



PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Provas bioquímicas para identificação de *Listeria innocua* em alimentos: Revisão bibliográfica

Marco Antônio Pereira da Silva¹; Priscila Alonso dos Santos²; Karen Martins Leão²; Edmar Soares Nicolau³; Antônio Nonato de Oliveira³

¹ Zootecnista, Prof. Dr. Instituto Federal Goiano – *Campus* Rio Verde, Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, CEP – 75901-970, Caixa Postal 66, Rio Verde – GO. e-mail: marcotonyrv@yahoo.com.br

² Médica Veterinária, Profa. Dra. Instituto Federal Goiano – *Campus* Rio Verde, Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, CEP – 75901-970, Caixa Postal 66, Rio Verde – GO. e-mail: prialonso@yahoo.com.br

³ Médico Veterinário, Prof. Dr. Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás

Resumo

O presente estudo objetivou avaliar a presença de *Listeria spp.* em alimentos, gerando informações que auxiliem no controle da bactéria e assegurem a comercialização de alimentos com qualidade higiênico-sanitária. O estudo foi realizado no Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, no período de 18 de setembro de 2006 a 02 de outubro de 2006. O conhecimento que hoje se tem das características dos microrganismos e dos métodos ou processos de controle microbiano permite-se rigorosamente produzir alimentos com grande qualidade microbiológica e,

portanto seguros do ponto de vista sanitário para os consumidores. Recomenda-se como medidas de controle a cocção adequada e boas práticas de higiene durante o processamento do alimento e prevenção da contaminação cruzada.

Palavras-Chave: listeriose; provas bioquímicas; segurança alimentar.

Biochemical tests for identification of *Listeria innocua* in foods: bibliographical revision

Abstract

The present study objectified evaluated the presence of *Listeria spp.* in foods, generating information that assist in the control of the bacterium and assure the food commercialization with hygienical-sanitary quality. The study were carried through in the Centro de Pesquisa em Alimentos of Escola de Veterinária of the Universidade Federal de Goiás, in the period of 18 of September of 2006 the 02 of October of 2006. The knowledge that today if has of the characteristics of the microorganisms and the methods or processes of microbial control is rigorously allowed to produce foods with great microbiological quality, therefore safe of the sanitary point of view for the consumers. One sends regards as measured of control the adequate firing and good practical of hygiene during the processing of the food and prevention of the crossed contamination.

Keywords: listeriosis; biochemical test; alimentary security.

1 INTRODUÇÃO

Durante o processo de produção, elaboração, transporte, armazenamento e distribuição, qualquer alimento está sujeito à contaminação por substâncias tóxicas ou por bactérias patogênicas, vírus e parasitos. O leite, devido à sua riqueza nutritiva, constitui um excelente meio de cultura para o

desenvolvimento de diversos microrganismos, sendo veículo de transmissão de importantes zoonoses para o homem (FRAZIER, 1993).

Conforme FONTOURA (2006), vários surtos de larga escala causados por *Listeria* foram constatados no período entre 1980 e 1990, todos em consequência da transmissão por alimentos. Os surtos diminuiram graças às precauções sanitárias e higiênicas instituídas nas indústrias alimentícias com o objetivo de prevenir a contaminação nos processos de produção e armazenamento.

Uma grande quantidade de *Listeria* em alimentos poderá levar ao aparecimento de uma doença grave. As bactérias poderão contaminar os alimentos através das mãos ou dos utensílios de cozinha. Alguns tipos de infecção poderão passar para outras pessoas. Assim sendo, é importante que uma pessoa com uma intoxicação alimentar lave as suas mãos com cuidado e dedique especial atenção à higiene pessoal.

A bactéria atinge principalmente pessoas com o sistema imunológico comprometido ou ainda em desenvolvimento, como recém-nascidos, idosos, pessoas com câncer, diabetes ou doenças crônico-degenerativas, portadores do vírus da AIDS e principalmente gestantes (FONTOURA, 2006). Pode resistir ao calor, aos sais e aos nitratos, muito mais do que outros microrganismos. Porém, como as demais bactérias, a adequada cocção e a pasteurização a destroem completamente.

A seguir alguns relatos de ocorrência de *Listeria spp.* em alimentos:

A *L. monocytogenes* em salames pode ser decorrência da presença deste patógeno na matéria prima e sobrevivência ao processo tecnológico (CAMPANINNI et al. 1993) ou devido à contaminação cruzada durante o processo de fatiamento. UYTENDAELE et al. 1999) observaram, 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 *Listeria spp.* foi detectada em 9% e 15% das amostras de queijos coalho e manteiga, respectivamente, quando foi utilizado o teste ELISA, mas a presença de *L. monocytogenes* não foi confirmada pelo método convencional.

