

Listeria monocytogenes em hortaliças: isolamento e sorotipagem

Listeria monocytogenes in green vegetables: isolation and serotyping

RIALA6/1549

Marcelo Luiz Lima BRANDÃO*, Fernanda Corredeira da Paixão BISPO, Davi de Oliveira ALMEIDA, Carla de Oliveira ROSAS, Silvia Maria Lopes BRICIO, Victor Augustus MARIN

*Endereço para correspondência: Laboratório de Microbiologia de Produtos, Setor de Alimentos, Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Av. Brasil, 4365. Manguinhos, Rio de Janeiro – RJ, Brasil, CEP 21040-900. Tel (21) 3865-5161. E-mail: marcelo.brandao@incqs.fiocruz.br
Recebido: 15.05.2012 - Aceito para publicação: 19.02.2013

RESUMO

A ingestão de alimentos contaminados com *Listeria monocytogenes* representa um risco à saúde humana. A pesquisa de *L. monocytogenes* por meio de técnica de enriquecimento seletivo foi efetuada em 97 amostras de hortaliças, comercializadas no Estado do Rio de Janeiro. Foram analisadas 35 hortaliças *in natura*, 32 minimamente processadas e 30 pratos de saladas cruas prontas para consumo. Os isolados foram sorotipados por soroaglutinação clássica utilizando-se antissoro policlonal flagelar e somático. Sete amostras (7,2%) apresentaram *L. monocytogenes*, sendo duas hortaliças *in natura* e cinco em forma de salada. Todos os isolados foram identificados como sorovar 1/2a. Em virtude da ocorrência de contaminação de hortaliças *in natura* com *L. monocytogenes*, é fundamental que os consumidores estejam esclarecidos quanto à possível presença deste patógeno nesse tipo de alimento, e fiquem cientes quanto à realização de corretos procedimentos de sanitização e de cuidados para evitar a contaminação cruzada com outros alimentos. A presença de *L. monocytogenes* em saladas prontas para consumo representa um risco à saúde dos consumidores, principalmente para indivíduos pertencentes ao grupo de risco.

Palavras-chave. *listeria monocytogenes*, hortaliças, sorotipagem.

ABSTRACT

Consumption of food contaminated with *Listeria monocytogenes* poses as a risk to human health. Ninety-seven samples of green leafy vegetables marketed in the state of Rio de Janeiro were analyzed for detecting *L. monocytogenes* by selective enrichment. Thirty-five *in natura* green vegetables, 32 minimally processed samples and 30 ready-to-eat raw salads samples were assessed. The isolates were serotyped by means of classical seroagglutination technique using somatic and flagellar polyclonal antisera. Seven samples (7.2%) showed to be contaminated with *L. monocytogenes*, being two *in natura* samples and five ready-to-eat salads. All isolates were identified as serovar 1/2a. Considering these findings on the contamination of *in natura* green vegetables with *L. monocytogenes*, the consumers should be advised regarding to the possibility of this kind of product to be contaminated with this pathogen, and also to imply vigilance in observing the proper sanitization procedures to avoid the cross-contamination with other foods. Occurrence of *L. monocytogenes* in ready-to-eat salad samples denotes a health hazard to consumers, especially to those who belong to risk groups.

Keywords. *listeria monocytogenes*, leafy green vegetables, serotyping.

INTRODUÇÃO

Hortaliças são importantes componentes de uma dieta saudável, provendo vitaminas, minerais e fito-nutrientes. Pesquisas científicas das últimas duas décadas têm demonstrado que uma dieta rica em vegetais pode prevenir o surgimento de quadros de câncer e diminuir a ocorrência de doenças coronarianas. Devido a estes benefícios em potencial, órgãos governamentais de todo o mundo têm incentivado o consumo de vegetais na prevenção de doenças¹. Contudo, em paralelo ao elevado consumo destes produtos, um aumento dos casos de doenças de origem alimentar veiculadas por hortaliças e saladas prontas para o consumo tem ocorrido². No encontro de especialistas relativo aos perigos microbiológicos associados com produtos frescos, promovido pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura e pela Organização Mundial da Saúde em 2008, as hortaliças foram identificadas como os produtos de maior preocupação do ponto de vista de segurança de alimentos².

