



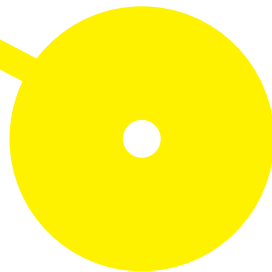
MESTRADO

Análises Clínicas e Saúde Pública – Microbiologia e saúde Pública

# Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em alimentos processados à base carne e superfícies de contacto

Suellen Isménia Santana de Brito

10/2021





**Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em alimentos e superfícies  
Alimentos processados à base de carne e em superfícies de contacto de uma unidade fabril**

**Autor**

Suellen Isménia Santana De Brito

**Orientadores**

Doutor António Augusto Araújo Gomes/ Diretor Técnico da Biogerm SA

Doutora Maria Manuela Amorim Silva e Sousa, Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto (ESSIP.Porto)

Doutora Maria de Céu Ribeiro Lamas, Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto (ESSIP.Porto)

Relatório de Estágio apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Análises Clínicas e Saúde Pública** – Área de Especialização em **Microbiologia e Saúde Pública** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

## **Agradecimentos**

Quero começar por agradecer à minha linda e amada família, em especial aos meus pais e à minha querida irmã, por todo o apoio, pela força e pelo carinho que sempre me prestaram ao longo de toda a minha vida académica, sem vocês nada disto seria possível.

Aos meus fiéis amigos, por mostrarem-me que independentemente do que acontecer, estarão sempre ali para darem-me o total apoio, muito obrigada a todos.

Quero fazer um agradecimento em especial às minhas anjinhas, Cecília Marcellesi e Carlisa Santos, muito obrigada por tudo.

À minha amiga da terra dos amigos para sempre, Carla Guedes, e à minha companheira de luta, Evelyne Carvalho.

Quero agradecer particularmente ao Dr. António Araújo pela oportunidade que me proporcionou em realizar o estágio na Biogerm SA, pela partilha de conhecimentos e pela sua disponibilidade durante o meu período de estágio e na conclusão de um projeto tão importante para o meu caminho profissional.

Quero ainda deixar aqui o meu agradecimento a todos os colaboradores da Biogerm SA que dedicaram o seu tempo no acompanhamento durante o meu estágio e por estarem sempre disponíveis a ajudar-me.

Às professoras Maria Manuela Amorim e Maria Do Céu Lamas, pelo total apoio, disponibilidade, pelas opiniões e críticas, e pela total colaboração na resolução de dúvidas e problemas que surgiram ao longo da realização deste relatório, minha eterna gratidão.

A todos os que não estão aqui mencionados, mas que contribuíram, de uma forma direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

E principalmente a Deus. Obrigada por me ouvir, acalmar, abençoar e por colocar pessoas maravilhosas no meu caminho.

Que este seja o início de tudo aquilo que algum dia sonhei para o meu futuro!

De todo o meu coração, muito obrigada!

*"Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito bela para ser insignificante."*

*(Charles Chaplin)*

## Resumo

*L. monocytogenes* é um patógeno intracelular facultativo, ubiqüitário, responsável por causar a listeriose, uma das principais doenças de origem alimentar. A doença atinge preferencialmente indivíduos de risco, mas geralmente é assintomática ou leve em adultos saudáveis.

O estágio teve como principais objetivos, contactar com diferentes metodologias na vertente da Saúde Pública, mais precisamente na área da microbiologia alimentar, e realizar análises microbiológicas a alimentos e superfícies, através de métodos analíticos acreditados.

As metodologias utilizadas foram baseadas nas normas AFNOR-ABI 29/05-12/11 e ISO 11290-1:2017 para amostras alimentares, e ISO 18593:2018 e ISO 11290-1:2017 para amostras de superfícies.

Foi possível aceder e analisar dados dos resultados da pesquisa de *L. monocytogenes* em alimentos processados à base de carne e superfícies de uma unidade fabril. Das 967 amostras de alimentos analisadas por PCR em tempo real, apenas 56 foram confirmados por cultura. E das 288 amostras de superfícies analisadas pelo método cultural, 19 foram positivas.

A ausência de *L. monocytogenes* em todos os produtos alimentares e superfícies é uma condição quase impossível de atingir. Por isso, a forma de prevenção deve abranger a transmissão de informação aos consumidores e o cumprimento das BPHF, e dos HACCP por parte das indústrias alimentares.

**Palavras-chave:** *Listeria monocytogenes*; alimentos; superfícies; infeção; doenças de origem alimentar

## **Abstract**

*L. monocytogenes* is a facultative, ubiquitous, intracellular pathogen responsible for causing listeriosis, a major foodborne disease. The disease mainly affects individuals at risk but, is generally asymptomatic or mild in healthy adults.

The main objectives of the internship were the contact with different methodologies in the field of Public Health, more precisely in food microbiology and performance of microbiological analyses of food and surfaces, through accredited analytical methods.

The methodologies used were based on AFNOR-ABI 29/05-12/11 and ISO 11290-1:2017 standards for food samples, and ISO 18593:2018 and ISO 11290-1:2017 for surface samples.

It was possible to access and analyse data from the results of the search for *L. monocytogenes* in processed meat-based foods and surfaces from a manufacturing plant. Of the 967 food samples made by real-time PCR, only 56 were confirmed by culture. And of the 288 surface samples made by the cultural method, 19 were positive.

The absence of *L. monocytogenes* in all food products and surfaces is an almost impossible condition to achieve. Therefore, the way of prevention should include the transmission of information to consumers and compliance with GMP and HACCP by food industries.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*; food; contact surface; infection; foodborne disease

## Índice

1.	Introdução.....	1
1.1.	Objetivos de estágio.....	1
1.2.	A importância da Segurança Alimentar.....	2
1.3.	Doenças de origem alimentar.....	3
2.	Infeção por <i>Listeria monocytogenes</i> .....	5
2.1.	História.....	5
2.2.	Taxonomia.....	5
2.3.	Características gerais.....	6
2.4.	Epidemiologia.....	6
2.5.	Patogénese.....	8
2.6.	Diagnóstico.....	9
2.7.	Tratamento, prevenção e controlo.....	10
2.8.	<i>Listeria monocytogenes</i> em alimentos e superfícies.....	11
3.	Atividade Desenvolvida.....	14
3.1.	Análises Microbiológicas a Alimentos à base de carne.....	14
3.2.	Análises Microbiológicas a Superfícies.....	17
4.	Estudo de Caso.....	17
4.1.	Resultados e discussão.....	18
5.	Conclusão.....	21
	Referências Bibliográficas.....	23

## **Índice de tabela**

Tabela 1: Princípios para a implementação do sistema HACCP .....	3
Tabela 2: Principais fatores de virulência responsáveis pela patogenicidade da L. monocytogenes....	8
Tabela 3: Algumas medidas que podem prevenir a L. monocytogenes.....	11
Tabela 4: Critérios de segurança para pesquisa de Listeria monocytogenes em alimentos prontos a comer segundo a ISO 11290-1 .....	13
Tabela 5: Critérios de segurança para pesquisa de Listeria monocytogenes em alimentos prontos a comer segundo a ISO 11290-2 .....	13
Tabela 6: Exemplo de alguns alimentos processados à base de carne analisadas na Biogerm. ....	15
Tabela 7: Resultados da Pesquisa de L. monocytogenes em alimentos processados à base carne....	18

## Índice de figuras

<i>Figura 1. Potenciais vias de transmissão e veículos: adaptado de (16)</i> .....	4
Figura 2. Ciclo de vida celular da <i>L. monocytogenes</i> : adaptado de (41) .....	9
Figura 3: Procedimentos do método ISO 11290-1:2017 .....	16
Figura 4: <i>Listeria monocytogenes</i> em OCLA agar .....	16
Figura 5: Frequência relativa da pesquisa de <i>L. monocytogenes</i> por PCR em tempo real por mês, em 2020, e as respectivas quantidades de amostras analisadas.....	19
Figura 6: Resultados culturais positivos para a pesquisa da <i>L. monocytogenes</i> , por mês.....	19
Figura 7: Total de amostras positivas e negativas de superfícies analisadas.....	20

## **Lista de Siglas e Abreviaturas**

AFNOR- Associação Francesa de Normalização, do inglês *French Normalisation Association*

BPA - Boas Práticas Agrícolas

BPHF- Boas Práticas de Higiene e de Fabrico

ECDC- Centro Europeu para Prevenção e Controle de Doenças, do inglês *European Center for Disease Control and Prevention*

EEEA - Espaço Econômico Europeu

EU- União Europeia

FDA- Food and Drug Administration

HACCP- Análise de Riscos e Pontos Críticos de Controle, do inglês *Hazard Analysis and Critical Control Point*

HIV - Vírus da imunodeficiência humana, do inglês *Human immunodeficiency virus*

ISO- *The International Organization for Standardization*

OCLA -*Oxoid Chromogenic Listeria agar*

PCC- Pontos Críticos de Controle

PCR- Reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

SINAVE - Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica

USDA - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, do inglês *United States Department of Agriculture*

## 1. Introdução

O presente relatório surge no âmbito da unidade curricular Estágio, para obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública, na área de especialização em Microbiologia e Saúde Pública, da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto. O estágio curricular decorreu entre 18 janeiro e 7 de abril de 2021, na Biogerm Laboratórios, na Maia.

A Biogerm é um laboratório de referência na área da saúde pública, onde são realizadas análises microbiológicas e químicas no controlo da qualidade alimentar, águas e ambiente, contemplando as mais recentes e avançadas metodologias. Os laboratórios da Biogerm estão sob coordenação do Diretor Técnico Dr. António Araújo.