SOUSA (2002) também, observou *Listeria spp.* em 17,1% das amostras de queijo de coalho artesanal comercializados em Fortaleza-CE, com incidência de 1,4% de *L. monocytogenes*. Por outro lado, SILVA, HOFER & TIBANA (1998) constataram alta incidência (41,17 %) de *L. monocytogenes* em queijo Minas Frescal artesanal.

CATÃO E CEBALLOS (2001) observaram grande diversidade de espécies de *Listeria* em amostras de leite, com predominância de *L. monocytogenes*, seguida por *L. innocua*, e em menores porcentagens, *L. ivanovii* e *L. grayi*. Estas amostras também apresentaram elevados níveis de contaminação fecal. A positividade para *Listeria spp.*, nas amostras de leite pasteurizado, demonstraram que a pasteurização não foi suficiente para eliminação da *Listeria* ou que a contaminação ocorreu pós-processamento.

Cinquenta por cento das amostras de blanquet de peru fatiadas e 60% das amostras de presunto de peru não se enquadraram na legislação vigente, e foram classificadas como potencialmente capazes de causarem enfermidades transmitidas por alimentos, além de consideradas impróprias para consumo pela presença da *Listeria monocytogenes* (ARAÚJO et al., 2002).

A *L. monocytogenes* é patogênica para o homem e diversos animais, e sua ampla distribuição ambiental, igual às outras espécies, é favorecida pela sua capacidade de se desenvolver entre 0°C e 44°C e, embora sua faixa ótima seja entre 30°C e 37°C, pode sobreviver em alimentos congelados. Tolerância a pH extremos de 5 e 9, baixa atividade da água e concentrações de NaCl de 10% e até superiores. Este conjunto de características faz com que a *Listeria spp.* e *L. monocytogenes*, em especial, sejam um patógeno emergente de grande interesse na área de alimentos e explica o destaque que estes microrganismos vêm ocupando nos últimos anos no controle de qualidade na indústria de alimentos, visto as dificuldades de sua eliminação, assim como, a possibilidade de causar uma doença grave no consumidor (LANDGRAF 1997; NOJIMOTO et al. 1994).

Listeria spp. é um bacilo Gram-positivo, não-esporulado, não-produtor de ácidos, aeróbio e anaeróbio facultativo, de ampla distribuição

ambiental, tendo sido isolado de águas superficiais, de esgotos domésticos, águas residuárias de indústrias de laticínios e de abatedouros, de solos, de insetos, de adubo orgânico e em fezes de animais e inclusive de humanos (KONEMAN et al. 1997). Mediante o exposto torna-se importante avaliar a presença de *Listeria spp.* em alimentos, gerando informações que auxiliem no controle da bactéria e assegurem a comercialização de alimentos com qualidade higiênico-sanitária.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, no período de 18 de setembro de 2006 a 02 de outubro de 2006.

3.1 Material

O cultivo bacteriano foi recebido em frasco de vidro transparente contendo a bactéria isolada em cultivo BHI. O cultivo inicialmente foi colhido e semeado em caldo BHI. Em seguida, foram incubados por 24 horas a 35°C. Após esse período as culturas do caldo BHI foram semeadas em ágar sangue, para avaliação da hemólise e provas bioquímicas.

Colônias isoladas de cada placa de ágar TSA-sangue foram escolhidas para uso nos testes de identificação. Porções de tamanho semelhante foram inoculadas em cada tubo da série bioquímica proposta, sempre com especial atenção na esterilização da agulha bacteriológica utilizada antes da inoculação do próximo tubo para não haver carreamento de substratos de um tubo para outro. Os tubos foram então incubados por 24 horas a 35°C antes da leitura e interpretação dos resultados. Os testes foram produzidos em tubo estéril com tampa de polipropileno. As provas envolvendo aminoácidos foram cobertas com 500µL de óleo mineral estéril antes da incubação.

3.2 Métodos

A seguir são descritas as técnicas empregadas para identificação do cultivo.

3.2.1 Gram

Uma vez que a coloração de Gram não é uma técnica infalível, pode-se fazer o teste do hidróxido de potássio. Em um lâmina de microscopia adicionou-se duas gotas de solução de KOH (hidróxido de potássio) a 3%. Com o auxílio de uma alça de sementeira coletou-se uma colônia isolada da bactéria a ser testada e procedeu-se a mistura com a solução de KOH na lâmina por 30 segundos. Durante a mistura a alça de sementeira foi erguida cerca de 1 a 2 cm da superfície da lâmina observando-se ocorreu a formação de fios de material viscoso pendentes (MORETTI, 2006).

3.2.2 Catalase

Foi depositada uma gota da solução de peróxido de hidrogênio em lâmina microscópica em seguida com o uso da alça de platina coletou-se parte do cultivo e inoculou-se na solução para observar a formação ou não de bolhas (HOLMBERG, 1973).

3.2.3 Ágar sangue

As colônias foram semeadas com o auxílio de alça de platina, seguindo a técnica padrão de sementeira e incubadas a 35°C (HARMON et al., 1990).