Dentre os micro-organismos patogênicos que podem ser transmitidos por hortaliças está a bactéria *Listeria monocytogenes*¹⁻³. Esta espécie encontra-se amplamente distribuída na natureza e apresenta habilidade de sobreviver por longos períodos de tempo no ambiente, colonizando vegetais, solo, águas superficiais e alimentos⁴. *L. monocytogenes* se diferencia de outros patógenos alimentares pela capacidade de crescer a temperaturas baixas, de resistir a condições adversas, como ambientes com baixo pH, altas concentrações de NaCl e baixa tensão de oxigênio⁵. É um patógeno intracelular facultativo que causa infecções severas, com quadros de aborto, meningite e septicemia, acometendo principalmente gestantes, crianças, idosos e adultos com o sistema imunológico comprometido, que formam o grupo de risco para listeriose³. Constitui um problema de saúde pública devido à gravidade da listeriose e a alta taxa de mortalidade, entre 20 a 30%^{3,4}. Devido à sua capacidade de se multiplicar sob temperatura de

refrigeração, alimentos prontos para o consumo, como as hortaliças minimamente processadas, são veículos comuns de infecção por este patógeno^{1,2}.

No Brasil, a legislação vigente que regulamenta os padrões microbiológicos para alimentos⁶ preconiza a ausência de *Salmonella* spp. em amostras de vegetais, não citando *L. monocytogenes* como critério. Contudo, surtos causados por *L. monocytogenes* associados ao consumo de hortaliças já foram reportados, sendo esta espécie considerada como um perigo microbiológico em vegetais folhosos².

Diante da crescente preocupação mundial com o papel de *L. monocytogenes* em infecções de origem alimentar e a indicação das hortaliças como veículos deste patógeno, o objetivo deste estudo foi investigar a contaminação de hortaliças por *L. monocytogenes* e identificar o sorovar dos isolados por soro aglutinação convencional.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Um total de 97 amostras de hortaliças foi analisado, incluindo 35 *in natura* (uma de acelga, uma de agrião, 29 de alface, duas de chicória e duas de couve), 32 minimamente processadas (MP) (uma de acelga, três de agrião, 21 de alface, uma de chicória, duas de couve, três de espinafre e uma de rúcula) e 30 de saladas de alface de serviços de alimentação. As amostras foram coletadas de forma aleatória, em diferentes estabelecimentos (feiras-livres, quitandas, supermercados e restaurantes) nos municípios do Rio de Janeiro, Niterói, Nova Iguaçu e Volta Redonda, do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, no período de outubro de 2010 a setembro de 2011. A escolha das amostras e das marcas foi de acordo com a disponibilidade no comércio do Estado do Rio de Janeiro durante o período de análises. As amostras foram

aconditionadas em embalagens estéreis individuais para transporte e mantidas sob temperatura de refrigeração (4-8°C) até o momento da análise. As análises foram realizadas no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade da Fundação Oswaldo Cruz, localizado no município do Rio de Janeiro, RJ.

Análises microbiológicas

A pesquisa de *L. monocytogenes* foi realizada conforme descrito por Hitchins e Jinneman⁴. Vinte e cinco gramas da amostra foram homogeneizadas com caldo de enriquecimento tamponado para *Listeria* (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). O homogenato foi incubado a 30°C por 4h. Após este período, foram adicionados os agentes seletivos (acriflavina, ácido nalidíxico e ciclohexamina). A incubação a 30°C foi mantida por um total de 48h. Para o isolamento foi utilizado o *Chromogenic Listeria Agar* (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). As colônias características foram submetidas

aos testes morfológicos e fenotípicos, dentre eles, a coloração de Gram, fermentação de carboidratos (glicose, esculina, maltose, ramnose, manitol e xilose), produção de catalase, hemólise em ágar sangue de carneiro e motilidade.

Sorotipagem dos isolados de *L. monocytogenes*

As culturas foram semeadas em ágar tripticaseína de soja contendo extrato de levedura (Merck, Darmstadt, Germany) e enviadas ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas/IOC/Fiocruz para identificação e sorotipagem convencional por aglutinação segundo Seeliger e Höhne⁷.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De 97 amostras de hortaliças analisadas, sete (7,2%) apresentaram contaminação por *L. monocytogenes*, duas amostras de alface *in natura* e cinco amostras de saladas de alface de serviços de alimentação (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados da pesquisa de *L. monocytogenes* nas amostras de hortaliças

Classe da amostra	Tipo de hortaliça (nº de amostras)	Nº de amostras positivas (%)
<i>In natura</i>	Acelga (1)	0 (0)
	Agrião (1)	0 (0)
	Alface (29)	2 (6,9)
	Chicória (2)	0 (0)
	Couve (2)	0 (0)
	Total (35)	2 (5,7)
Minimamente processada	Acelga (1)	0 (0)
	Agrião (3)	0 (0)
	Alface (21)	0 (0)
	Chicória (1)	0 (0)
	Couve (2)	0 (0)
	Espinafre (3)	0 (0)
	Rúcula (1)	0 (0)
	Total (32)	0 (0)
Saladas de serviços de alimentação	Alface (30)	5 (16,7)
Total de amostras de hortaliças	97	7 (7,2)

Todos os isolados foram identificados como pertencentes ao sorovar 1/2a.