Este relatório está dividido em duas partes distintas. A primeira parte consiste no enquadramento teórico sobre a *Listeria monocytogenes*, baseado numa revisão bibliográfica, enquanto a segunda parte, contempla as atividades práticas realizadas, e a inclusão de estudo de casos e discussão dos resultados das análises referentes à pesquisa de *Listeria monocytogenes* de todas as amostras rececionadas no laboratório Biogerm, provenientes de uma determinada unidade fabril durante o ano de 2020.

### 1.1. Objetivos de estágio

O estágio nesta vertente de Microbiologia em Saúde Pública permitiu a integração do estagiário em ambiente laboratorial, possibilitando a compreensão da organização e do funcionamento de um laboratório acreditado. Teve como principais objetivos:

- Contactar com diferentes metodologias na vertente da Saúde Pública mais precisamente na área da microbiologia alimentar;
- Realizar análises microbiológicas a alimentos processados à base de carne e superfícies de contato, através de métodos analíticos acreditados;
- Pesquisar a presença de *Listeria monocytogenes* em alimentos processados à base de carne provenientes de Cabo Verde.
- Contactar com as metodologias de deteção por *Polimerase Chain Reaction* (PCR) em tempo real; treinar a confirmação por método cultural, na pesquisa de *L. monocytogenes* em diferentes amostras de linguiças provenientes de Cabo Verde.
- Elaborar um estudo de caso e discutir os resultados dos métodos de PCR em tempo real e método cultural em alimentos processados à base de carne e superfícies de contato de uma unidade fabril.

## 1.2. A importância da Segurança Alimentar

Os alimentos e os microrganismos encontram-se interligados, uma vez que os alimentos não apresentam apenas um valor nutricional importante para quem os consome, mas são, muitas vezes, um meio de cultura ideal para o desenvolvimento de microrganismos. Dependendo do tipo de microrganismo presente, a multiplicação microbiana pode resultar em deterioração dos alimentos ou risco microbiológico para a saúde humana. Os alimentos podem ser um veículo de transmissão de doenças, pelo que a deteção e controlo de microrganismos patogénicos, são variáveis fundamentais de controlo no âmbito da microbiologia dos alimentos e segurança alimentar (1). No entanto, apesar dos rígidos controlos na indústria alimentar, as doenças de origem alimentar são ainda um problema de Saúde Pública em todo o mundo (2).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde as doenças de origem alimentar são geralmente de natureza infecciosa ou tóxica, transmitidas através da ingestão de alimentos ou água (3). O desrespeito pelos padrões higiénicos e sanitários pode levar à contaminação de qualquer alimento por substâncias tóxicas, parasitas e/ou microrganismos patogénicos. Frequentemente, as contaminações ocorrem no processo de manipulação até ao consumo final, por consequência da má higienização do ambiente, dos utensílios, dos manipuladores, preparação incorreta e armazenamento inadequado (4).

A produção e a industrialização de alimentos isentos de bactérias patogénicas é, na prática, muito difícil. Porém, a aplicação de programas de segurança alimentar como *Hazard Analysis and Critical Control Point* (HACCP), Boas Práticas Agrícolas (BPA), e Boas Práticas de Higiene e de Fabrico (BPHF) constituem uma estratégia global eficiente de gestão do risco e de controlo dos perigos microbiológicos (5, 6).

Especificamente, as BPHF são programas de pré-requisitos que contemplam vários aspetos da indústria de alimentos, como a estrutura física da empresa e a sua manutenção, higiene pessoal, controle de pragas, técnicas e equipamentos de higienização, calibração de instrumentos, entre outros. Através da sua aplicação assegura-se o melhoramento nos parâmetros químicos, sensoriais e microbiológicos dos produtos (7).

Por sua vez, o HACCP consiste numa abordagem sistemática e estruturada sobre o processo produtivo dos alimentos, para assegurar a obtenção de produtos com elevada segurança, em todo o seu processamento até ao consumo (8). Baseado numa metodologia preventiva, pela aplicação de princípios técnicos e científicos na produção e manipulação dos géneros alimentícios, pretende evitar potenciais riscos que possam causar danos aos consumidores, através da redução ou eliminação de perigos biológicos, químicos ou físicos (7, 8). Em Portugal, o sistema HACCP transcrito da Diretiva Comunitária (Diretiva 93/43/CE do Conselho de 14 de Junho de 1993), foi publicado no Decreto-Lei n.º 67/98 de 18 de Março de 1998 (9). Salienta-se a sua compatibilidade com outros sistemas de qualidade já implementados, nomeadamente a ISO 9000, onde os procedimentos de HACCP podem ser integrados em

termos de segurança alimentar. De acordo com as recomendações do *Codex Alimentarius*, para a implementação de um sistema HACCP, devem ser considerados 7 princípios, sistematizados na Tabela 1 (8).

Tabela 1: Princípios para a implementação do sistema HACCP

Princípios Gerais
I. Identificar os perigos e medidas preventivas
II. Identificar os pontos críticos de controlo (PCC)
III. Estabelecer limites críticos para cada medida associada a cada PCC
IV. Monitorizar/controlar cada PCC
V. Estabelecer medidas correctivas para cada caso de limite em desvio
VI. Estabelecer procedimentos de verificação
VII. Criar sistema de registo para todos os controlos efectuados

É recomendável que as medidas preconizadas pelos programas HACCP e as BPHF sejam aplicados conjuntamente em todos os processos de produção de alimentos, para um sistema de segurança alimentar eficaz (7). O abastecimento alimentar seguro apoia a economia, o comércio e o turismo de um país, além de contribuir para a segurança alimentar e nutricional e estimular o seu desenvolvimento a longo prazo (10). Acresce ainda referir que o acesso a alimentos suficientes, seguros e nutritivos são essenciais para garantir a saúde quer do indivíduo quer das populações (11).

### 1.3. Doenças de origem alimentar

As doenças de origem alimentar ainda são comuns em todo o mundo. Compreendem um conjunto vasto, a maioria das quais são infecciosas ou tóxicas, variando desde doenças diarreicas a várias formas de cancro. Podem ser provocadas por microrganismos (bactérias, vírus, parasitas, fungos, priões), toxinas, químicos, radioatividade ou agentes físicos. A prevenção e controlo destas doenças é, portanto, muito complexa. Apesar de todos os indivíduos estarem em risco de contrair doenças de origem alimentar, são as populações vulneráveis - crianças pequenas, mulheres grávidas, idosos, pessoas imunocomprometidas e aqueles que vivem na pobreza ou em situação de insegurança alimentar - as mais afetadas (3).

As respostas dos indivíduos a estas doenças são influenciadas por diversos fatores como a idade, o estado de saúde, o estado nutricional, a virulência do microrganismo ou da toxina por ele produzida e a quantidade ingerida. A exposição aguda e crónica pode causar efeitos adversos para a saúde, variando entre efeitos ligeiros e autolimitados (náuseas, vômitos e diarreia, por exemplo) a graves (insuficiência

renal e hepática, perturbações neurológicas, artrite reativa, septicemia, por exemplo) e até à morte (3, 12-14).

As bactérias mais frequentemente associadas a doenças de origem alimentar são: *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, e *Escherichia coli* patogénica. Embora menos comum, a infeção por *Listeria spp.* é frequentemente grave, com uma elevada taxa de casos fatais (2, 15). No caso específico da *Listeria monocytogenes*, várias são as possibilidades de transmissão de entre ruminantes, humanos, produtos alimentares e o ambiente. Estas possibilidades estão representadas na Figura 1, onde as setas e caixas coloridas indicam potenciais vias de transmissão e veículos, respetivamente.

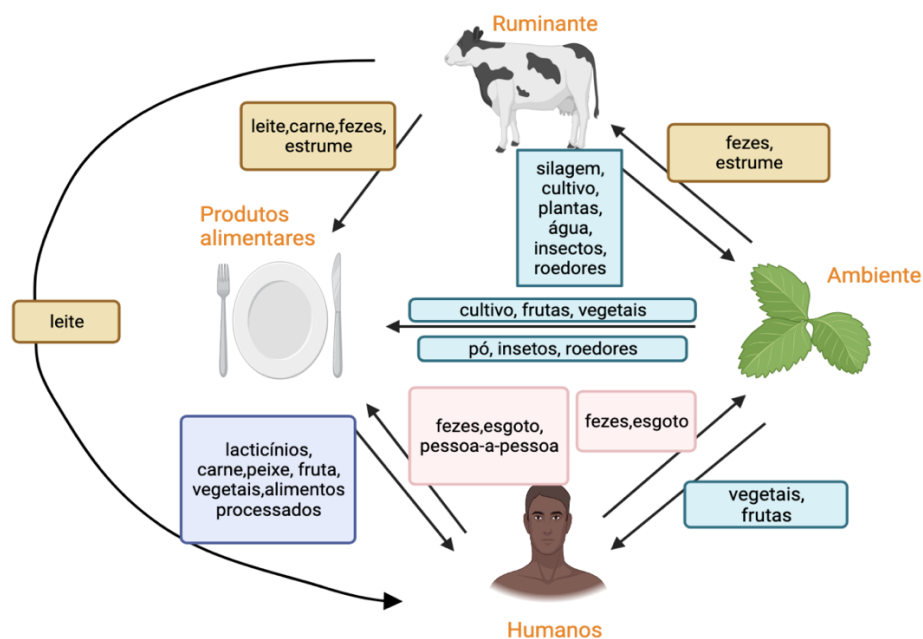


Figura 1. Potenciais vias de transmissão e veículos: adaptado de (16)

Do ponto de vista nutricional, a importância da carne e dos produtos à base de carne, deriva do seu alto valor proteico, contendo todos os aminoácidos essenciais, além de minerais com alta biodisponibilidade, vitaminas e micronutrientes, essenciais para o crescimento e o desenvolvimento do ser humano. Por essa razão desempenham um papel fundamental na evolução humana (17).