3.2.4 Contraste de fases

Foi colocada uma gota da suspensão de microrganismos em solução fisiológica (NaCl 0,85% p/v) com uma pipeta de Pasteur, e logo após cobriu-se com uma lamínula, em seguida utilizou-se o mesmo procedimento para microscopia de campo claro, usando o diafragma anular com a objetiva correspondente (BRYCE & POELMA, 1995).

3.2.5 Oxidase

O teste de oxidase foi realizado utilizando-se fitas de oxidase conforme o método descrito por CEFAR (2005).

3.2.6 Esculina

Foi preparado o meio (Peptona-10g; Esculina-1g; Citrato férrico-0,5g; agar-12g; água destilada-q.s.p. 1000mL), em seguida nos tubos inclinados foi semeada a cultura bacteriana conforme técnica usual, a leitura foi realizada com 3 – 4 dias (LELLIOTT & STEAD, 1987).

3.2.7 Glicose, Lactose, Sacarose, Maltose e Gelatina

As colônias foram submetidas à fermentação da glicose, lactose, sacarose, maltose e hidrólise da gelatina, por meio da inoculação com alça de platina (QUINN et al., 1994).

3.2.8 Raminose, Manitol, Xilose

As colônias obtidas na placa foram incubadas a 35°C de acordo com BIER (1980) observando-se raminose, manitol e xilose.

3.2.9 Uréia

A prova consistiu em transferir uma porção do crescimento bacteriano com auxílio de alça de platina para o meio contendo uréia, pH neutro e um indicador de pH, o vermelho fenol (QUINN et al., 1994).

3.2.10 Provas do indol, vermelho de metila e Voges-Proskauer

As provas do indol, vermelho de metila (VM) e Voges-Proskauer (VP) foram realizadas de acordo com a técnica descrita por VANDERZANT & SPLITTSOESSER, (1992).

3.2.11 Nitrato

Os tubos foram então incubados por 24 horas a 35°C antes da leitura e interpretação dos resultados. Na redução do nitrato a nitrito, os testes foram produzidos em tubos de poliestireno estéril com tampa de polipropileno. A leitura da prova de redução do nitrato foi realizada após a adição dos reagentes específicos (ácido sulfanílico 0,8% em ácido acético 5N e alfa-naftilamina 0,6% em ácido acético 5N).

3.2.12 Tríplice-açúcar-ferro

Fez-se a semeadura com agulha em ágar tríplice-açúcar-ferro (TSI) por punctura na base e estrias na superfície, após a inoculação procedeu-se a classificação em cinco grupos de acordo com a fermentação de carboidratos glicose, lactose e sacarose, produção de gás e H₂S (QUINN et al., 1992).

3.2.13 Motilidade

A prova foi efetuada inoculando-se em linha reta, através da técnica da

punctura (com agulha), 2/3 de um meio semi-sólido do tipo ágar motility (POPOFF, 1984).

3.2.14 Oxidase e Fosfatase

As provas de oxidase e fosfatase foram realizadas de acordo com BRANSON (1974).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das provas bioquímicas de identificação de *Listeria innocua* estão descritos na Tabela 1.

Identificar um dado organismo como espécie baseia-se no preenchimento das características atribuídas àquela espécie. O reconhecimento da fonte ou origem do espécime (ambiente, espécie animal, tipo de patologia e localização) do organismo é às vezes fundamental para identificação. A execução inadequada de um teste preliminar pode confundir e prejudicar todo processo de identificação. Na rotina laboratorial são utilizados certos testes chaves para reduzir o trabalho, o custo e abreviar o tempo requerido para diagnóstico.

O processo de identificação dos microrganismos é efetuado através da determinação de um número mínimo de propriedades. Portanto, quanto menor o número de observações efetuadas, maior o risco de erros de identificação. Usualmente é necessário utilizar organismos como controles positivos e negativos para a execução de cada teste.

A seguir são realizadas algumas considerações acerca das provas de identificação de *Listeria spp.*

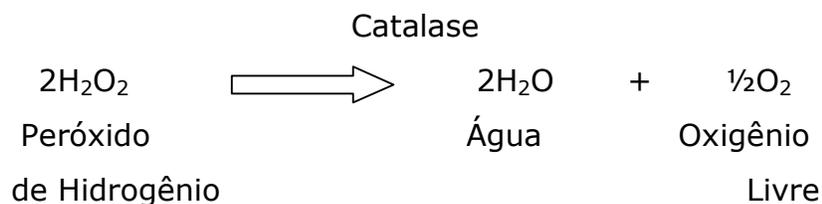
TABELA 01 – Resultados das provas bioquímicas usadas na identificação de *Listeria innocua*.

