

Ocorrência de bactérias do gênero *Listeria* em leite cru e pasteurizado em Goiânia, Goiás*

Occurrence of bacteria of the genus *Listeria* in raw milk and pasteurized milk in Goiânia, Goiás

Antonio Nonato de Oliveira,** Albenones José de Mesquita,** Iolanda Aparecida Nunes,** Teófilo José Pimentel da Silva,** e Moacir Evandro Lage**

Resumo

Objetivando conhecer a ocorrência de *Listeria* spp. em leites cru e pasteurizado tipo "C", bem como avaliar a eficiência de dois caldos de enriquecimento e de dois meios sólidos seletivos utilizados no isolamento e identificação deste gênero bacteriano, foram colhidas 100 amostras, sendo 50 de cada tipo de produto. A metodologia adotada foi semelhante à proposta por McClain e Lee (1988). Observou-se positividade de 8% para listérias (4/50) nas amostras de leite cru, enquanto que no leite pasteurizado o microrganismo não foi detectado. A espécie *L. monocytogenes* não foi isolada.

Palavras-chave: *Listeria*; leite cru; leite pasteurizado.

Introdução

As bactérias do gênero *Listeria*, particularmente *L. monocytogenes*, representam hoje um grande dilema para as indústrias de alimentos, principalmente para aquelas que fabricam produtos lácteos, uma vez que os mesmos têm sido comprovadamente relacionados a surtos de listeriose de origem alimentar causados por esta bactéria.

Os alimentos, especialmente os de origem animal, dentre eles o leite e seus derivados, exercem importante papel na transmissão indireta da listeriose humana, representando um grande perigo (Goret e Oudar, 1965).

Rodriguez et al. (1985) examinaram 95 amostras de leite cru destinado ao consumo humano, provenientes de uma indústria leiteira em Madri, Espanha, em um período de 16 meses; encontraram um percentual de positividade de 89,5% para *L. grayi*, 45,3% para *L. monocytogenes*, 15,8% para *L. innocua*, 3,1% para *L. welshimeri* e 1,05% para *L. ivanovii*. *L. murrayi* e *L. denitrificans* não foram detectadas.

Lovett et al. (1987) estudaram a ocorrência de *Listeria* spp. em 650 amostras de leite cru procedente de três estados dos EUA, no período de outubro de 1984 a agosto de 1985, obtendo 4,2% de contaminação por *L. monocytogenes* e 7,7% por *L. innocua*, enquanto que *L. ivanovii*, *L. welshimeri* e *L. seeligeri* ocorreram em menos de 1% das amostras analisadas.

Stone (1987), objetivando o isolamento de *Listeria* spp. em 71 amostras de leite cru proveniente de um laticínio

da Nova Zelândia, verificou índices de 14% e 1,4% para *L. innocua* e *L. welshimeri*, respectivamente. *L. monocytogenes* não foi detectada nestas amostras.

Em Ontário, Canadá, Farber et al. (1988) examinaram 445 amostras de leite cru, oriundo de tanques de armazenamento, visando a isolar *Listeria* spp. A ocorrência foi de 12,4%, sendo *L. innocua* a espécie mais freqüente, revelando uma positividade de 9,7%, seguida pela *L. monocytogenes* e *L. welshimeri*, com 1,3%. As demais espécies do gênero não foram isoladas.

Liewen e Plautz (1988), em Nebraska, EUA, analisaram 200 amostras de leite cru, detectando freqüência de 9% para o gênero *Listeria*, dos quais 5% pertenciam à *L. monocytogenes* e 4% à *L. innocua*.

Durante um período de um ano, Slade et al. (1988) examinaram 315 amostras de leite cru, em Ontário, Canadá, com vistas ao isolamento de *Listeria* spp. Os autores verificaram que 11,4% do produto analisado encontravam-se contaminados por bactérias deste gênero, no entanto, não observaram influências das estações do ano sobre a presença do microrganismo no leite cru.

Na Escócia, Fenlon e Wilson (1989) investigaram a ocorrência de *L. monocytogenes* em 180 amostras de leite cru de latões. A presença da bactéria oscilou de 3,8%, no verão, a 1%, no outono.

