e mantido em repouso por mais 44 horas em temperatura ambiente.

Com o auxílio de uma alça bacteriológica, estriaram-se por esgotamento, a partir do Caldo Enriquecido, placas contendo Agar Palcam Seletivo para *Listeria* (doado pelo IOC/Fiocruz). As placas foram incubadas a 35° C por 48 horas. Após este período, colônias suspeitas foram semeadas em Agar ou Caldo Tripticaseína de Soja.

A partir do crescimento obtido, foram realizados testes de catalase, coloração de Gram e motilidade para a confirmação preliminar do gênero bacteriano. Na confir-

mação definitiva de espécie, foram executados os testes de verificação de hemólise em Agar Sangue nº 2 a 35°C de 24-48 horas e de fermentação de carboidratos em Caldo Púrpura Base Suplementado com 0,5% de carboidrato (dextrose, xilose, rhamnose, manitol, maltose) e hidrólise da esculina a 35°C por 7 dias.

Ressalta-se que a identificação do gênero foi realizada no Laboratório de Microbiologia / Higiene dos Alimentos do Centro Universitário de Barra Mansa – UBM, no Campus Barra Mansa, e a confirmação de espécie, no Setor de Listeriose do Laboratório de Zoonoses Bacterianas, IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

RESULTADOS

É determinado pela legislação brasileira que o leite utilizado na produção de queijos deve ser submetido a tratamento térmico. O não cumprimento dessa norma aumenta significativamente o risco à saúde pública, pois o leite poderá estar contaminado com microrganismos patogênicos, tais como *Listeria monocytogenes*. O Ministério da Saúde, através da Resolução nº 12 de 2001 (ANVISA), estabelece a quantidade máxima de microrganismos em alimentos, para que possam ser consumidos com segurança, determinando a ausência desse microrganismo em uma alíquota de 25 gramas de amostra, para queijos do tipo Minas Frescal.

Com relação à rotulagem do produto, não foi possível identificar os números de lote, estando presente o número de registro no S.I.F., o qual foi verificado como ativo.

Das 15 amostras analisadas, *Listeria monocytogenes* foi detectada em 5 (33,3%), ressaltando-se que para compor esta amostragem, foi considerado o soro em contato com o alimento, o mesmo não ocorrendo nas amostras negativas.

DISCUSSÃO

No Brasil e em outros países em desenvolvimento, além da falta de preocupação por parte das autoridades de saúde pública em relação à sua disseminação, não há estatísticas oficiais de casos de listeriose, pois sua notificação não é de caráter obrigatório. Este fato pode justificar a baixa incidência reportada no país. Entretanto, a listeriose representa relevante risco à saúde pública, pela severidade das sequelas e do alto índice de mortalidade em populações de risco (20% a 30%), como indivíduos imunocomprometidos, idosos e gestantes (CRUZ *et al.* 2008).

O primeiro isolamento de *L. monocytogenes* foi em 1958 por Pacheco, Reis & Dias, no Rio de Janeiro. Desde então, *L. monocytogenes* vem sendo isolada com frequência em vários alimentos no Brasil, embora não se tenham relatos de surtos de listeriose associados ao consumo de alimentos (HOFER, 2001).

Segundo PERES (2007^[18]), a ocorrência deste patógeno pode ser atribuída às más condições higiênico-sanitárias na elaboração do alimento, em particular aqueles produzidos de forma artesanal. Sob outro aspecto, o leite utilizado na fabricação de derivados constitui um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de diversos microrganismos, devido ao pH próximo à neutralidade e sua composição rica em nutrientes, representando a fonte primária da contaminação e, por isso, implicando em surtos de doenças de transmissão alimentar (DTAs) atribuídas ao consumo do queijo fresco artesanal.

O leite utilizado na produção de queijos frescos tem, obrigatoriamente, que ser pasteurizado. Entretanto, a fabricação do queijo do tipo Minas frescal nas regiões das Serras da Canastra, Serro e Salitre em Minas Gerais desde os tempos coloniais não inclui o tratamento térmico do leite, tradicionalmente. Acredita-se que o queijo produzido seja mantido por 20 dias em maturação, associado ao fermento utilizado, conhecido como pingo, que seria o componente responsável pela eliminação de bactérias patogênicas que possam estar presentes (BRANT *et al.*, 2007).

Assim, a boa qualidade microbiológica do leite, seja ele pasteurizado ou cru, é fundamental para a preparação de bons queijos. Ela pressupõe um gado saudável, boas práticas de higiene na ordenha e no manuseio do leite, higienização eficiente dos equipamentos e utensílios utilizados e, finalmente, o resfriamento do leite a temperaturas entre 0-4 °C, no máximo 2 horas após a ordenha (PERRY, 2004).