Provas	Resultados
Catalase	+
Gram	+
Esculina	+
Gelatina	+
Glicose	+
Hemólise	α hemolítica
Indol	-
Lactose	+
Maltose	+
Manitol	-
Motilidade	+
Nitrato	-
Oxidase/Fosfatase	+
Oxidase	-
Raminose	+
Sacarose	-
Uréia	-
Vermelho de metila	+
Voges-Proskauer	+
Xilose	-

Na identificação preliminar de bactérias, devemos primeiramente fazer a coloração de Gram, para verificar a morfologia e cor das bactérias - gram positivas ou gram negativas. É uma coloração diferencial usada para demonstrar as propriedades tintoriais de todos os tipos de bactérias.

A coloração de Gram consiste basicamente em tratar as bactérias com: cristal violeta, lugol, álcool-acetona e fucsina fenicada. O cristal violeta e o lugol penetram tanto nas bactérias Gram-positivas quanto nas Gram-negativas, formando um complexo de cor roxa. O tratamento com álcool-acetona é a etapa diferencial. Nas bactérias Gram-positivas, o álcool-acetona não retira o complexo corado, pois sua ação desidratante faz com que a espessa camada de peptídeoglicano se torne menos permeável, retendo o corante. Nas Gram-negativas, entretanto, devido à pequena espessura da camada basal e às discontinuidades existentes nesta camada, em pontos de aderência entre a membrana externa e a membrana celular, o complexo corado é extraído pelo álcool-acetona deixando as células descoradas. O tratamento com fucsina não altera a cor roxa adquirida pelas Gram-positivas por ser este último, um corante mais fraco, ao passo que as Gram-negativas, descoradas pelo álcool-acetona, tornam-se avermelhadas.

Esta enzima atua sobre a água oxigenada (peróxido de hidrogênio 3 a 5%) desdobrando-a em oxigênio e água. A prova é feita colocando uma gota de solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 3 – 5% numa lâmina e, em seguida, com uma alça de platina, colocar uma porção do crescimento bacteriano sobre a gota. Ou de outra forma, adicionando-se 0,5 mL da mesma solução a uma cultura em meio líquido ou em ágar inclinado. A prova é considerada positiva quando há borbulhamento ou efervescência devido à liberação do oxigênio.



O meio ágar sangue permite a distinção entre bactérias hemolíticas e não-hemolíticas. O padrão de hemólise (dos glóbulos vermelhos de sangue) no meio agar de sangue permite distinguir bactérias, tais como *Streptococcus pyogenes* (causadora da faringite) que causa a lise completa dos glóbulos

vermelhos do sangue produzindo halos transparentes à volta das colónias, *Streptococcus mutans* (causa cárie dentária), que não é hemolítica, e *Streptococcus pneumoniae* (causadora de pneumonia bacteriana) que lisa parcialmente os glóbulos vermelhos do sangue. A base deste meio é altamente nutritiva e promove um ótimo crescimento de todos os microrganismos relevantes. O pH do meio deve ser de $7,3 \pm 0,2$ após acrescer o suplemento de sangue desfibrinado. O sangue utilizado pode ser de carneiro ou de cavalo, favorecendo a hemólise.

O modo mais simples e, para muitos fins, o melhor, de se observar os microrganismos, microscopicamente, é examiná-los vivos, suspensos em água ou em algum outro meio aquoso adequado. Tais preparações úmidas devem ser preferidas para observações de forma, tamanho e disposição celular e são, naturalmente, essenciais para a observação microscópica de funções celulares (movimento, correntes citoplasmáticas, fagocitose e assim por diante). O exame do material em campo escuro ou por contraste de fase é, invariavelmente, realizado com preparações úmidas (STANIER, et al., 1969).

Os instrumentos e técnicas para microscopia comum de luz, microscopia de ultravioleta e iluminação de campo escuro, foram inteiramente desenvolvidos antes do fim do século dezenove. Nos últimos vinte anos, foi descoberta mais uma extensão dos princípios da microscopia de luz, de grande valor na pesquisa biológica: a microscopia de contraste de fase (STANIER, et al., 1969).

Por modificação intencional de uma parte da luz que atravessa o microscópio, é possível aumentar a visibilidade de objetos não corados que tenham índice de refração apenas levemente diferente daquele do fundo em que se acham, não podendo, por isso, ser percebidos pelo olho humano sem uma tal intensificação de contraste. A melhoria do contraste constitui a base do microscópio de contraste de fase. Deve-se compreender que esse microscópio não pode criar diferenças no índice de refração, mas apenas acentuar diferenças já existentes. Além disso, o sistema de fases introduz defeitos na precisão da imagem, que são proporcionais ao contraste. Não

obstante, pelo seu uso, pode-se frequentemente observar, em células vivas, estruturas que não seriam claramente visíveis pela microscopia comum de luz (STANIER, et al., 1969).

Alem da utilização da microscopia de contraste de fase, a técnica da iluminação de Kohler e a variável mais importante para conseguir imagens de alta qualidade no microscópio. A técnica da iluminação de Kohler foi introduzida primeiramente em 1893 por August Kohler da corporação de Carl Zeiss como um método de fornecer a melhor iluminação do espécime. Esta técnica é recomendada por todos os fabricantes de microscópios modernos (MICROSCOPY, 2004).