No Brasil, Destro (1990), analisando 20 amostras de leite cru e 20 de leite pasteurizado, detectou positividade de

* Parte da Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Inspeção de Carne, Leite e Derivados, apresentada à UFMG. Trabalho financiado pelo CNPq.

** Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Goiás; CP 131 - CEP 74001-970, Goiânia, GO.

*** Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense; CEP 24230-340 - Niterói, RJ.

10% para *Listeria* spp. no leite cru e a sua ausência no produto pasteurizado.

Apesar do considerável registro de sua presença em leite e derivados, a frequência das bactérias do gênero *Listeria* ainda não é de todo conhecida, sendo necessários maiores estudos para complementação destes dados. Considerando-se a relevância do assunto, o presente trabalho tem como objetivos determinar a ocorrência de bactérias deste gênero em leites cru e pasteurizado tipo "C", verificar a necessidade do emprego de enriquecimento em duplos estágios e avaliar a eficiência dos meios sólidos seletivos empregados na metodologia de isolamento.

Material e métodos

Foram colhidas na plataforma de recepção de uma indústria de laticínios e no comércio varejista de Goiânia, GO, 50 amostras de leite cru e 50 de leite pasteurizado tipo "C". Após a colheita, as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo e transportadas ao Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, sendo processadas logo após a sua chegada.

Para o isolamento dos microrganismos, empregou-se metodologia semelhante à proposta por McClain e Lee (1989), ligeiramente modificada.

Nos estágios de enriquecimento primário de secundário foram empregados os caldos "University of Vermont" (UVM₁) (Donnelly e Baigent, 1986; Fraser e Sperber, 1988).

Para o plaqueamento seletivo foram utilizados os ágares LPM (cloreto de lítio-feniletanol-moxalactam) (Lee e McClain, 1986) e MOX (ágar moxalactam) (McClain e Lee, 1989), sendo este último uma modificação do ágar Oxford, de Curtis (1989).

As alterações foram conduzidas no período de incubação das fases de enriquecimento primário e secundário e plaqueamento seletivo, que passaram de 24 para 48 horas.

As colônias isoladas e suspeitas de pertencerem ao gênero *Listeria* foram purificadas em ágar soja-trypticase suplementado com extrato de levedura (TSA/YE) e, em seguida, submetidas à confirmação bioquímica, conforme as recomendações de Lovett (1988). Aquelas que apresentaram perfil bioquímico compatível com as espécies do gênero foram encaminhadas ao Departamento de Bacteriologia da Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, para tipificação sorológica.

Resultados e discussão

A ocorrência de *Listeria* spp. e a distribuição das amostras positivas de leites cru e pasteurizado tipo "C" encontram-se ilustradas na Tabela 1.

Observou-se que a positividade para *Listeria* spp., no conjunto das amostras analisadas, foi de 4% (4/100). As amostras de leite cru apresentaram níveis de contaminação por *Listeria* spp. de 8% (4/50), enquanto se constatou a sua ausência no produto pasteurizado. *L. innocua* sorovar 6a foi identificada em todas as amostras positivas obtidas (100%), não tendo sido verificada a presença de *L. monocytogenes* ou outras espécies.

Em relação ao leite cru, os resultados obtidos para o gênero *Listeria* assemelharam-se aos descritos por Lovett et al. (1987), os quais encontraram 7,7% de amostras positivas para *L. innocua*, Farber et al. (1988) observaram uma positividade de 9,7% para a espécie, enquanto, Liewen e Plautz (1988) verificaram 4% de amostras positivas também para *L. innocua*.

No que se refere ao leite pasteurizado, não se obteve o isolamento de *Listeria* sp., em conformidade com os dados de Destro (1990). Tais resultados corroboram a posição dos pesquisadores de listeriose de origem alimentar da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1988), que consideram a pasteurização um tratamento eficiente para a redução do nível de listerias no leite.

Tabela 1: Frequência de *Listeria* spp. em amostras de leites cru e pasteurizado tipo "C" em Goiânia, GO.