Segundo o regulamento (CE) N.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004, entende-se por carne todas as partes comestíveis de animais ungulados domésticos (bovinos, suínos, ovinos e caprinos domésticos, e solípedes domésticos), aves de capoeira, lagomorfos, animais de caça selvagem para consumo humano, incluindo o sangue (18). Este regulamento refere ainda que os produtos à base de carne são produtos resultantes da transformação da carne fresca ou da posterior transformação desses produtos transformados, de tal modo que a superfície de corte à vista permita constatar o desaparecimento das características da carne fresca. O processamento da carne oferece a oportunidade de agregar valor, reduzir o preço, melhorar a segurança alimentar e prolongar o seu tempo

de vida útil. Os métodos de processamento envolvem técnicas de cura, secagem e/ou fumagem, em estufas elétricas e/ou fumeiro tradicional a lenha. As técnicas de cura e secagem dos produtos têm o intuito de garantir a estabilidade microbiológica destes. Já a fumagem utiliza-se, hoje em dia, pelos componentes sensoriais ativos obtidos no processo, e ainda para aromatização e coloração dos produtos (18).

A carne constitui a matéria-prima principal da maioria dos produtos cárneos transformados. Os produtos de transformação cárnea apresentam uma grande variedade de sabores, formas e texturas, como resultado da diversidade das matérias-primas, dos ingredientes e dos processos de fabrico utilizados. O termo “salsicharia”, conhecido mundialmente, engloba todos os produtos de transformação cárnea. Destes fazem parte não só os enchidos, mas também todas as carnes curadas como os presuntos, as pás e outros. Em Portugal é utilizada, maioritariamente, a carne de porco (19).

## 2. Infecção por *Listeria monocytogenes*

### 2.1. História

A *L. monocytogenes* foi identificada pela primeira vez em 1926, por Murray, Webb e Swann, que a designaram de *Bacterium monocytogenes*, depois de terem constatado a monocitose num grupo de coelhos na cidade de Cambridge. Mais tarde, em 1940, Pirie sugeriu que o microrganismo fosse denominado de *Listerella hepatolytica* e, posteriormente, de *Listeria monocytogenes*, em homenagem ao cientista que a isolou, Lister, e pelo facto de originar monocitose (13, 14, 20-22).

Desde a sua identificação, diferentes manifestações de infeções em animais e humanos, começaram a ser documentadas, porém, a partir de 1981, a bactéria foi diretamente relacionada pela primeira vez ao consumo de alimentos e como causa da doença infecciosa denominada Listeriose (13, 14, 20, 21). O primeiro surto de listeriose ocorreu no Canadá e foi associado ao consumo de salada de repolho contaminada. Desde então, surtos de listeriose têm demonstrado a gravidade da doença, com elevados índices de mortalidade principalmente em idosos, imunocomprometidos e gestantes (6, 13).

### 2.2. Taxonomia

O género *Listeria* pertence à família *Listeriaceae*, ordem *Bacillales*, classe *Bacilli* e filo Firmicutes do reino Eubacteria. Este filo contém atualmente dezassete espécies, agrupadas em *Listeria sensu stricto* (*Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria marthii*) e *Listeria sensu lato* (*Listeria fleischmannii*, *Listeria grayi*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria weihenstephanensis*, *Listeria floridensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria cornellensis*, *Listeria riparia*, *Listeria grandensis*, *Listeria booriae*, *Listeria newyorkensis*) (23-25). De todas as espécies apenas a *L.*

*monocytogenes* e a *L. ivanovii* são consideradas patogénicas, sendo que a *L. monocytogenes* está associada a infeções grave em humanos, e a *L. ivanovii* está principalmente associada a infeções produzidas em outros mamíferos, embora tenha havido alguns casos esporádicos em humanos (13, 14, 20, 26).

### 2.3. Características gerais

A *Listeria monocytogenes* é um bacilo pequeno (0,4 a 0,5 × 0,5 a µm), Gram positivo, anaeróbio facultativo, não capsulado e não esporulado. É capaz de crescer numa ampla faixa de temperatura (0°C a 45°C, com temperatura ótima de crescimento 30–37°C), pH (4,7 a 9,2), altas concentrações de açúcar (39,4% de sacarose) e sal (10% de NaCl), e em valores de atividade da água (*a<sub>w</sub>*) inferiores a 0,93 (13, 15, 20, 26, 27).

É oxidase negativo, catalase positivo, produz fraca β-hemólise em gelose de sangue, produz ácido mas não gás a partir de alguns carboidratos, imóvel a 37°C, mas a 20–25°C apresenta uma mobilidade lembrando cambalhotas (15, 20). Tem um período de incubação que pode variar de 7 dias até 3 meses (22, 28).

Por observação direta ao microscópio ótico, os bacilos pequenos, aparecem isolados, aos pares ou em cadeias curtas, e podem ser confundidos com *Streptococcus pneumoniae* ou *Enterococcus*, aspeto importante porque quer o *Streptococcus pneumoniae* como a *L. monocytogenes* podem causar meningite (20, 27).

### 2.4. Epidemiologia

*L. monocytogenes* é um patógeno intracelular facultativo, com carácter ubiqüitário, amplamente distribuído no meio ambiente, que pode habitar uma ampla gama de nichos ecológicos: plantas, solo, animais, resíduos de matadouro, leite de animais saudáveis ou com mastite, fezes humanas e de animais, esgotos, pássaros, peixes, crustáceos, insetos, e outros animais. Este microrganismo é capaz de entrar na cadeia alimentar, via matéria-prima, podendo sobreviver em reservatórios ou recontaminar produtos finais (13, 21, 29). É considerado um microrganismo patogénico oportunista no Homem, sendo um agente patogénico primário nos animais, estando descritos portadores assintomáticos, tanto nos animais como no Homem (21). Pode ser transmitido ao Homem principalmente pelo consumo de alimentos contaminados, por transmissão vertical (mãe para filho), contacto zoonótico (contato do animal com o homem) e no âmbito nosocomial (em unidades prestadoras de cuidados de saúde) (9, 16, 23, 27).

Apesar de ser desconhecida qual a incidência de portadores intestinais humanos, estima-se que seja de 1 a 5%, e de forma transitória até 70% da população. No entanto, a incidência da doença será muito maior em populações de alto risco como recém-nascidos, grávidas, idosos, portadores do vírus da

imunodeficiência humana (HIV), transplantados, doentes neoplásicos e toxicodependentes. É de referir que mulheres grávidas portadoras entéricas de *L. monocytogenes* podem dar à luz bebés saudáveis (21), sendo a suscetibilidade à listeriose maior nas mulheres com histórico de aborto do que nas que nunca abortaram (30).

A listeriose esteve sempre presente no meio rural, porém, surge nos dias de hoje como um problema urbano emergente, sendo observada sobretudo nos países industrializados, resultante dos atuais hábitos alimentares e das condições de armazenamento de alimentos (21). A doença atinge preferencialmente indivíduos de risco (imunocomprometidos ou com doença grave), como já referido, mas geralmente é uma doença assintomática ou leve em adultos saudáveis. As principais condições predisponentes são neoplasias hematológicas, insuficiência renal, diabetes *mellitus*, cirrose, asma, colite ulcerosa, uso de drogas imunossupressoras, portador HIV, recém-nascidos, grávidas e idosos (31, 32).

A doença pode ocorrer em duas formas distintas: listeriose invasiva ou não invasiva. A forma invasiva é encontrada principalmente em mulheres grávidas, idosos e imunocomprometidos, e está associada a complicações graves como a meningite, septicemia, encefalite e aborto, com alta taxa de mortalidade. A não invasiva também é conhecida como gastroenterite febril e as manifestações são similares às da gripe (febre, fadiga, mialgias, mal-estar, náusea, vômito e diarreia) (2, 13, 28, 33). A doença no recém-nascido é a forma mais grave da doença, podendo ser de início precoce, adquirida no útero, pela passagem da bactéria através da placenta. Apresenta alta mortalidade, e pode resultar em aborto, natimorto, nascimento prematuro ou infeções graves, como a granulomatose infantil séptica. Aquando de início tardio (adquirida durante a passagem pelo canal do parto ou logo após o nascimento), manifesta-se sob a forma de meningite ou meningoencefalite com septicemia, que podem levar à morte do recém-nascido (2, 13, 28, 33). A granulomatose infantil séptica é uma forma grave de listeriose caracterizada pela formação de abscessos disseminados, granulomas em múltiplos órgãos (pele, fígado, baço, supra-renal, pulmão) com alta taxa de mortalidade (6, 20, 34).

Apesar da listeriose ser considerada relativamente rara, com uma incidência de 0,1 a 1,1 caso/100.000 habitantes, a sua elevada taxa de mortalidade e o envolvimento frequente, aquando dos surtos, de alimentos industrialmente processados, faz com que o impacto social e económico desta doença seja um dos maiores entre as toxi-infeções alimentares (21, 28, 35, 36). A taxa de mortalidade da doença é aproximadamente 30%, e está associada a fatores como a idade avançada, infeção do sistema nervoso central (SNC) e imunodeficiência. Cerca de 45% dos casos de infeção perinatal são fatais, e a infeção nos dois primeiros trimestres de gestação resulta quase sempre na morte do feto (28).

Apesar da maioria dos casos de listeriose serem esporádicos, podem ocorrer surtos. A listeriose esporádica acontece ao longo do ano, apesar de ser mais comum nos meses de primavera e verão, devido às variações sazonais, e ao consumo de alimentos de maior risco consumidos nos meses mais quentes (6).