Este sistema enzimático está relacionado com os citocromos da cadeia respiratória de alguns microrganismos. A prova consiste em colocar uma gota do reagente incolor tetrametil *p*-fenileno de amina, recém preparado e protegido da luz, em um papel de filtro. Em seguida, várias colônias do microrganismo em estudo são espalhadas sobre a área do papel de filtro contendo o reagente, utilizando uma alça de platina ou um bastão de vidro. A prova é considerada positiva quando na mistura do reagente com a massa bacteriana desenvolve-se a cor púrpura em até 1 minuto. Na reação negativa não há desenvolvimento de cor púrpura. A prova pode ser feita também em culturas em meios sólidos, adicionando-se o reagente oxalato de *p*-aminodimetilanilina. A reação inicia-se com o desenvolvimento de cor rósea, marrom e finalmente uma coloração negra na superfície das colônias é indicativa da produção de citocromo-oxidase, representando um teste positivo. O teste é negativo se não ocorrer alteração da cor ou houver o desenvolvimento de uma cor rósea pálida.

A prova da bile-esculina é baseada na capacidade de certas bactérias, particularmente os estreptococos do grupo D, de hidrolisar esculina em presença de sais biliares entre 1 a 4%. A esculina é quimicamente um derivado da cumarina (6- β -glicosídeo-7-hidroxycumarina), que pertence à classe dos glicosídeos. O produto Bile-Esculina Ágar contém os seguintes componentes para 1L de meio: Extrato de Carne - 3g, Peptona de Carne - 5g, Oxgall (Bile) -

40g, Citrato Férrico - 0,5g, Esculina - 10g, Agar - 15g em pH 7,10 \pm 0,2. A esculina, sendo hidrossolúvel, difunde-se para o meio do ágar. A reação é positiva quando é observado um enegrecimento difuso na superfície do ágar ou, em certos casos, um halo marrom ou negro ao redor das colônias.

A prova da glicose pode ser realizada de várias maneiras. A mais usual envolve a utilização de um meio com glicose ou outro açúcar e/ou álcool com pH neutro e um indicador de pH (Indicador de Andrade, púrpura de bromocresol). Além disso utiliza-se um tubo de Durham, invertido, imerso no meio. O meio é inoculado com a cultura teste e incubado. A prova positiva é indicada pela viragem da cor do meio de incolor com Indicador de Andrade ou púrpura com púrpura de bromocresol, para vermelho ou amarelo, respectivamente, devido a produção de ácidos, com abaixamento do pH do meio. Além disso, se a bactéria possuir o sistema enzimático hidrogênio-fórmico-liase, o ácido fórmico é transformado em CO₂ e Hidrogênio, os quais são coletados pelo tubo de Durham, expulsando o meio e ficando a extremidade superior desse tubo transparente, cheia dos gases citados. A prova negativa é revelada pela ausência de mudança de cor ou até mesmo pela acentuação da cor púrpura quando o reativo é o púrpura de bromocresol, indicando utilização dos aminoácidos, com alcalinização do meio.

A utilização de carboidratos pelas bactérias difere nos tipos e quantidades de ácidos mistos produzidos. Estas diferenças de atividade enzimática servem como uma das características mais importantes pelas quais se reconhecem as diferentes espécies. A fermentação é um processo metabólico de óxido-redução produzido em ambiente anaeróbio, no qual um substrato orgânico serve como receptor de hidrogênio em lugar do oxigênio. Nos testes bacteriológicos esta reação é detectada pela mudança da cor dos indicadores de pH quando produtos ácidos são formados. Esta acidificação ocorre pela degradação de carboidratos por vias diferentes das estritamente fermentativas. Como a maior parte das bactérias que utilizam os carboidratos são anaeróbias facultativas, esta utilização nem sempre se dá sob condições

estritamente anaeróbias. A mudança da cor do meio que contem o indicador azul de bromotimol, para amarelo, indica uma reação positiva para os "açúcares" em geral.

Na hidrólise da gelatina se a bactéria possuir a enzima gelatinase possui a capacidade de hidrolisar a gelatina e se liquefazer.

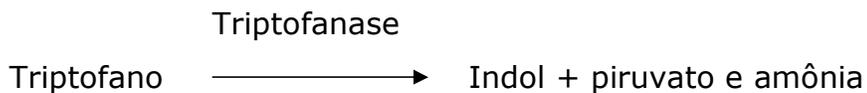
O manitol é um meio salino (7,5% de Cloreto de Sódio) com indicador de pH que provoca mudança da sua cor quando o manitol é fermentado e produzindo ácido, a única espécie capaz de realizar esta transformação da coloração do meio é *Staphylococcus aureus*

A urease é uma enzima que degrada a uréia em duas moléculas de amônia e uma de anidrido carbônico. A prova consiste em transferir uma porção do crescimento bacteriano com uma alça para o meio contendo uréia, pH neutro e um indicador de pH, o vermelho fenol. Após o crescimento a prova é revelada positiva quando a urease ataca a uréia alcalinizando o meio que toma a coloração rosa choque. Na prova negativa não há alteração da cor do meio. Os organismos do gênero *Proteus* são urease positivos diferentemente da maioria das enterobactérias.