Produto	Total*	Espécie/Sorovar. <i>L. innocua</i> 6a (%)
Leite cru	4/50	8,00
Leite pasteurizado tipo "C"	0/50	
Total	4/100	4,00

* Número de amostras positivas sobre o total de amostras analisadas.

A distribuição das amostras positivas para *Listeria* spp. em leites cru e pasteurizado tipo "C", segundo os caldos de enriquecimento e os ágaros seletivos empregados encontra-se na Tabela 2.

Nota-se que, através do enriquecimento primário (caldo UVM₁), foi possível obter duas das quatro amostras positivas detectadas no presente trabalho, tendo sido verificado resultado idêntico quando do uso do enriquecimento primário e secundário.

Embora as amostras identificadas por cada caldo não tenham sido as mesmas, pode-se constatar que os dois procedimentos de enriquecimento forneceram resultados numericamente correspondentes, apesar de o pequeno número de amostras positivas obtidas no presente trabalho ter impossibilitado a realização de tratamento estatístico destes dados e, conseqüentemente, inviabilizado a comparação da eficiência dos meios de enriquecimento.

Tabela 2: Distribuição das amostras positivas para *Listeria spp.* em leites cru e pasteurizado tipo "C", segundo os caldos de enriquecimento e os ágar utilizados.

Produto	Caldo UVM ₁	Caldo Fraser	Ágar LPM	ÁgarMOX
Leite cru	2/4*	2/4	2/4	2/4
Leite pasteurizado	0/0	0/0	0/0	0/0

* Número de amostras positivas no meio sobre o nº total de amostras positivas.

Resultados similares foram relatados por Garcia (1992) e Serafini (1992), em água e produtos cárneos, respectivamente. Por outro lado, Mesquita (1991) obteve desempenho superior, estatisticamente significativo, do enriquecimento secundário para o isolamento de *Listeria* a partir de carne bovina moída, ressaltando-se, porém, que o autor adotou caldos de formulações diferentes da empregada no presente trabalho.

A Tabela 2 evidencia, ainda, os dados relativos às amostras positivas para *Listeria spp.* segundo os ágar seletivos utilizados (ágar LPM e MOX), podendo se constatar que o número de amostras positivas obtidas com o seu uso foi exatamente o mesmo.

De forma semelhante ao destacado anteriormente para os resultados referentes aos caldos, foram identificadas amostras diferentes a partir de cada ágar, o que enfatiza a necessidade da utilização dos dois ágar em associação para que se identificasse o total das amostras positivas obtidas neste trabalho. Por outro lado, o plaqueamento, após o enriquecimento primário, mostrou-se relevante para a detecção de *Listeria* de todas as amostras positivas, conforme pode ser observado na

Abstract

In attempt to verify the occurrence of *Listeria spp.* in raw and type "C" pasteurized milk and evaluate the efficacy of two selective enrichment broths and agars used to isolate and identify bacteria from this genus, 100 samples were analyzed, 50 of each type of product. The methodology used followed that proposed by McClain & Lee (1988), with some modifications. It had been detected a positivity rate of 8% for listerias (4/50) from raw milk samples, but from pasteurized milk no *Listeria* was detected.

Keywords: *Listeria*; milk; raw; pasteurized.

Referências bibliográficas

- CURTIS, G. D. W. et al. Selective differential medium for the isolation of *L. monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 8, p. 95-98, 1989.
- DESTRO, M. T. *Isolamento de Listeria spp. e estudo de sua ocorrência em carnes, leite e derivados*. 1990. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, 1990.

Tabela 2. Novamente, a eficiência dos ágar não pôde ser estabelecida em virtude do pequeno número de amostras positivas.

A literatura não registra trabalhos em que os mesmos ágar tenham sido utilizados para o isolamento de *Listeria* a partir de leite. Por outro lado, os resultados aqui relatados encontram respaldo nos trabalhos de Mesquita (1991) e Garcia (1992), embora estes autores tenham utilizado os ágar LPM, LSAB-CAN e Oxford. Cabe ressaltar que, de forma semelhante ao ágar LSAB-CAN, o ágar MOX se constitui numa modificação no suplemento do ágar Oxford.