A ocorrência de *L. monocytogenes* nas amostras de hortaliças *in natura* observada neste estudo (5,7%), foi superior ao relatado por De Giusti et al.⁸, que detectaram *L. monocytogenes* em apenas uma (0,4%) amostra de alface em 265 vegetais inteiros analisados pelo sistema Bax PCR. Esses autores não obtiveram confirmação pelo método de cultivo. Outros autores reportaram a ausência deste patógeno em amostras de vegetais *in natura*⁹⁻¹¹.

A ausência de *L. monocytogenes* nas amostras minimamente processadas observada neste estudo é corroborada pela pesquisa de Tresseler et al.¹⁰, que não detectaram esse patógeno ao analisarem 126 amostras de hortaliças MP comercializadas na cidade de Fortaleza - CE. Fröder et al.¹² relataram baixa ocorrência de *L. monocytogenes* em vegetais MP comercializados na cidade de São Paulo - SP. Os autores isolaram a bactéria em apenas uma amostra de espinafre (0,6 %) de um total de 181 vegetais analisados. Em outros países, Abadias et al.⁹ observaram uma ocorrência de 3,4 e 0,8% em amostras de alface e saladas MP contendo hortaliças variadas comercializadas na Espanha. Cordano e Jacquet¹³ não detectaram *L. monocytogenes* em 154 amostras de vegetais MP analisadas no Chile. Na Itália, De Giusti et al.⁸ analisaram 699 amostras de vegetais MP pelo sistema Bax PCR. Foi detectado *L. monocytogenes* em duas (0,3%) amostras de saladas mistas contendo alface, porém não conseguiram isolar o patógeno nestas mesmas amostras pelo método de cultivo. Como as hortaliças minimamente processadas são produtos submetidos a procedimentos de higienização e sanitização, é esperado que a contaminação por patógenos seja inexistente ou muito baixa caso os procedimentos tenham sido realizados de forma eficaz¹.

Das 30 amostras de pratos prontos comercializadas em serviços de alimentação, *L.*

monocytogenes foi detectada em cinco amostras de alface (16,7%). Em um estudo realizado por Little et al.¹⁴, foi avaliada a prevalência de *L. monocytogenes* em saladas mistas contendo carne ou frutos do mar. Os autores relataram uma prevalência de 47,2 e 52,8% nas amostras contendo carne e frutos do mar, respectivamente. A prevalência superior ao observado no presente estudo pode estar relacionada à presença dos produtos cárneos nas saladas.

Todas as cepas de *L. monocytogenes* isoladas foram classificadas como pertencentes ao sorovar 1/2a. Esse resultado foi concordante com dados da literatura, que destacam este sorovar como um dos mais prevalentes em amostras de alimentos^{13,14}. Da mesma forma, na avaliação de amostras de saladas prontas para consumo contendo carne ou frutos do mar, realizado por Little et al.¹⁴, o sorovar 1/2a foi o mais prevalente, sendo identificado em 67,3% dos isolados. Cordano e Jacquet¹³ também relataram maior prevalência do sorovar 1/2a em amostras de salada de vegetais comercializadas em supermercados na cidade de Santiago, Chile.

Tendo em vista os resultados obtidos neste estudo, a presença de *L. monocytogenes* em amostras de hortaliças *in natura* sugere a possibilidade de estas terem sido contaminadas durante a produção no campo pelo solo, água contaminada, mão de manipuladores, podendo a contaminação também ter ocorrido nos estabelecimentos de venda. A contaminação das amostras de saladas prontas para o consumo com *L. monocytogenes* pode estar relacionada à contaminação por parte dos manipuladores, ou a contaminação cruzada com outros alimentos. A eficácia dos procedimentos de lavagem e desinfecção é essencial para a eliminação de micro-organismos patogênicos presentes nos vegetais. Em um estudo recente comparando diferentes procedimentos de lavagem e desinfecção realizados em serviços de alimentação no sudeste do Brasil, a utilização de

solução de hipoclorito de sódio a 200 ppm por 15 min foi considerado o procedimento mais recomendado para descontaminação de alface¹⁵. Assim, programas de esclarecimento relacionados a procedimentos de sanitização de hortaliças frescas devem ser elaborados e repassados aos consumidores. Da mesma forma, os responsáveis pelos serviços de alimentação devem estar atentos quanto ao uso e adequação do Manual de Boas Práticas de Higiene nos seus estabelecimentos.