O indol é resultante da degradação do aminoácido triptofano pela enzima triptofanase. A prova é realizada inoculando-se o meio contendo excesso de triptofano. Após a incubação colocar 0,5 ml do reagente de Kovac ou o reativo de Ehrlich (solução aquosa ou alcoólica de p-dimetil aminobenzaldeído, respectivamente) através da parede interna do tubo. A prova é positiva quando na porção superior, na interface da cultura e o reagente, desenvolve-se um anel de cor rósea dentro de no máximo 5 minutos. Este resultado é devido à complexação do indol com o aldeído, em meio ácido, formando o composto colorido. A prova é negativa com qualquer outra tonalidade de cor (original do meio ou marrom). Nesta prova observa-se o microrganismo é capaz de produzir ácidos em quantidade suficiente para abaixar o pH em valores inferiores a 4,4. Isto indica que o microrganismo em questão realiza uma fermentação ácida mista (ácido fórmico, acético, láctico e succínico). Caso não ocorra a virada do meio para o vermelho, o teste é negativo e a cor do

meio se mantém. A prova do vermelho de metila é efetuada para determinar a capacidade do microrganismo de oxidar a glicose com produção e estabilização de altas concentrações de produtos finais ácidos. Serve para diferenciar organismos entéricos.

No teste de Voges-Proskauer pesquisa-se bactérias fermentadoras de glicose através da fermentação butanodiólica. VP+ o meio tem coloração vermelha, VP- meio amarelo claro.



O aparecimento da cor vermelha indicará redução de nitrato a nitrito. Para confirmação do resultado negativo, acrescentar algumas miligramas de pó de zinco. O aparecimento de cor rosa indicará a não redução do nitrato. O *C. perfringens* reduz o nitrato a nitrito.

O meio de TSI fornece uma série de reações bioquímicas que dão uma visão geral do metabolismo bacteriano. O TSI é um meio sólido, que apresenta uma base e uma inclinação. É constituído de glicose (0,1%), lactose (1,0%) e sacarose (1,0%), peptonas, aminoácidos, incluindo sulfurados, tiosulfato de sódio e citrato férrico amoniacal (indicador da produção de H₂S), com pH neutro e um indicador de pH, o vermelho de fenol. O meio é semeado com agulha por punctura na base e estrias na superfície. Após o crescimento da bactéria pode-se observar os seguintes resultados: A bactéria não fermenta qualquer dos açúcares, ficando inalterado o meio, ou até mesmo utiliza os aminoácidos respirando-os com produção de amins que alcalinizam o meio; fermenta somente a glicose sendo que os ácidos formados mudam o pH do meio apenas na base, que se torna amarela e a inclinação vermelha por utilização dos aminoácidos (por respiração), alcalinizando a mesma e neutralizando a pequena quantidade de ácidos, pois a concentração de glicose é baixa - assim o resultado é expresso como K/A (inclinação alcalina e base ácida); fermenta a lactose ou a sacarose com viragem do indicador de todo o meio para amarelo, tanto a base como a inclinação permanecem ácidas, pois

os álcalis produzidos na inclinação são facilmente neutralizados pela grande quantidade de ácidos produzidos na base, tendo em vista que a concentração desses açúcares é dez vezes maior que a da glicose - o resultado é expresso como A/A (inclinação e base ácidas). Nos dois últimos casos, existe a possibilidade de detectar gases resultantes da degradação do ácido fórmico em hidrogênio e anidrido carbônico, se a bactéria possuir o sistema hidrogênio fórmico liase - os gases são indicados ou visualizados indiretamente por levantar ou fragmentar o meio - o resultado é representado como A/A com gás. Há também a possibilidade da bactéria produzir H_2S por respirar anaerobiamente o tiosulfato, captando elétrons através da tiosulfato redutase, resultando em gás sulfídrico e sulfeto. O sulfeto de hidrogênio na presença de sais de ferro forma sulfeto ferroso, originando um precipitado negro insolúvel - dessa forma o resultado é dado como A/A com gás e H_2S .

Desse modo, pode-se observar num único meio os processos fermentativos, respiração aeróbia e anaeróbia. A utilização dos açúcares e aminoácidos na inclinação se dá apenas por respiração aeróbia, enquanto que na base os processos são realizados por fermentação (incluindo também putrefação, quando da utilização dos aminoácidos básicos, sulfurados, triptofano, com produção de gás sulfídrico, mercaptanas, aminas, dentre outras). Já a utilização do tiosulfato ocorre por respiração anaeróbia, gerando também gás sulfídrico.