Na EU, entre 2008–2017 houve um aumento estatisticamente significativo nos casos confirmados de listeria. Em 2017 foram relatadas 227 mortes devido à listeriose, o que corresponde a uma letalidade de 13,8%. Em Portugal, no mesmo ano foram notificados 42 casos de listeriose invasiva por 100.000 habitantes, o que representa uma taxa de 0,41% (37).

## 2.5. Patogénese

Treze serotipos, distribuídos em quatro linhagens, foram descritos em todo o mundo; mas são três os mais comumente associados à listeriose humana: 1/2a, 1/2b e 4b. Este último é o mais frequente, sendo responsável por 50% dos grandes surtos epidémicos relatados e 90–95% dos casos esporádicos (2).

A patogénese da *L. monocytogenes* está relacionada principalmente à sua capacidade de sobreviver e multiplicar no interior de células fagocitárias do hospedeiro devido a vários fatores de virulência (38), dos quais são descritos os principais na Tabela 2 (39, 40).

Tabela 2: Principais fatores de virulência responsáveis pela patogénese da *L. monocytogenes*

Fatores	Descrição
<p>internalina A (InIA)  internalina B (InIB)  internalina C (InIC)</p>	<p>São proteínas que permitem a internalização da bactéria em células epiteliais. A internalina A (InIA) medeia a aderência às células do hospedeiro; a internalina B (InIB) funciona como molécula de sinalização celular, contribuindo para o processo de invasão celular; e a internalina C (InIC) participa da disseminação da bactéria célula a célula, formando protusões que permitem a transferência de uma célula a outra.</p>
<p>listeriolisina O (LLO)</p>	<p>É o principal fator de virulência das listerias, atua como hemolisina, formando poros nas membranas de macrófagos e fagócitos. É ativada no interior dos vacúolos do fagossoma, causando seu rompimento e permitindo a disseminação da bactéria pela célula. A perda da expressão de LLO leva a perda da virulência da bactéria.</p>
<p>posfolipases C (Pfc)</p>	<p>Degradam os fosfolípidos das membranas dos vacúolos. Os poros formados pela LLO facilitam a ação das fosfolipases, o que promove dissolução total do compartimento fagossómico.</p>
<p>fator de actina (ActA)</p>	<p>É uma proteína que confere motilidade à bactéria através do citoplasma da célula hospedeira, devido à formação de uma cauda de actina polimerizada numa extremidade da bactéria, que a propulsiona</p>
<p>permease</p>	<p>Enzima que permite a bactéria usar hexoses fosfato como fonte de carbono e energia, para a sua replicação dentro da célula hospedeira</p>

Quando a bactéria é ingerida na alimentação chega ao intestino onde encontra as células M ou enterócitos nas placas de *Peyer*, servindo como porta de entrada. A partir deste momento, os vários fatores de virulência atuam de forma sequencial, como pode ser observado no esquema da Figura 2.

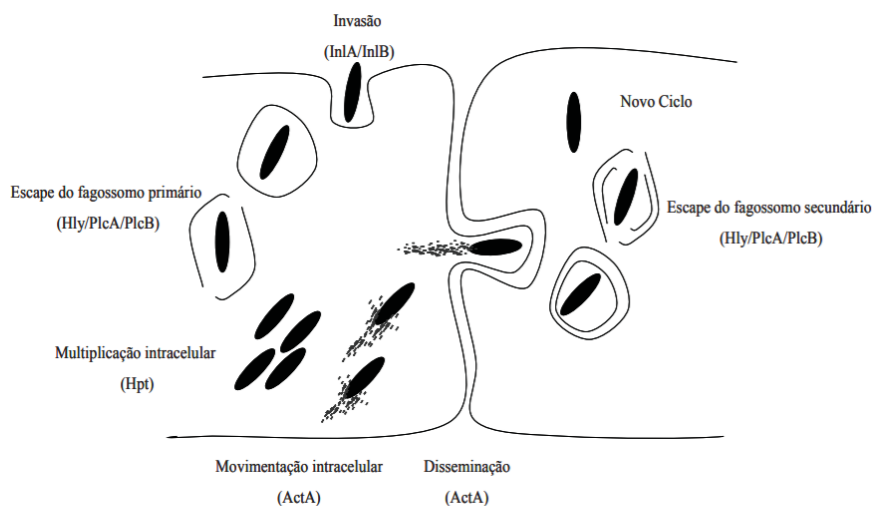


Figura 2. Ciclo de vida celular da *L. monocytogenes*: adaptado de (41)

## 2.6. Diagnóstico

Vários métodos convencionais foram desenvolvidos para o isolamento e identificação de *L. monocytogenes* em amostras de alimentos. Destes, os exames culturais continuam a ser considerados o *gold standard* pela sua sensibilidade e especificidade, baixo custo comparativamente a outras metodologias. Contudo, apresentam algumas desvantagens, das quais se destacam: serem trabalhosos e resultados mais demorados, baixa resolução para distinção das estirpes bacterianas, as alterações fenotípicas devido à seleção ambiental, e a interferência de bactérias contaminantes que podem inferir em resultados falso-negativos (39, 42).

O isolamento e identificação de *L. monocytogenes* por métodos culturais exige a incorporação de agentes seletivos e procedimentos de enriquecimento, para inibir outra microflora competitiva, e aumentar a capacidade de isolamento de *L. monocytogenes* (39).

De acordo com os normativos, as metodologias mais comumente usadas para isolamento de *L. monocytogenes* em alimentos incluem meios standardizados. Independentemente dos métodos, todos exigem enriquecimentos primários e/ou secundários das amostras em meio de caldo seletivo (39, 42).

O método ISO 11290 utiliza caldo Semi-Fraser e caldo Fraser para enriquecimento primário e secundário, respectivamente, e é recomendado para o isolamento de *L. monocytogenes* em uma grande variedade de alimentos e rações, bem como em amostras ambientais. O método do Departamento de

Agricultura dos Estados Unidos (USDA) usa um enriquecimento em duas etapas, a primeira no meio de University of Vermont e a segunda no caldo Fraser, é o recomendado para a detecção de *Listeria spp.* em produtos alimentares de carnes e aves, e amostras ambientais. O método de One-Broth Listeria é utilizado para o isolamento de *Listeria spp.* a partir de laticínios, carnes, frutos do mar e vegetais, e utiliza enriquecimento em caldo de Listeria, em uma etapa (39, 42).

Após o enriquecimento primário e secundário, o caldo é geralmente semeado em meios seletivos e/ou diferenciais. A ISO 11290 recomenda o uso de Oxford agar ou Polymyxin-Acriflavine-LiCl-Ceftazidime-Aesculin-Mannitol (PALCAM), e um meio cromogénico que pode ser o *Agar Listeria de according to Ottaviani e Agosti* (ALOA) ou outro similar como os *Biosynth Chromogenic Medium* (BCM), *Oxoid Chromogenic Listeria agar* (OCLA), e *CHROM agar Listeria*, para detecção e isolamento de *L. monocytogenes*. O USDA usa meios cromogénicos como ALOA e RAPID-L. mono, enquanto o método One-Broth Listeria requer o uso de agar Brilliance Listeria (39, 42).

Os meios cromogénicos são tipicamente dependentes da atividade  $\beta$ -glicosidase de Listeria, que cliva o substrato cromogénico produzindo colónias azuis ou verdes. A lecitina presente no ágar é hidrolisada pela enzima fosfolipase, sintetizada apenas por *L. monocytogenes*, levando à formação de halos opacos em torno de suas colónias. Colónias presuntivas de Listeria em agar seletivo são confirmadas por testes como a coloração de Gram, teste de oxidase, teste de catalase, teste de motilidade, capacidade de produzir hemólise em placas de agar sangue, teste de Christie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP) com *Rhodococcusequie Staphylococcus aureus* e testes de utilização de carboidratos (39, 42).

A identificação de *L. monocytogenes* utilizando métodos moleculares tornou-se muito popular, pois são técnicas extremamente sensíveis, precisas e específicas, alguns exemplos são a hibridização de DNA e o PCR (34, 39).

Existem diferentes tipo de PCR, entre eles, PCR convencional, PCR multiplex, PCR em tempo real, etc, estes métodos são muito sensíveis e específicos, no entanto, não conseguem distinguir entre células vivas ou mortas ou células viáveis, mas não cultiváveis, células metabolicamente danificadas, estressadas ou detetar de forma confiável níveis baixos de *L. monocytogenes*. Portanto, uma amostra positiva por PCR não significa necessariamente que o organismo está vivo e nas concentrações necessárias que o torna um risco para a saúde pública (34, 39).

## 2.7. Tratamento, prevenção e controlo

A maioria destas doenças requer um tratamento simples por serem passageiras. Contudo, nos casos mais graves, pode ser necessário recorrer a tratamentos mais prolongados e/ou necessidade de recorrer ao uso de antibióticos. Pode ser administrada antibioterapia com ampicilina ou penicilina (em conjunto ou isoladas), ou outro dos vários antibióticos existentes, com a duração de duas a seis semanas (média de 21 dias) (23, 28, 32).

Apesar da resistência a antibióticos ser raramente observada, recentemente a frequência de estirpes resistentes a um ou vários antibióticos comumente usados, tem aumentado. Este facto pode resultar da aquisição de novos genes pela bactéria, pelo consumo indevido e/ou inadequado de antibióticos, originando estirpes multirresistentes (30). A primeira estirpe de *L. monocytogenes* multirresistente foi detetada em 1988, caracterizada pela resistência à tetraciclina, estreptomicina, eritromicina e cloranfenicol. Posteriormente, vários padrões de resistência têm sido observados provenientes de casos alimentares, clínicos e ambientais (30).