CONCLUSÃO

L. monocytogenes foi detectada em amostras de alface de pratos prontos para consumo, o que representa um risco à saúde dos consumidores, principalmente para indivíduos pertencentes ao grupo de risco. Este patógeno também foi isolado em amostras de alface *in natura*, logo consumidores devem ser esclarecidos com relação à possibilidade da contaminação deste micro-organismo em hortaliças, estando assim atentos quanto à realização de corretos procedimentos de sanitização e de cuidados para evitar a contaminação cruzada com outros alimentos.

AGRADECIMENTOS

Ao INCQS/Fiocruz pelo financiamento deste estudo, ao CNPq por concessão de bolsa PIBIC a Fernanda Corredeira da Paixão Bispo, às Vigilâncias Sanitárias Municipais e Estadual do Rio de Janeiro pela coleta das amostras e ao Dr. Ernesto Hofer (Laboratório de Zoonoses Bacterianas do IOC/Fiocruz) pela sorotipagem dos isolados de *L. monocytogenes*.

REFERÊNCIAS

1. Mecanoglu TB, Halkman AK. Do leafy green vegetables and their ready-to-eat [RTE] salads carry a risk of foodborne pathogens? *Anaerobe*.2011;17(6):286-7.
2. Food and Agricultural Organization/World Health Organization – FAO/WHO. Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs. Meeting Report. Rome: WHO, 2008. 151p. Microbiological Risk Assessment Series Nº 14. [acesso 2012 Abr 26]. Disponível em: [<http://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0452e/i0452e00.pdf>].
3. Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H et al. Food-borne diseases – The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int J Food Microbiol*.2010;139(Supl. 1):S13-5.
4. Hitchins AD, Jinneman K. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. In: Bacteriological analytical manual Online, Charper 10. [S.l.]; FDA. 2011. [acesso 2012 Abr 26]. Disponível em: [<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071400.htm>].
5. Swaminaphan B, Cabanes D, Zhang W, Cossart P. *Listeria monocytogenes*. In: Doyle MP, Beuchat LR. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. 3rd Ed. Washington DC: ASM Press, 2007. p. 457-91.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n.º12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para alimentos e seus anexos I e II. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, n.7-E, 10 jan. 2001. Seção1, p. 45.
7. Seeliger HPR, Höhne K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. *Meth Microbiol*.1979;13:31-49.
8. De Giusti M, Aurigemma C, Marinelli L, Tufi D, Medici D, Pasquale S, et al. The evaluation of the microbial safety of fresh ready-to-eat vegetables produced by different technologies in Italy. *J Appl Microbiol*.2010;109:996-1006.
9. Abadias M, Usall J, Anguera M, Solsona C, Viñas I. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *Int J Food Microbiol*.2008;123:121-9.
10. Tresseler JFM, Figueiredo EAT, Figueiredo RW, Machado TF, Delfino CM, Sousa PHM. Avaliação da qualidade microbiológica de hortaliças minimamente processadas. *Ciênc Agrotecnol*.2009;33(Edição Especial):1722-7.
11. Oliveira M, Usall J, Viñas I, Anguera M, Gatiús F, Abadias M. Microbiological quality of fresh lettuce from

- lettuce from organic and conventional production. *Food Microbiol.*2010;27:679-84.
12. Fröder H, Martins CG, Souza KLO, Landgraf M, Franco BDGM, Destro MT. Minimally Processed Vegetable Salads: Microbial Quality Evaluation. *J Food Protect.*2007;70(5):1277-80.
 13. Cordano AM, Jacquet C. *Listeria monocytogenes* isolated from vegetables salads sold at supermarket in Santiago, Chile: Prevalence and strain characterization. *Int J Food Microbiol.*2009;132:176-9.
 14. Little CL, Taylor FC, Sagoo SK, Gillespie IA, Grant K, McLauchlin J. Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in retail pre-packaged mixed vegetable salads in the UK. *Food Microbiol.*2007;24:711-7.
 15. Oliveira ABA, Ritter AC, Tondo EC, Cardoso MI. Comparison of Different Washing and Disinfection Protocols Used by Food Services in Southern Brazil for Lettuce (*Lactuca sativa*). *Food Nutr Sci.*2011;3:28-33.