A prova da motilidade indica indiretamente a produção de flagelos. Não é uma prova bioquímica e sim fisiológica, mas auxilia a identificar bactérias. A prova indica motilidade quando os microrganismos crescem deslocando-se da linha de inoculação, turvando o meio. A prova é negativa quando os microrganismos ficam restritos ao local da inoculação sem, contudo, turvar o meio. As bactérias do grupo *Listeria spp.* giram ao redor do próprio eixo, e quando inoculadas em ágar motility desenvolvem uma estrutura com o formato de guarda chuvas.

Desta forma seguindo as considerações descritas acima é possível a identificação de *Listeria innocua* em alimentos, tendo em vista a crescente preocupação por parte dos pesquisadores, como pode ser observado a seguir.

Na pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no Estado de Pernambuco das 127 amostras de queijo de coalho analisadas, 12 foram positivas para *Listeria innocua* (9,5%) sorovar 6b, e 7 amostras dessas 12 também apresentaram positividade para *Listeria monocytogenes* (5,5%), sorovar 1/2a. A prevalência de colônias de *Listeria innocua* sobre as de *L. monocytogenes*, também foi verificado na Itália por MASSA et al. (1990) em queijos moles, nos Estados Unidos por RYSER & MARTH (2001) no queijo Jalisco e no Rio Grande do Sul por SCHWAB et al. (1996) em queijo colonial artesanal. Estes resultados são justificados segundo VARNAM & EVANS (1991) pelo fato de que ambas possuem o mesmo habitat. A detecção em 9,5% das amostras, de *Listeria innocua* pode ser indicativo do risco da *Listeria monocytogenes*, estar presente contaminando o alimento onde somente foi isolada a *Listeria innocua*.

SOUZA (2002) e RAMOS & COSTA (2003) analisando amostras de queijo de coalho artesanal comercializado em Fortaleza, CE, e Manaus, AM, isolaram *Listeria spp.* em 17,1% (12/70) e 3,4% (2/58), respectivamente, e *L. monocytogenes* em 1,4% (1/70) e 1,7% (1/58) das amostras. FEITOSA et al. (2003) no Rio Grande do Norte, detectaram *Listeria spp.* em 9% (1/11) dos queijos analisados. A presença de *Listeria spp.* Em amostras de leite e derivados, em locais de processamento vem sendo confirmada através de estudos como os de SILVA et al. (2003) que analisaram 218 amostras ao longo da linha de produção e encontraram 13 amostras positivas para *Listeria sp.* Segundo RYSER & DONNELLY (2001) a não detecção da *L. monocytogenes*, podem estar muitas vezes relacionadas a fatores de estresse celular, número inicial relativo de células de *L. monocytogenes* e *Listeria innocua*, ou durante a seleção das colônias para confirmação bioquímica, passo analítico em que

todas as espécies se apresentam com características semelhantes, foram selecionadas somente colônias de *Listeria innocua*

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento que hoje se tem das características dos microrganismos e dos métodos ou processos de controle microbiano permite-se rigorosamente produzir alimentos com grande qualidade microbiológica e, portanto seguros do ponto de vista sanitário para os consumidores.

Os incidentes que, eventualmente, ocorram serão resultado de uma deficiente aplicação das normas de higiene e sanitização dos alimentos, ou da deficiente aplicação dos métodos de controle microbiano, ou, porventura, de deficientes condições de armazenamento ou conservação dos alimentos.

Recomenda-se como medidas de controle a cocção adequada e boas práticas de higiene durante o processamento do alimento e prevenção da contaminação cruzada.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, P. C. C.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; CARVALHO J. C. A. P. 2002. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em produtos de carne de peru comercializados na cidade de Niterói -RJ- Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 30, n. 1, p. 19 – 25, 2002.

BIER, O. **Bacteriologia e Imunologia**. 20. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1980. 1062p.

BRANSON, D. **Métodos en bacteriologia clínica – manual de tests y prodedimientos**. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 256 p.

BRYCE, J. R.; POELMA, P. L. **Microscopic Examination of Foods and Care and Use of the Microscope**. In: Bacteriological Analytical Manual. 8.ed. Food and Drug Administration. AOAC International, Gaithersburg, USA. 1995. p. 2.01-2.06.

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.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 21, n. 3, p. 281 – 287, 2001.

CEFAR EM NOTÍCIAS. **Informativo cefar de microbiologia – atualidades científicas**. Ano II - Ed. 11 - Set/Out/2005 - Circulação Bimestral. Disponível em: <http://www.cefar.com.br/Noticias/jornal%2011%20ed.pdf?id=24> Acesso em: 29 out. 2006.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella sp.*, *Listeria sp.* e microrganismos indicadores higiênico-sanitário em queijo de coalho produzido no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, supl. p. 162 – 165, 2003.