A gestão eficaz do tratamento é muito importante, mas será fundamental continuar a investir na prevenção para garantir a segurança e saúde das populações. Deste modo, a listeriose pode ser evitada através de medidas coletivas e individuais de higiene e segurança alimentar. No contexto da indústria agroalimentar e em estabelecimentos de restauração e bebidas, recomenda-se o cumprimento dos princípios do sistema HACCP. Relativamente à responsabilidade individual, algumas medidas são recomendadas (Tabela 3) durante o processamento e manuseamento de produtos alimentares (34).

Tabela 3: Algumas medidas que podem prevenir a *L. monocytogenes*

Medidas de prevenção
Cozinhar bem os alimentos
Consumir os alimentos o mais brevemente possível após a sua confeção
Evitar a ingestão de alimentos crus de origem animal
Evitar o contacto entre alimentos crus e cozinhados
Lavar bem a fruta e vegetais crus
Manter a temperatura de refrigeração $\leq 4^{\circ}\text{C}$
Proteger os alimentos do contacto com animais
Manter as superfícies, equipamentos e utensílios que contactem com os alimentos devidamente higienizados
Reforçar a boa higiene das mãos após a manipulação de alimentos crus

## 2.8. *Listeria monocytogenes* em alimentos e superfícies

A *L. monocytogenes* é reconhecida por apresentar ótima adaptação a condições desfavoráveis comparativamente a outros microrganismos, por resistir à ação dos desinfetantes, formar biofilme, e sobreviver ou multiplicar-se sob características físico-químicas extremas. Estas características promovem a sua sobrevivência e proliferação numa grande variedade de matrizes alimentares. O facto de sobreviver a temperaturas muito baixas, faz com que alimentos com uma pequena quantidade destas bactérias se tornem altamente contaminados durante a refrigeração prolongada (20, 23, 24). Por ter a

capacidade de formar biofilme, torna-se persistente em ambientes como o da indústria alimentar, representando um grande desafio (20, 23, 24).

Os alimentos crus e industrialmente processados quando contaminados, como o leite pasteurizado e produtos lácteos, carnes e produtos cárneos, vegetais crus, frutos do mar e alimentos prontos para consumo, principalmente produtos de charcutaria, demonstraram ser de grande risco e as principais causas de infecção (24, 33, 43). Paralelamente, os produtos que representam um maior risco são aqueles cujo processo de fabrico não inclui qualquer etapa de redução/eliminação de *L. monocytogenes* e cujas matérias-primas apresentam elevada concentração da bactéria. Nesta categoria de produtos incluem-se o leite cru, os lacticínios produzidos com leite cru, peixe fumado e alguns enchidos(27). A dose infecciosa exata de *L. monocytogenes* não está definida, pois depende da suscetibilidade do organismo hospedeiro e da virulência da estirpe (25).

A maioria das carnes processadas são submetidas a tratamentos térmicos que diminuem os níveis desta bactéria nos alimentos. No entanto, a proliferação bacteriana pode ocorrer durante o armazenamento refrigerado até ao seu consumo, como resultado de um tratamento térmico inadequado (31, 43). Nos alimentos, a *L. monocytogenes* é relativamente resistente aos ingredientes utilizados na cura (cloreto de sódio, nitritos, nitratos, dextrose), e estes parecem inclusivamente protegê-la dos tratamentos térmicos (31).

Em Portugal, a listeriose é uma doença de notificação obrigatória desde 2014, através do Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica (SINAVE)(34). Desde 2007, o Centro Europeu para Prevenção e Controle de Doenças (ECDC) é responsável pela vigilância da listeriose em toda a EU, incluindo a facilitação da deteção e investigação de surtos de origem alimentar. Os dados de vigilância para a *L. monocytogenes*, incluindo parâmetros de análises culturais e molecular, são relatados pelos países da União Europeia/Espaço Económico Europeu (UE / EEE) ao Sistema de Vigilância Europeu (TESSy)(44). A *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América tem uma política de tolerância zero para *L. monocytogenes* nos seus programas de amostragem aplicadas à indústria. Outros países, inclusive Portugal, adotaram diretrizes menos rígidas, que apesar de existir uma presença residual da bactéria (<10<sup>2</sup> UFC / g), permite manter a proteção da saúde pública e evita o desperdício alimentar e agravamento nas coimas às indústrias alimentares (6).

De acordo com vários normativos em vigor – Regulamento (CE) N.º 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro de 2005 e norma ISO 11290-1 – os critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios e de segurança para pesquisa de *L. monocytogenes* em alimentos prontos a comer, respetivamente, são considerados satisfatórios quando cumprem as diretrizes mencionadas na Tabela 4 (45).

Tabela 4: Critérios de segurança para pesquisa de *Listeria monocytogenes* em alimentos prontos a comer segundo a ISO 11290-1

Categoria de alimentos	Limite
Alimentos prontos para consumo destinados a lactentes alimentos prontos para consumo e para fins medicinais específicos.	Ausência em 25g
Alimentos prontos para consumo suscetíveis de permitir o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> , exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos.	<sup>1</sup> Ausência em 25g

De acordo com o mesmo regulamento, e seguindo a norma ISO 11290-2, os critérios de segurança para pesquisa de *L. monocytogenes* em alimentos prontos a comer são considerados satisfatórios conforme os limites expressos na Tabela 5 (45).

Tabela 5: Critérios de segurança para pesquisa de *Listeria monocytogenes* em alimentos prontos a comer segundo a ISO 11290-2

Categoria de alimentos	Limite
Alimentos prontos para consumo suscetíveis de permitir o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> , exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos.	<sup>2</sup> 100 ufc/g
Alimentos prontos para consumo não suscetíveis de permitir o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> , exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos.	100 ufc/g

No entanto, em alimentos prontos para consumo que tenham recebido um tratamento térmico ou outro tratamento eficaz para eliminar a *L. monocytogenes*, quando não for possível uma recontaminação após este tratamento, não se justifica realizar a sua pesquisa.

Para além do anteriormente exposto, outro aspeto a considerar são as superfícies, por serem uma das principais vias de contaminação dos alimentos. São considerados superfícies todos os utensílios, equipamentos, os manipuladores e até mesmo as próprias instalações. Vários estudos demonstram a capacidade de *L. monocytogenes* contaminar equipamentos, e utensílios, levando à formação de biofilmes, o que lhes confere maior resistência aos diferentes tratamentos de limpeza e desinfecção utilizados na indústria alimentar, facilitando assim as contaminações cruzadas (13, 31). Biofilmes são descritos como agregações microbianas formadas por populações desenvolvidas a partir de uma única ou múltiplas espécies., associados à sua matriz polimérica (43, 46). A matriz proporciona proteção contra agressões químicas e físicas. Por isso, na indústria alimentar, antes de escolher as superfícies devem-se considerar alguns fatores, pois o material usado e as suas características podem influenciar diretamente na adesão microbiana e posteriormente na formação de biofilme (13).

<sup>1</sup> Este critério é aplicável aos produtos antes de deixarem de estar sob o controlo imediato do operador da empresa do sector alimentar que os produz, se este não puder demonstrar, à autoridade competente, que o produto não excederá o limite de 100 ufc/g até ao termo do seu período de vida útil.

<sup>2</sup> Este critério é aplicável se o fabricante puder demonstrar, à autoridade competente, que o produto não excederá o limite de 100 ufc/g até ao fim do seu período de vida útil.

Os métodos mais usados para a análise microbiológica de superfícies utilizam zaragatoas e placas de contacto. Estas últimas são placas de Petri especiais, preenchidas com um meio de cultura adequado, de tal forma que, quando a placa é invertida, o meio de cultura contacta com a superfície em estudo. O método de amostragem por zaragatoa é relativamente fácil e rápido de realizar, sendo feito um esfregão em forma de zigzag sobre a superfície a ser analisada, o mesmo acontece com os manipuladores de alimentos e respetivos utensílios (1). A FDA e a FSIS, defendem que a estratégia mais eficaz para o controlo de *L. monocytogenes* em produtos alimentares é a implementação de sistemas de controlo de segurança alimentar, como por exemplo o HACCP (19, 27).

### **3. Atividade Desenvolvida**

Durante o estágio foi possível observar e compreender o fluxograma de entrada de amostras, processamento e interpretação de resultados no laboratório de microbiologia da Biogerm. Neste âmbito, e a título de exemplo das atividades laboratoriais desenvolvidas em vários alimentos, optou-se por descrever de forma mais exaustiva o processamento de amostras de linguiças de Cabo Verde.

As linguiças utilizadas são um tipo de enchido artesanal tradicional cabo-verdiano.

Todas amostras de linguiças de Cabo Verde analisadas apresentaram resultados negativos pelo método de PCR em tempo real. Em relação ao método cultural, houve crescimento microbiológico, porém nenhum das colónias eram sugestivas de *Listeria monocytogenes*, o que confirma os resultados negativos obtidos pelo método de PCR em tempo real.

#### **3.1. Análises Microbiológicas a Alimentos à base de carne**

Durante o estágio foi possível observar e praticar análises laboratoriais a diferentes tipos de alimentos, através de métodos de ensaio normalizados. Estes métodos, devidamente validados, estão sujeitos a atualizações periódicas e são reconhecidos pela comunidade laboratorial nacional e internacional.

As análises microbiológicas aos alimentos baseiam-se na preparação da amostra, seguidas da técnica de incorporação ou espalhamento, e devem ser analisadas, preferencialmente, nas 24 horas após a sua receção. Sempre que tal não seja possível, os alimentos devem ser armazenados (Produtos estáveis, Congelados e ultracongelados, Produtos refrigerados e ou perecíveis).

Algumas das amostras analisadas no laboratório microbiologia da Biogerm correspondem a alimentos processados a base de carne (descrição na Tabela 6), assim como de superfícies de contacto de equipamentos, utensílios, manipuladores, entre outros.

