



10	LIN2	
3,3 *	2,6	4,0
4,2	2,9	4,0
4,2	2,5	4,0
4,2	2,5	4,0
4,6	3,2	4,0
4,0	4,0	4,0

Perfil de suscetibilidade antimicrobiana e comportamento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal

Ana Lúcia Penteado¹
Simone Duarte de Oliveira Costa²

Introdução

Queijo Minas Frescal é um produto altamente aceito no mercado, fácil de produzir e com um alto rendimento. Pode ser considerado como o único queijo genuinamente brasileiro, com uma cor esbranquiçada interna, consistência suave, textura compacta com alguns buracos irregulares, e sabor variando de levemente ácido a suave (NALDINI; VIOTTO; KUAYE, 2009).

Este tipo de queijo, devido as suas características específicas, é um excelente substrato para microrganismos, incluindo *Listeria monocytogenes*, o qual tem a capacidade de se multiplicar em temperaturas de refrigeração e também sobreviver a longos períodos sob condições adversas (KABUKI et al., 2004).

Este microrganismo encontra-se amplamente disseminado na natureza, sendo que tanto o homem como os animais e o ambiente servem como reservatório desta bactéria (FRANCO; LANDGRAF, 2003). Listeriose é a denominação de um grupo geral de desordens causadas por *L. monocytogenes* que incluem septicemia, meningite, encefalite e infecção

cervical ou intra-uterina em gestantes, que podem provocar aborto ou nascimento prematuro (SILVA et al., 2007).

Sua presença em queijo Minas Frescal já foi relatada por diversos autores (CARVALHO; VIOTTO; KUAYE, 2007; SILVA et al., 2003; SILVA; HOFER; TIBANA, 1998).

Embora a maioria dos isolados de *L. monocytogenes* e outras *Listeria* spp seja susceptível a antibióticos ativos contra bactéria Gram +, sua resistência tem sido registrada em isolados de casos clínicos esporádicos, alimentos e meio ambiente (CHARPENTIER; COURVALIN, 1999).

O tratamento de infecções devido a bactérias oportunistas pode tornar-se um problema, desde que muitas destas bactérias, embora geralmente mostrem baixa virulência, são resistentes naturais a diversos antibióticos, indicando a necessidade de monitoramento da suscetibilidade antimicrobiana destes microrganismos (ARSLAN; ÖZDEMİR, 2008).

As conseqüências desta resistência à saúde humana são severas. As infecções causadas por

¹ Farmacêutica, D.Sc. em Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, analucia@ctaa.embrapa.br

² Engenheira de Alimentos, M. Sc. em Tecnologia de Alimentos, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, sduarte@ctaa.embrapa.br

microrganismos resistentes não respondem aos tratamentos, resultando em doenças prolongadas e grande risco de morte. Uma falha no tratamento também leva a longos períodos de infectividade, o qual aumenta o número de pessoas contaminadas movendo na comunidade e deste modo expõe a população em geral a um risco de contrair uma cepa resistente a infecção.

Este trabalho foi desenvolvido com a finalidade de estudar o comportamento de *L. monocytogenes* sob temperatura de refrigeração e sua suscetibilidade antimicrobiana.

Material e Métodos

Amostras de queijo

Queijos, provenientes de quatro marcas industriais, foram obtidos em dois estabelecimentos comerciais distintos. No total, foram coletadas 15 amostras de quatro marcas diferentes: marcas A e B (coletadas no estabelecimento I) e marcas C e D (coletadas no estabelecimento II), sendo analisadas no mesmo dia da coleta.

Isolamento e identificação de *Listeria* spp.

Para a pesquisa de *L. monocytogenes* foram utilizados os métodos do “Bacterial Analytical Manual/Food and Drug Administration”-BAM/FDA (HITCHINS, 2003) e o método Canadense “Health Products and Food Branch”-HPFB (PAGOTTO et al., 2001).

Para detecção de *L. monocytogenes* através do método BAM/FDA foram retiradas assepticamente 25g de cada queijo e adicionados a 225 mL de caldo de pré enriquecimento “Listeria Enrichment Broth” (LEB) e incubados 30°C por 48 horas. Duas placas seletivas de “Agar Oxford” (AO) foram estriadas a partir do caldo LEB e incubados a 37± 1°C/48 horas.