FONTOURA, R. Estudo iniciado em 1969 traça panorama da listeriose no Brasil FRAZIER, W. C. **Microbiologia de los alimentos**. Acribia, 4ªed. Zaragoza, España, 681p., 1993.

HARMON R. J.; EBERHART R. J.; JASPER D. E.; LANGLOIS B. E.; WILSON R. A. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. **National Mastitis Council**, Arlington. 34p, 1990.

HOLMBERG, O. *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. **Acta Veterinaria Scandinavia**, p. 1 - 144, 1973. Supplement, 45.

KONEMAN, E. K; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; Jr.WINN, W. C. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 5ª ed. Lippincott. NY, 1395p., 1997.

LANDGRAF, M. Novos patógenos de interesse em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 5 – 7, 1997.

LELLIOTT, R. A.; STEAD, D. E. **Methods for the Diagnosis of Bacterial Plant Disease**, Blakwell Scientific Publications, Oxford. 1987, 216 p.

MASSA, S.; CESARONI, D.; PODA, G.; TROVATELLI, L. D. The incidence of *Listeria* spp. in soft cheeses, butter and raw milk in the province of Bologna. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 153 – 156, 1990.

MICROSCOPY. August Köhler (1866-1948). Acesso em 22 de julho de 2004. Online. Disponível em: <<http://www.microscopy.fsu.edu/optics/timeline/people/kohler.html> >

MORETTI, P. E. **Coloração de Gram**. Disponível em: <http://www.fam.br/microrganismos/metodo_coloracao_de_gram.htm> Acesso em: 28 out. 2006.

NOJIMOTO, I. T. I.; CENTENO, A. J.; YANAGUITA, R. M.; WATANABE, K.; KAMUMOTO, M.; MACHADO, M. R. Susceptibilidade aos antimicrobianos de *Listeria* spp. isoladas de pacientes com aborto repetitivo. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 26, n. 3, p. 71 – 74, 1994.

POPOFF, M. Genus III. *Aeromonas* Kluyer and Van Niel. In: DRIEG, N. R. (Ed). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Willians and Wilkins, 1984. v. 1, p.545 – 584.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. Enterobacteracea In: QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. (Eds.). **Clinical medicine veterinary**. Londres: Wolfe, 1992. 848p.

QUINN, P.J. et al. Clostridium species. In: **Clinical Veterinary Microbiology**. Elsevier: London, 1994. p.191-208.

RAMOS, S. N. M.; COSTA, C. A. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijo artesanal tipo coalho comercializado na cidade de Manaus-AM, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 33, n. 4, p. 613 – 618, 2003.

RYSER, E. T. & MARTH, E. H. **Listeria, listeriosis and food safety**. New York: Marcel Dekker. 632p., 1991.

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: American Public Health Association, 2001. p. 63 – 67.

RYSER, E. T.; MARTH, E. H. Occurrence of *Listeria* in foods: milk and dairy foods. In: MILLER, A.J.; SMITH, J.L.; SOMKUTI, G.A. (Eds.). **Topics in industrial microbiology: foodborne listeriosis**. London: Elsevier, 1990. Cap. 23, p.151 – 163.

SCHWAB, J. P.; BECHTEL, M. A. B.; SCHUCH, D. T. M. *Listeria monocytogenes*. In farm-made colonial cheese marketable in Porto Alegre. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**. v.24, n.1, 1996.

SILVA, I. M. M.; ALMEIDA, R. C. C.; ALVES, M. A. O.; ALMEIDA, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. In critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 241 – 248, 2003.

SILVA, M. C. D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 61, n. 3, p. 354-356, 1998.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**, 1997.

SOUZA, R. A. **Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo tipo coalho artesanal comercializado à temperatura ambiente em Fortaleza-CE**. Fortaleza, 2002. 78f. Dissertação (Mestrado em tecnologia de Alimentos) – Departamento de tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2002.

SOUZA, R.A. **Incidência de *L. monocytogenes* em queijo tipo coalho artesanal comercializado à temperatura ambiente em Fortaleza - CE**. Fortaleza, 2002. 78F. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará (UFCE).

STANIER, R. Y.; DOUDOROFF, M.; ADELBERG, E. A. **Mundo dos Micróbios**. Sao Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 1969.

UYTTENDAELE, M.; DE TROY, P.; DEBEVERE, J. Incidence of *Listeria monocytogenes* in diferents types of meat products on the Belgian retail market. Int. **Journal Food Microbiology**, v. 53: p. 75 – 80, 1999.

VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D.F. **Compedium for the microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington : American Public Health Association, 1992, 1219p.

VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. *Listeria monocytogenes*. In: VARNAM, A.H. & EVANS, M.G. (Eds.). **Foodborne pathogens: an illustrated text**. London: Wolf Publishing, 1991. p. 327 – 353.