Tabela 6: Exemplo de alguns alimentos processados à base de carne analisadas na Biogerm.

Alimentos	
Bacon	Chouriço corrente
Fiambre (cozidos e fumados)	Salsichas frescas
Linguiça	Presuntos

### 3.1.1 Metodologias utilizadas

Atualmente há uma grande necessidade de detetar rapidamente os agentes patogénicos de forma a evitar surtos de toxi-infeções, e uma das técnicas mais utilizadas nos dias de hoje é o PCR em tempo real (1). Contudo, a técnica de PCR em tempo real deteta tanto microrganismos viáveis como não viáveis, e para confirmar a viabilidade dos resultados obtidos, e continua a ser necessário a utilização de um método que permita identificar somente microrganismos viáveis, como é o caso das culturas microbiológicas para confirmar os resultados. Essa confirmação possibilita assim verificar o potencial impacto patogénico do microrganismo presente na amostra. analisados utilizando o método de PCR em tempo real, realizadas de acordo com as regras da AFNOR-ABI 29/05-12/11, mas que os positivos tiveram que ser confirmados por método cultural baseado na ISO 11290-1:2017.

A ISO 11290-1:2017- Microbiology of the food chain - *Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes and of Listeria spp.* - Part 1: *detection method*, especifica um método horizontal para a deteção de *L. monocytogenes*, e deteção de *Listeria spp.* (incluindo *L. monocytogenes*). É aplicado em produtos destinados ao consumo humano e à alimentação de animais, e a amostras ambientais na área de produção e manipulação de alimentos (47).

A figura 3 representa os procedimentos realizados no laboratório da microbiologia da Biogerm, de acordo com o método ISO 11290-1:2017

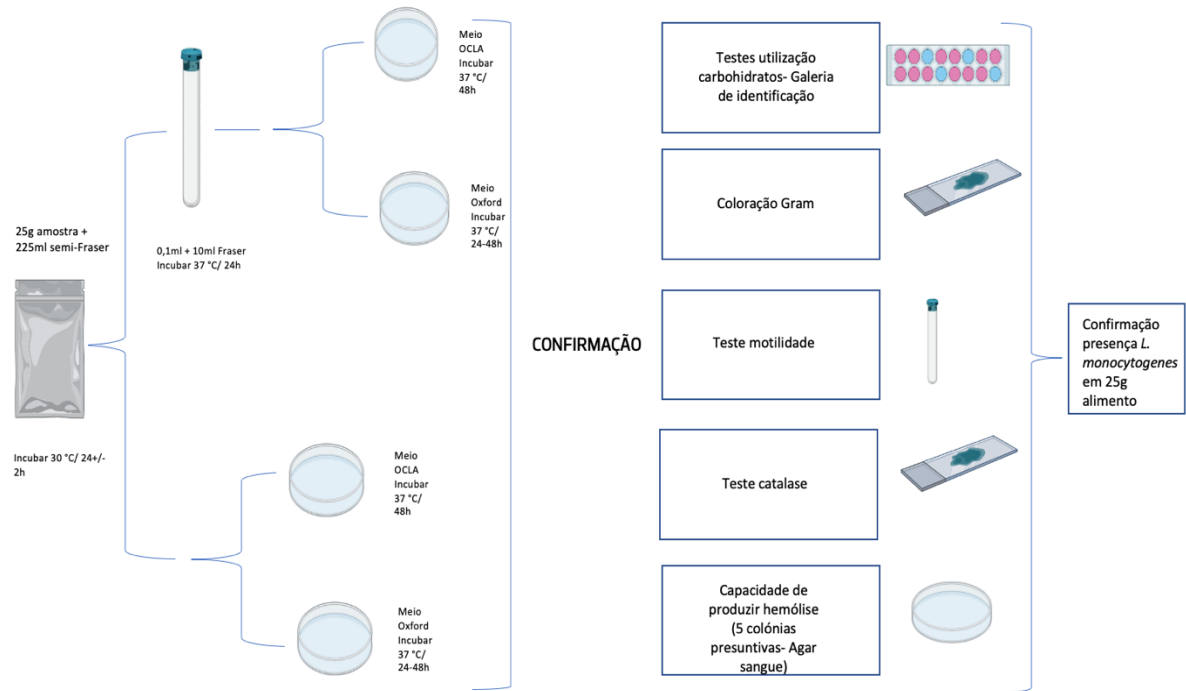


Figura 3: Procedimentos do método ISO 11290-1:2017

No meio OCLA, as colónias presuntivas de *L. monocytogenes* são azuis-esverdeadas com um halo opaco à volta, como se pode observar na Figura 4.



Figura 4: *Listeria monocytogenes* em OCLA agar

No laboratório de microbiologia da Biogerm, para a realização das técnicas de PCR são utilizados kits de deteção MicroSEQ™ *Listeria monocytogenes* para amostras de alimentos. Consiste num PCR em tempo real de poço único em que os alvos de DNA de *Listeria* são amplificados e detetados em tempo real usando sondas TaqMan® fluorescentes. É aplicado em produtos cárneos, produtos lácteos, produtos da pesca e vegetais.

### 3.2. Análises Microbiológicas a Superfícies

A detecção de *L. monocytogenes* nas superfícies é feita através do método cultural, baseado na ISO 18593:2018 e na ISO 11290-1:2017.

A ISO 18593:2018 *Microbiology of the food chain – Horizontal methods for surface sampling*, especifica métodos horizontais para técnicas de recolha de amostra utilizando, placas de contato, zaragatoas, esponjas e panos em superfícies no ambiente da cadeia alimentar, a fim de detetar e enumerar microrganismos cultiváveis, como bactérias patogénicas ou não patogénicas ou leveduras e bolores.

As amostras de superfícies analisadas no laboratório da Biogerm são colhidas por zaragatoa e chegam ao laboratório em tubo de transporte contendo 10mL do meio de enriquecimento caldo semi-fraser, e de seguida são analisadas de acordo com a ISO 11290-1:2017.

## 4. Estudo de Caso

O estudo de caso teve como principal objetivo caracterizar da frequência dos métodos de PCR em tempo real e método cultural positivos em alimentos processados à base de carne e superfícies de uma unidade, com o intuito de perceber se existe uma diferença significativa em termos da patogenicidade do microrganismo nas diferentes metodologias.

Foi possível aceder e analisar dados dos resultados da pesquisa de *L. monocytogenes* em 967 amostras de alimentos processados à base de carne, provenientes de uma unidade fabril da região norte, no laboratório de microbiologia Biogerm no ano de 2020. A detecção da *L. monocytogenes* foi realizada através da técnica de PCR em tempo real. Os resultados positivos por este método foram confirmados pelo método cultural.

Analisou-se ainda os resultados referentes a pesquisa de *L. monocytogenes* em 288 amostras de superfícies da mesma unidade fabril analisados no laboratório de microbiologia da Biogerm no ano de 2020. A detecção da *L. monocytogenes* foi realizada pelo método cultural.

## 4.1. Resultados e discussão

### 4.1.1 Pesquisa da *L.monocytogenes* em alimentos processados à base carne

Estão representados na Tabela 7 os resultados da análise da pesquisa de *L. monocytogenes* em alimentos processados à base carne.

Tabela 7: Resultados da Pesquisa de *L. monocytogenes* em alimentos processados à base carne

Amostras de alimentos N=967	PCR em tempo real (AFNOR-ABI 29/05-12/11)		Exame cultural (ISO 11290-1)	
	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
	894	73	17	56

Das 967 amostras analisadas por PCR em tempo real, 73 (8%) foram positivas, das quais, 77% (56) foram confirmados por exame cultural. Este valor equivale a 6% do total de amostras analisadas no ano de 2020. Por outro lado, 17 amostras positivas por PCR em tempo real, não foram confirmadas pelo método cultural, provavelmente porque os microrganismos não eram viáveis. Estes podiam não estar viáveis desde o momento da colheita, ou acabaram por morrer devido ao transporte e armazenamento inadequado. Sobre este aspeto, Matle *et al* (2020) consideram que os testes moleculares, como é o caso do PCR em tempo real, não têm a capacidade de distinguir microrganismos viáveis dos não viáveis. Assim, a discordância de 23% entre os dois métodos utilizados reforça a importância da confirmação dos testes realizados pela técnica de PCR.

Durante o ano de 2020, os meses com maior frequência de amostras analisadas por PCR em tempo real foram: setembro, outubro, novembro (10%, 15% e 20%, respetivamente), enquanto os meses que apresentaram valores mais baixos foram: dezembro, fevereiro e maio (Figuras 5).