Conclusões

De acordo com as condições de realização deste trabalho e tendo em vista os resultados obtidos, parece oportuno concluir que:

- as amostras de leite cru analisadas apresentaram baixa frequência de bactérias do gênero *Listeria*, tendo sido isolada apenas *L. innocua* sorovar 6a, enquanto que o leite pasteurizado tipo "C" mostrou-se isento de contaminação pelo referido gênero;
- a utilização do enriquecimento em duplo estágio, com plaqueamento nos dois ágar, após a incubação de cada um dos caldos, mostrou-se necessária para a obtenção de todas as amostras positivas detectadas no trabalho;
- a eficiência dos enriquecimentos primário e secundário, bem como dos ágar seletivos empregados não pôde ser avaliada, em virtude do reduzido número de amostras positivas.

- DONNELLY, C. W., BAIGENT, G. K. Method for flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 52, no. 4, p. 689-695, 1986.
- FARBER, J. M., SANDERS, G. W., MALCOLM, S. A. The presence of *Listeria sp.* in raw milk in Ontário. *Can. J. Microbiol.*, v. 34, no.2, p. 95-100, 1988.
- FENLON, D. R., WILSON, J. The incidence of *Listeria monocytogenes* in raw milk from farm bulk tanks in north-east Scotland. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 66, no. 3, p. 191-196, 1989.

- FRASER, J. A., SPERBER, W. H. Rapid detection of *Listeria* sp. in food and environmental samples by esculin hidrolisis. *J. Food Prot.*, v. 51, no.10, p. 762-765, 1988.
- GARCIA, C. A. *Listeria* spp. em afluentes e efluentes de matadouros frigoríficos de bovinos. Goiânia-Goiás. 1992. 258 f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade de São Paulo, 1992.
- GORET, P., OUDAR, J. Les listerioses animales. Frequence et incidence eventuelle chez l'home. *Rev. Pathol. Comp. Med. Exp.*, v. 2, n. 5, p. 602-626, 1965. Résumé.
- LEE, W. H., McCLAIN, D. Improved *Listeria monocytogenes* selective ágar. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 52, no. 5, p. 1215-1217, 1986.
- LIEWEN, M. B., PLAUTZ, M. V. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Nebraska. *J. Food Prot.*, v. 51, no. 11, p. 840-841, 1988.
- LOVETT, J., FRANCIS, D. W., HUNT, J. M. *Listeria monocytogenes* in raw milk : Detection, incidence and pathogenicity. *J. Food Prot.*, v. 50, no. 3, p. 188-192, 1987.
- LOVETT, J. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes*. *Food Technol.*, v. 42, no. 4, p.172-175, 1988.
- McCLAIN, D., LEE, W. H. Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria*. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 71, no.3, p. 660-664, 1988.
- _____. FSIS method for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from processed meat and poultry products. Beltsville : USDA/F SIS. 1989. 12 p. (Laboratory Communication, 57.)
- MESQUITA, A. J. *Bactérias do gênero Listeria em carne e água residuária de lavagem de carcaça de matadouro frigorífico e em carne bovina moída, Goiânia*. 1991. 144 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, 1991.
- RODRIGUEZ, D. L. et al. Isolation de microorganismos du genre *Listeria* à partir de lait cru destiné a la consommation humaine. *Can. J. Microbiol.*, v. 31, no. 10, p. 938-941, 1985. Résumé.
- SERAFINI, A. B. *Listeria* spp. : comparação entre metodologias de isolamento em produtos cárneos comercializados em supermercados da cidade de Goiânia, Goiás. 1992. 183 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, 1992.
- SLADE, P. J., COLLINS-THOMPSON, D. L., FLETCHER F. Incidence of *Listeria* species in Ontário raw milk. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, v. 21, no. 4, p. 425-429, 1988.
- STONE, D. L. A survey of raw whole milk for *Compylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, v. 22, no. 3, p. 247-249, 1988.
- WHO Listeriosis. *Bull. WHO.* v. 66, no. 4. p. 421-428, 1988.