Pelo método canadense HPFB as amostras de 25g foram adicionados em 225mL de caldo de pré enriquecimento “Listeria Enrichment Broth” (LEB) e incubados a 30°C por 24/48 horas. Alíquotas (0,1mL) foram semeadas em tubos com caldo “Modified Fraser Broth” (MFB) e incubados a 35°C por 24/48 horas. Os tubos que apresentaram coloração negra após incubação foram estriados em placas com meio seletivo de “Modified Oxford Agar (MOX) e Palcam Agar (PAL) e incubados a 35°C por 24/48 horas.

Colônias características de ambos os métodos foram reisoladas em “Trypticase Soy Agar-Yeast Extract” (TSA-YE) e submetidas a testes bioquímicos (açúcares, hemólise e motilidade) para confirmação de *Listeria monocytogenes*.

Suscetibilidade antimicrobiana (Teste de Sensibilidade a antimicrobianos por Disco –Difusão)

Padrões de suscetibilidade antimicrobiana para culturas de *Listeria monocytogenes*, isoladas de queijo Minas Frescal e pertencentes à coleção de culturas do laboratório de Microbiologia de Alimentos, foram realizados pelo método padrão de difusão de disco em Agar Mueller-Hinton seguindo os procedimentos recomendados pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003).

Os antibióticos testados foram; ampicilina (10mcg), lincomicina (2mcg), eritromicina (15mcg), gentamicina (10mcg), tetraciclina (30mcg), cloranfenicol (30mcg), vancomicina (30mcg), amikacin (30ug), estreptomicina (10ug), ciprofloxacina (5 ug), e amoxicilina+ácido clavulanico (20/10ug).

Comportamento de *L. monocytogenes* em queijo Minas Frescal armazenado sob refrigeração

Quinze amostras de queijos, negativas para *L. monocytogenes*, foram pesadas (150 gramas) e homogeneizadas separadamente em sacos “stomacher” por 4 minutos. Foram inoculados com uma cepa padrão de *L. monocytogenes* na concentração, aproximadamente, de 10 UFC/g com ajuda de um aparelho “densimat” (Biomerieux), homogeneizadas por mais 4 minutos, e então incubadas a sob refrigeração (8°C). A presença deste microrganismo foi determinada no tempo zero e após uma semana sob refrigeração, utilizando os dois métodos de detecção (BAM/FDA e HPFB).

Resultados

Dos quinze queijos analisados nos tempos 0 hora e após uma semana pelo método HPFB, treze e sete queijos respectivamente foram positivos para *L. monocytogenes* no tempo zero e após uma semana. Dois queijos (amostras 167 e 168) não apresentaram o microrganismo nos dois tempos estudados, enquanto que seis queijos apresentaram *L. monocytogenes* no tempo zero mas ausência após 168 horas sob refrigeração (Tabela 1).

Já para a análise feita pelo método FDA nove queijos foram positivos para *L. monocytogenes* no tempo zero e cinco foram positivos após uma semana. Seis queijos (amostras 132, 150, 151, 164, 165 e 168) foram negativos para este microrganismo. Quatro queijos apresentaram *L. monocytogenes* no tempo zero e ausência após uma semana sob refrigeração (Tabela 1).

O método HPFB foi mais eficiente na detecção de *L. monocytogenes* tanto no tempo zero como após uma semana de incubação à temperatura de refrigeração. O tempo de uma semana sob refrigeração reduziu em aproximadamente 50% a presença do microrganismo em estudo para os dois métodos utilizados. Para um baixo número inicial de células de *L. monocytogenes*, a refrigeração poderia ser utilizada como uma barreira, mas o seu uso somente não atenderia a legislação brasileira (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2001), que preconiza ausência deste microrganismo em 25g de queijo Minas Frescal.

Suscetibilidade antimicrobiana

Nove (9) cepas de *L. monocytogenes*, foram testadas quanto a sua suscetibilidade antimicrobiana. Todos os microrganismos apresentaram suscetibilidade aos antibióticos testados conforme dados apresentados na tabela 2.

Conclusão

Os resultados obtidos mostram que infecções causadas por estas cepas isoladas deste tipo de queijo, são passíveis de tratamento através da administração de um dos antibióticos testados.