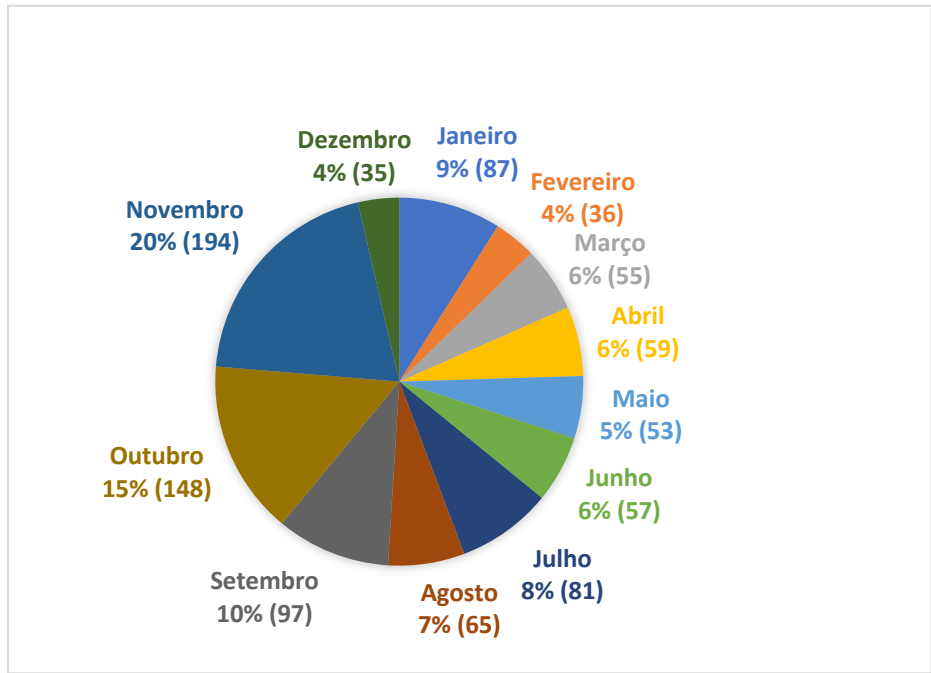


Figura 5: Frequência relativa da pesquisa de *L. monocytogenes* por PCR em tempo real por mês, em 2020, e as respectivas quantidades de amostras analisadas

Como podemos observar no gráfico seguinte (Figura 6), das 56 amostras positivas confirmadas por cultura, 14 (25%) foi no mês de novembro, 12 (21%) em outubro, 11 (20%) em setembro, 6 (11%) em fevereiro, 5 (9%) em janeiro, 4 (7%) em dezembro, 2 (3%) em março, 1 amostra em ambos os meses de maio e agosto (2%), e durante os meses de abril, junho e julho não foram detetadas nenhuma amostra com presença de *L. monocytogenes*.

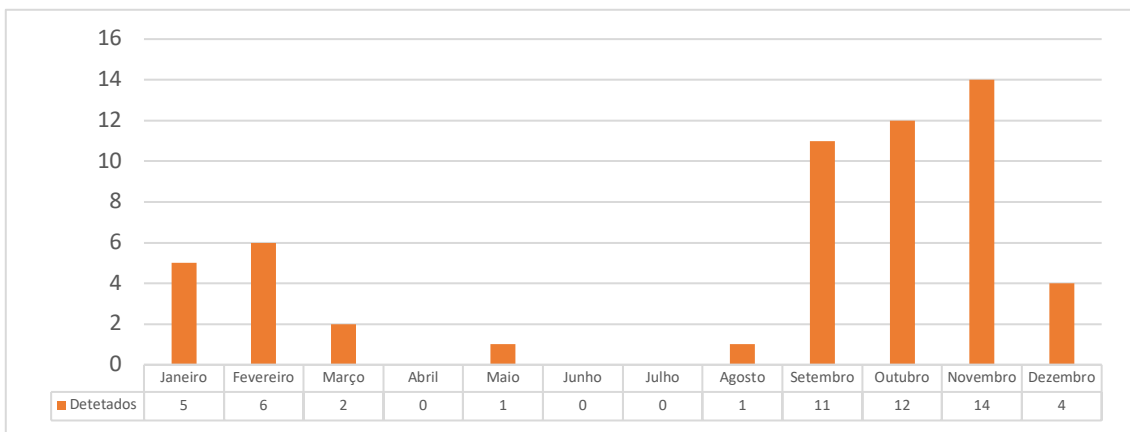


Figura 6: Resultados culturais positivos para a pesquisa da *L. monocytogenes*, por mês

Os meses que apresentam maior frequência de pesquisa de *L. monocytogenes* por PCR em tempo real são coincidentes com os meses de maior frequência de casos de *L. monocytogenes* isoladas em cultura. Segundo a literatura os casos de *L. monocytogenes* são esporádicos e podem ocorrer ao longo de todo o ano, porém são mais frequentes nos meses mais quentes. Ao analisar os nossos resultados

podemos constatar que tal não se verifica, pois foi no período de setembro a novembro que se observou a maior percentagem de culturas viáveis. Uma hipótese que pode sustentar essa discordância consiste no fato de terem sido rececionadas um maior número de amostras que precisaram de ser confirmadas nesse período.

#### 4.1.2 Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em superfícies

No total foram recebidas no laboratório de microbiologia 288 amostras de superfícies. Das 288 amostras analisadas foi possível detetar a presença de *L. monocytogenes* em 19, o que equivale a 7%, e os restantes 93% que correspondem a 269 amostras negativas (Figuras 8).

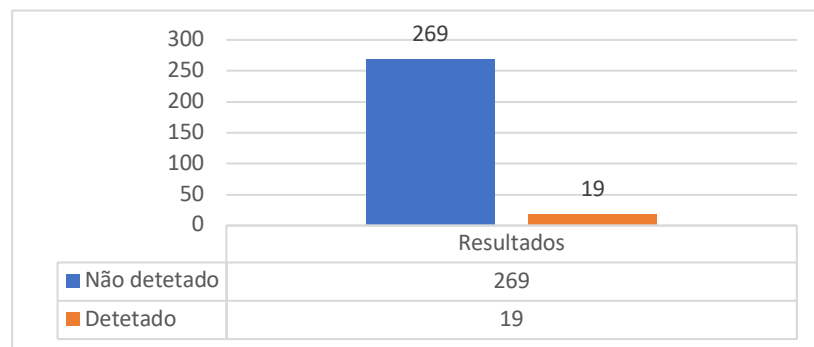


Figura 7: Total de amostras positivas e negativas de superfícies analisadas

Após analisar os resultados pode-se confirmar que a deteção de *L. monocytogenes* nos alimentos e superfícies é relativamente baixa, e está em concordância com a literatura. Porém o facto de não ter muitas amostras positivas não o torna menos preocupante, uma vez que é a taxa de letalidade deste microrganismo que o torna um problema de Saúde Pública tão grave. Efetivamente, as listerioses são um problema emergente, em que os surtos assumem elevada gravidade. Nos últimos anos, têm ocorrido vários surtos em vários países, dos quais se destaca o ocorrido em França, em 1992, que resultou em 63 mortes do total de 279 pessoas atingidas. Este surto foi associado a patés, presunto e outros produtos de salsicharia, e queijo de pasta mole. A *L. monocytogenes* tem sido isolada em produtos cárneos crus, cozinhados, fermentados e curados em vários países do mundo, mas poucos surtos associados ao consumo de carne têm sido reportados (Ferreira et al., 2014). De acordo com Mateus et al. (2018b), em Portugal, como as carnes são geralmente bem cozinhadas, o risco para o consumidor será mínimo.

Contudo, no estudo desenvolvido por Desai et al. (2019), a partir de 1998 as percentagens de casos de *Listeria* associados a novos alimentos foram calculadas e comparadas com o número total de casos de *Listeria* reportados no ProMED anualmente. Constataram que as taxas aumentaram de 0,06 em 1998-2004 para 0,28 em 2012-2018, resultando num aumento de 366% ( $p < 0,02$ ). No entanto, não podemos esquecer que a mudança dos estilos de vida tem aumentado o consumo de alimentos prontos a

consumir, ou já minimamente processados, e que por não passarem por todos os processos de controlo podem aumentar o número de casos (Mateus et al., 2018b). (48)

O laboratório Biogerm é responsável por analisar as amostras rececionadas e de seguida fornecer os resultados à entidade que os requisitou. Todas as medidas que possam a vir ser tomadas em consequências dos resultados obtidos, é da inteira responsabilidade da unidade fabril.

O facto de serem respeitadas as boas práticas durante o fabrico e processamento de alimentos não significa que os alimentos produzidos estejam isentos de microrganismos patogénicos. A produção de alimentos seguros obriga à implementação de sistemas de controlo eficazes, aplicáveis a todas as fases do processo de produção e distribuição. Assim, a ocorrência de infeções alimentares deve-se a desvios ou incidentes que não foram detetados atempadamente. Partindo do pressuposto de que o conhecimento das causas das toxi-infeções alimentares permite a respetiva prevenção, sistemas de controlo têm de ser implementados, como o HACCP. Neste âmbito, Mateus e colaboradores (2018a) inferem que a desinformação dos manipuladores é uma das limitações à eficácia desse sistema. O desrespeito pelas boas práticas, aparentemente insignificante, pode ser crucial para o controlo das BPF.

Outro aspeto importante consiste na manutenção das superfícies que contactam com os alimentos em condições de higiene adequadas. Um dos problemas presentes quando analisamos superfícies e utensílios é a flora existente. A *L. monocytogenes* tem uma grande capacidade de aderir a diversas superfícies de processamento de alimentos, formando biofilmes. Estes, por sua vez, aumentam a resistência da bactéria tornando-a persistente nestes locais, e sendo responsáveis por contaminações cruzadas. Por isso, é muito importante a análise das superfícies de contato.

## 5. Conclusão

Ao longo do período de estágio no laboratório de microbiologia Biogerm foi possível acompanhar a rotina do setor da Microbiologia dos alimentos, e contactar com as diversas metodologias da área da Saúde Pública. O estágio curricular permitiu a realização de um paralelismo entre as informações teóricas adquiridas ao longo do curso de Licenciatura assim como deste mestrado, possibilitando ainda uma visão abrangente das funções futuras em contexto laboral na área da Saúde Pública.

Após revisão da literatura, podemos constatar que a ausência de *L. monocytogenes* em todos os produtos alimentares e superfícies é uma condição quase impossível de atingir na atualidade. A mudança dos estilos de vida, o padrão de envelhecimento da população e o aumento de indivíduos imunocomprometidos tem influenciado a frequência das doenças alimentares e surtos.

Como não existe vacinação, a forma de prevenção deve abranger a transmissão de informação aos consumidores, em particular aos indivíduos de risco e aos que lhes prestam cuidados, constituindo assim uma forma de prevenção de listeriose com grande relevância.