Sendo *L. monocytogenes* uma bactéria psicrófila, capaz de multiplicar-se em uma ampla faixa de temperatura (1-45°C) e pH (4.3-9.6) e tolerar concentrações salinas superiores a 10% (CRUZ *et al.*, 2008), a ausência de pasteurização do leite ou eliminação do microrganismo durante a maturação, e mesmo a obediência ao resfriamento do leite após a ordenha, proporcionariam a sobrevivência do microrganismo no produto ofertado ao consumo.

Interessantemente, *L. monocytogenes* foi encontrada nas amostras em que se considerou o lactossoro, não sendo observada naquelas onde somente o conteúdo sólido dos queijos foi avaliado. O soro lácteo pode ser definido como a fração aquosa do leite que é separada da caseína durante a produção de queijos, correspondendo a cerca de 90% do volume do leite, levando consigo 50 a 55% dos sólidos totais do mesmo. Por isso, sob o aspecto

microbiológico, o soro é um produto de alto valor nutritivo, ofertando condições ideais de umidade e pH, que constituem ambiente propício ao crescimento microbiano (TEIXEIRA *et al.*, 2007), inclusive do microrganismo em questão.

Não existem padrões brasileiros para a inspeção do soro, seja ela físico-química ou microbiológica (TEIXEIRA, 2005). Todavia, a metade da produção mundial de lactosoro vem sendo transformada em outros produtos, como bebidas lácteas, a fim de evitar a poluição ambiental devido a sua alta demanda biológica de oxigênio (ALMEIDA *et al.*, 2001).

TEIXEIRA *et al.* (2007) pesquisaram a qualidade microbiológica do soro lácteo e identificaram que as boas práticas de fabricação (BPF) não estavam sendo efetivamente aplicadas, ressaltando ainda que a contaminação observada provinha do processamento, apontando para a falha na higienização dos utensílios utilizados e dos próprios manipuladores.

Todos os produtos de origem animal comercializados devem ter garantia de qualidade estampada nos rótulos para serem comercializados. A autorização para o comércio do produto é concedida após análise de requisitos básicos de interesse do consumidor, como denominação de venda, prazo de validade, data de fabricação e condições de conservação. Após a concessão do registro, inicia-se o processo de produção, acompanhado e monitorado pelos fiscais do Serviço de Inspeção Federal (SIF), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Entretanto, o responsável pela inocuidade e qualidade do produto é o fabricante, conforme definido no Código de Defesa do Consumidor (MAPA, 2010).

Embora não seja possível apontar o soro lácteo como a origem da contaminação por *Listeria monocytogenes*, o presente estudo vem ressaltar a necessidade da validação de técnicas de inspeção e da elaboração dos padrões de identidade e qualidade do soro do queijo. Além disso, é reconhecida a carência de informações sobre este patógeno em nosso país, o que dificulta o estabelecimento da relação entre a sua ocorrência em amostras clínicas e o tipo de alimento consumido pela população, haja vista que diversos autores não obtiveram sucesso no isolamento deste agente neste tipo de alimento (PERESI *et al.*, 2001; SALOTTI *et al.*, 2006).

CONCLUSÕES

Embora não seja possível prever ou detectar a fonte de contaminação, o encontro desta bactéria permitiu classificar o queijo como impróprio para o consumo, segundo critérios da RDC nº 12/01 para amostra indicativa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Dr. Ernesto Hofer pela doação dos meios de cultura para isolamento de *Listeria monocytogenes* e permissão da execução dos testes realizados pela FIOCRUZ para a confirmação da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, K. E., BONASSI, I. A., ROÇA, R. O. **Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de Queijo Minas Frescal**. Ciênc. Tecnol. Aliment. Vol.21 no.2 Campinas Mai/Ago 2001.
- ARAÚJO, V.S.; PAGLIARES, V.A.; QUEIROZ, M.L.; FREITAS-ALMEIDA, A.C. **Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil**. Journal of Applied Microbiology, v. 92, n. 6, p. 1172-1177, 2002.
- BARCELLOS, T. G., **Pesquisa de *E.coli* em Queijo Minas Frescal oriundos de feiras livres no Distrito Federal**. Monografia – Curso de Especialização em Qualidade de Alimentos, Brasília – DF, Março, 2006.
- BRANT, L. M. F., FONSECA, L. M., SILVA, M. C. C. **Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.59, n.6, p.1570-1574, 2007
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução no. 12, de 2 de janeiro de 2001. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, revogando a Portaria SVS/MS no. 451, de 19 de setembro de 1997. **Diário Oficial da União**, Brasília, Jan. 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Portaria no. 352, de 4 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. **Publicado no Diário Oficial da União** de 08/09/1997, Seção 1, Página 19684
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria no. 01, de 28 de janeiro de 1987. **Diário Oficial da União**, Seção 1. Brasília, DF, p.2197-2200. 1987.
- CRUZ C. D.; MARTINEZ, M. B.; DESTRO, M. T. ***Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil**. Alim. Nutr. Araraquara, v. 19, no. 2, p. 195-206, abr./jun. 2008.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, **Como Fabricar Queijo Minas Frescal**, 2007. Disponível em: <<http://www.cpatu.embrapa.br/eu-querio/2007/novembro/fabricar-queijo-minas-frescal>> Acesso em 06 Set 2010.
- FDA. Food and Drug Administration of U.S. **Bacterial Analytical Manual**. Disponível em:<<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM063335>> Acesso em 08 Set. 2010.

- FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção.** São Paulo: Fonte, 1999. 176p.
- GRANDI, A.Z.; ROSSI, D.A. **Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado na cidade de Uberlândia – MG, 2005.** Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/horizontecientifico/article/viewFile/3825/2830>>. Acesso em 10 Mar 10.
- HOFER, E. **Três decênios de experiência sobre *Listeria* no Brasil. In: Ciência de Alimentos – avanços e perspectivas.** Ed. Mercadantes, AZ; Bobbio, FO; Bobbio, PA; Pereira, JL; Pastore, GM. FEA/UNICAMP, 2001. vol. II, cap. 33, p. 111-115.
- JAY, J. M. **Listerioses de Origem Animal. In: Microbiologia de Alimentos.** 6.ed.Porto alegre: Artmed, 2005, cap.25, p. 517-542.
- LOGUERCIO, A.P.; ALEIXO, J.A.G. **Microbiologia de queijo tipo Minas frescal produzido artesanalmente.** Ciên. Rural, v.31, p.1063-1067, 2001.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **MAPA 150 anos: alimentando o Brasil, produzindo para o mundo. Agronotícias. Acessoria de Comunicação Social.** Disponível em < <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/url/ITEM/8ECB384EA006DB1E040A8C075021A91>> Acesso em 26 Set 2010.
- MARTINS, E. **Patrimônio de Minas.** Rev. Econ. Jornal Estado de Minas, no.44, p. 14-17, dez 2001.
- PERES, N. D. **Deteção de *Listeria monocytogenes* em leite: sensibilidade e especificidade da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).** 2007. 43 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2007.
- PERESI, J. T. M.; GRACIANO, R. A. S.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; LIMA, S. I.; RIBEIRO, A. K.; CARVALHO, I. S.; LIMA, M. **Queijo Minas tipo frescal artesanal e industrial, qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos.** Rev. Higiene Alimentar, São Paulo, v. 15, no. 83, p. 63-70, abr. 2001.
- PERRY, K.S.P. **Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos.** Quím. Nova. São Paulo, v.27, p.293-300, 2004.
- SALOTTI, B. M., CARVALHO, A. C. F. B., AMARAL, L. A., VIDAL-MARTINS, A. M. C., CORTEZ, **Qualidade Microbiológica do Queijo Minas Frescal comercializado no Município de Jaboticabal, SP, Brasil.** Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.73, p.171-175, Abr/Jun, 2006.
- SILVA, C.A.M., LEITÃO, M.F. de F. **“Influência da temperatura de armazenamento na proliferação microbiana e no tempo de vida útil de queijo tipo “Minas Frescal”.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 4, 1980, Rio de Janeiro. Programa Oficial, Resumos. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1980. p.186.
- SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A., SILVEIRA, N.F.A. ***Listeria monocytogenes*.** In: **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**, 3 ed. – São Paulo, 2007, cap.18, p.237 – 251.
- TEIXEIRA, L.V. **Avaliação da qualidade físicoquímica e microbiológica do soro de queijos minas padrão e mussarela produzidos em quatro regiões de Minas Gerais.** 2005. 42f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- TEIXEIRA, L. V.; FONSECA, L. M.; MENEZES, L. D. M. **Avaliação microbiológica do soro de queijos Minas padrão e mozzarella produzidos em quatro regiões do estado de Minas Gerais.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Belo Horizonte, v. 59, no. 1, p. 264-267, 2007.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL/UFRGS (LABACVET). **Gênero *Listeria* spp.** 2007. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labacvet/pdf/listeria.pdf>>. Acesso em 19 set. 2010.