Tabela 1. Presença de *L. monocytogenes* pelos métodos HPFB e FDA

Queijos	0 h		1 semana	
	HPFB	FDA	HPFB	FDA
132	+	-	-	-
133	+	+	-	-
134	+	+	+	-
135	+	+	-	+
136	+	+	+	+
147	+	+	+	-
148	+	+	+	+
149	+	+	+	+
150	+	-	+	-
151	+	-	-	-
164	+	-	+	-
165	+	-	-	-
166	+	+	-	-
167	-	+	-	+
168	-	-	-	-

Tabela 2. Suscetibilidade antimicrobiana frente a diferentes antibióticos

	AMP10	LIN2	ERI15	GEN	TET 30	CLO 30	VAN 30	AN	S	CI P	AMC
132	4,3 *	2,6	4,0	3,5	3,5	3,4	2,7	2,4	2,0	2,7	4,0
133	4,2	2,9	4,1	3,2	3,5	3,7	2,9	2,5	1,6	3,1	4,5
134	4,2	2,5	4,0	3,9	3,5	3,6	2,8	2,5	1,7	3,0	4,0
135	4,2	2,5	4,0	3,3	3,4	3,8	3,0	2,3	2,0	2,7	4,2
136	4,6	3,2	4,4	3,5	3,7	4,0	3,0	2,5	1,9	3,0	4,2
145	5,0	4,0	4,0	4,0	4,5	4,5	3,0	3,5	2,5	3,5	5,5
146	5,0	3,0	4,7	3,8	3,7	3,7	2,7	3,0	2,0	3,0	5,0
147	3,5	2,0	3,5	2,9	3,0	3,2	2,5	2,3	1,6	2,7	3,7
148	3,9	3,5	4,5	3,8	4,5	4,4	3,5	3,0	2,3	3,0	4,8

*Tamanho do halo em mm

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em: 20 jul. 2011.

ARSLAN, S.; ÖZDEMİR, F. **Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* spp. in homemade white cheese**. Food Control, v. 19, n. 4, p. 360-363, 2008.

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. **The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes**. Food Control, v. 18, n. 3, p. 262-267, 2007.

CHARPENTIER, E.; COURVALIN, P. **Antibiotic resistance in *Listeria* spp.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 43, n. 9, p. 2103-2108, 1999.

FRANCO, B. D. G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003. 182 p.

HITCHINS, A. D. **Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods**. In: BACTERIOLOGICAL analytical manual. 8th ed. [S.l.]: FDA, 2003. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071400.htm>>. Acesso em: 20 jul. 2011.

KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. **Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in latin-style fresh-cheese processing plants**. Journal of Dairy Science, v. 87, n. 9, p. 2803-2812, 2004.

NALDINI, M. C. M.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. **Behaviour of *Listeria monocytogenes* inoculated into Minas Frescal cheese made by direct**

acidification or lactic culture during refrigerated storage. International Journal of Dairy Technology, v. 62, n. 3, p. 361-365, 2009.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard**. 8th ed. Wayne, PA, 2003. (NCCLS document M2-A8).

PAGOTTO, F.; DALEY, E.; FARBER, J.; WARBURTON, D. MFHPB-30: **Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples**. In: COMPENDIUM of analytical methods. Ottawa: Health Canada, 2001. v. 2.

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**. International Journal of Food Microbiology, v. 81, n. 3, p. 241-248, 2003.

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

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. 536 p.

Comunicado Técnico, 178

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Endereço: Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
 23020-470 - Rio de Janeiro - RJ
Fone: (0XX21) 3622-9600
Fax: (0XX21) 3622-9713
Home Page: <http://www.ctaa.embrapa.br>
E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

1ª edição
 1ª impressão (2011): tiragem (50 exemplares)

Comitê de publicações

Presidente: Virgínia Martins da Matta
Membros: Andre Luis do Nascimento Gomes, Daniela de Grandi Castro Freitas, Luciana Sampaio de Araújo, Ilana Felberg, Marília Penteado Stephan, Michele Belas Coutinho, Renata Galhardo Borguini, Renata Torrezan

Expediente

Supervisão editorial: Virgínia Martins da Matta
Revisão de texto: Edmar das Mercês Penha
Normalização bibliográfica: Luciana S. de Araújo
Editoração eletrônica: Marcos Moulin e André Luis do Nascimento Gomes