A presença de *L. monocytogenes* em alimentos, principalmente nos sujeitos a tratamentos térmicos, é um indicador de práticas de higiene deficientes. A necessidade do controle de *L. monocytogenes* em todas as fases da cadeia alimentar é de extrema importância, podendo assim disponibilizar ao consumidor um produto alimentar isento de riscos microbiológicos, garantido a proteção da sua saúde. O cumprimento das BPHF, e dos HACCP, assume-se como essencial para o controle da contaminação no ambiente de processamento, em particular da contaminação cruzada entre matérias-primas, superfícies, equipamentos e alimentos prontos a consumir.

Com o estudo de caso podemos concluir que, devido à discordância existente entre os dois métodos, será sempre preciso fazer a confirmação das análises feitas pelo método de PCR em tempo real utilizando métodos que detetam apenas microrganismos viáveis, como é o caso dos métodos culturais, pois somente podemos garantir que o microrganismo é uma ameaça à saúde dos indivíduos.

Dois interessantes ideias para estudos futuros seria estudar os perfis de resistência aos antibióticos da *Listeria monocytogenes* e perceber melhor a resistência da *L. monocytogenes* aos desinfetantes.

Considero a minha atividade durante o estágio enriquecedora, e que os conhecimentos e competências adquiridas neste laboratório e no domínio da Saúde Pública serão uma mais-valia para a atividade profissional futura.

## Referências Bibliográficas

1. Botelho AR. Execução de ensaios microbiológicos e atividades conexas nas áreas alimentar, ambiental e técnica, em contexto empresarial (laboral)–Laboratório MicroChem. Repositorio-aberto.up.pt: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto; 2016.
2. Espinosa-Mata E, Mejía L, Villacís JE, Alban V, Zapata S. Detection and genotyping of *Listeria monocytogenes* in artisanal soft cheeses from Ecuador. *Revista Argentina de Microbiología*. 2021.
3. WHO. Food safety: WHO; 2020 [cited 2021 30/10]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>.
4. Baú D, Siqueira MR, Mooz ED, editors. *Salmonella–Agente epidemiológico causador de infecções alimentares: uma revisão*. XX Congresso Brasileiro de Economia Doméstica, VIII Encontro Latino-Americano de Economia Doméstica, I Encontro Intercontinental de Economia Doméstica Ponta Mar Hotel-Fortaleza-CE; 2009.
5. Franchin PR. Comparação de metodologia alternativas para detecção de *salmonella* sp e *listeria monocytogenes* em carnes e produtos cárneos. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos 2008.
6. Schlech WF. Epidemiology and Clinical Manifestations of *Listeria monocytogenes* Infection. *Microbiol Spectr*. 2019;7(3):1-12.
7. Cinar A, Onbasi E. Monitoring environmental microbiological safety in a frozen fruit and vegetable plant. *Food Science and Technology*. 2020;41:232-7.
8. ASAE. O que é o HACCP: Autoridade de segurança alimentar e económica; 2007 [cited 2021 25/10]. Available from: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/haccp.aspx>.
9. Eletrónica DdR. Decreto-Lei n.º 67/98: DRE; 1998 [cited 2021 30/10]. Available from: <https://dre.pt/pesquisa/-/search/197365/details/maximized>.
10. WHO. The burden of foodborne diseases in the WHO European region: WHO; 2017.
11. FAO, WHO. Second International Conference on Nutrition. FAO Rome; 2014.
12. Flores AM, Melo CB. Principais bactérias causadoras de doenças de origem alimentar. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*. 2015;37(1):65-72.
13. Ripollés-Ávila C. Supervivencia de *Listeria monocytogenes* sobre superficies de contacto con alimentos: un abordaje multidisciplinar de un problema complejo. Repositório digital de documentos da UAB: Universidade Autònoma de Barcelona; 2018.
14. Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005;29(5):851-75.
15. Trindade JA. Métodos alternativos de deteção de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*: Universidade de Aveiro; 2013.
16. Walland J, Lauper J, Frey J, Imhof R, Stephan R, Seuberlich T, et al. *Listeria monocytogenes* infection in ruminants: is there a link to the environment, food and human health? A review. *Zurich Open Repository and Archive*. 2015;157(6):319-28.
17. Gomes JI. Revisão e validação dos processos produtivos numa indústria de carnes processadas. repositorium.sdum.uminho.pt: Universidade do Minho; 2018.
18. EUR\_Lex. C1 REGULAMENTO (CE) N.º 853/2004 do PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 29 de Abril de 2004 que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal: EUR-Lex; 2004 [cited 2021 22/10]. Available from: <http://data.europa.eu/eli/reg/2004/853/2021-09-09>.
19. Silva M. Produtos cárneos tradicionais: enchidos e produtos curados. *Manual de Segurança Alimentar*. 2003.
20. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology* 6ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda; 2009.
21. Mateus TL, Rocha H, Maia RL, Teixeira P. *Listeria* e *Listeria monocytogenes* em alimentos. *TecnoAlimentar*. 2018(12):56-9.
22. WHO, FAO. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: technical report: Food & Agriculture Org.; 2004.

23. Amajoud N, Leclercq A, Soriano JM, Bracq-Dieye H, El Maadoudi M, Senhaji NS, et al. Prevalence of *Listeria* spp. and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from food products in Tetouan, Morocco. *Food Control*. 2018;84:436–41.
24. Schardt J, Jones G, Müller-Herbst S, Schauer K, D’Orazio SE, Fuchs TM. Comparison between *Listeria sensu stricto* and *Listeria sensu lato* strains identifies novel determinants involved in infection. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-14.
25. Chlebicz A, Ślizewska K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2018;15(5):29.
26. Schmid MW, Ng EY, Lampidis R, Emmerth M, Walcher M, Kreft J, et al. Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Systematic and Applied Microbiology*. 2005;28(1):1-18.
27. ASAE. *Listeria monocytogenes*. [cited 2021 05/04]. Available from: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/listeria-monocytogenes.aspx>.
28. Souza AP, Araújo GM, Ferreira MJ. Listeriose na gravidez. *Revista Médica de Minas Gerais*. 2009;432-4.
29. Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev*. 1991;55(3):476-511.
30. Heidarzadeh S, Pourmand MR, Hasanvand S, Pirjani R, Afshar D, Noori M, et al. Antimicrobial Susceptibility, Serotyping, and Molecular Characterization of Antibiotic Resistance Genes in *Listeria monocytogenes* Isolated from Pregnant Women with a History of Abortion. *Iranian Journal of Public Health*. 2021;50(1):170-9.
31. Mateus TL, Rocha H, Maia RL, Teixeira P. *L. monocytogenes* em carne e produtos cárneos. *TecnoAlimentar*. 2018;13:40-3.
32. Silva FR, Ribeiro LF. *Listeria monocytogenes* e sua importância na indústria de alimentos. *Revista GeTeC*. 2021;10(28):75-83.
33. Nayak DN, Savalia C, Kalyani I, Kumar R, Kshirsagar D. Isolation, identification, and characterization of *Listeria* spp. from various animal origin foods. *Veterinary world*. 2015;8(6):695-701.
34. DGS. Listeriose: Direção-Geral da saúde; [cited 2021 20/10]. Available from: <https://www.dgs.pt/saude-publica1/listeriose.aspx>.
35. WHO, FAO. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: interpretative summary: Food & Agriculture Org.; 2004.
36. Realpe-Delgado ME, Muñoz-Delgado ÁB, Donado-Godoy P, Rey-Ramírez LM, Stefany PLD-G, Mayorga AA. Epidemiología de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter* spp., en la cadena productiva avícola. *Iatreia*. 2016;29(4):397-406.
37. EFSA, ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSa Journal*. 2018;16(12).
38. Sakate RI. Prevalência, epidemiologia, caracterização sorológica e molecular de *Listeria monocytogenes* isoladas na criação intensiva de novilhos superprecoces e em abatedouros frigoríficos no Estado de São Paulo. Digital library USP: Universidade de São Paulo; 2005.
39. Matle I, Mbatha KR, Madoroba E. A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis. *Onderstepoort J Vet Res*. 2020;87(1):1-20.
40. Silva AC. Validação Secundária do método AOAC 13.11 para *Listeria monocytogenes* e do método AOAC 13.10 para *Listeria* spp. Auditoria ao método Pesquisa de *Listeria monocytogenes* pela ISO 11290 1: 2017 2020.
41. Tilney LG, Portnoy DA. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *Journal of cell Biology*. 1989;109(4):1597-608.
42. Shamloo E, Hosseini H, Abdi Moghadam Z, Halberg Larsen M, Haslberger A, Alebouyeh M. Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: a review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance. *Iran J Vet Res*. 2019;20(4):241-54.

43. Ferreira V, Wiedmann M, Teixeira P, Stasiewicz MJ. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *J Food Prot.* 2014;77(1):150-70.
44. ECDC. Seventh external quality assessment scheme for *Listeria monocytogenes* typing. ECDC. 2021:61.
45. EUR\_Lex. REGULAMENTO (CE) N. o 2073/2005 DA COMISSÃO de 15 de Novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios: EUR-Lex; 2005 [cited 2021 25/10]. Available from: <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj>.
46. Kasnowski MC, Mantilla SPS, Oliveira LAT, Franco RM. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária.* 2010;8(15):1-23.
47. ISO. ISO 11290-1. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria spp*- Part1: Detection method. 2 ed: ISO; 2017.
48. Desai AN, Anyoha A, Madoff LC, Lassmann B. Changing epidemiology of *Listeria monocytogenes* outbreaks, sporadic cases, and recalls globally: A review of ProMED reports from 1996 to 2018. *International Journal of Infectious Diseases.* 2019;84:48-53.