



ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA
INSTITUTO POLITÉCNICO DE CASTELO BRANCO

Listeria monocytogenes – DETERMINAÇÃO
DOS PONTOS CRÍTICOS DE CONTROLO
NUMA UNIDADE PRODUTORA DE QUEIJO
DE OVELHA DA REGIÃO DA BEIRA BAIXA

Engenharia das Ciências Agrárias – Ramo Animal

Relatório do Trabalho de Fim de Curso

Filipa Alexandra Henriques do Vale e Silva

—◆—
CASTELO BRANCO

2000

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	II
RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE DE TABELAS.....	VII
LISTA DE ANEXOS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
ÍNDICE GERAL.....	X
I - INTRODUÇÃO.....	1
II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1 – <i>Listeria monocytogenes</i>	3
1.1- APONTAMENTO HISTÓRICO	3
1.2 – CARACTERIZAÇÃO DA BACTÉRIA	4
1.2.1 – Morfologia.....	4
1.2.2 - Características Culturais	4
1.2.3 - Características Nutricionais	5
1.2.4 - Características Bioquímicas	5
1.3 - TIPAGEM	8
1.3.1 - Serotipagem.....	8
1.3.2 - Fagotipagem	9
2 - LISTERIOSE: ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS.....	10
3 - ALGUNS FACTORES QUE CONDICIONAM O CRESCIMENTO E A SOBREVIVÊNCIA DE <i>Listeria spp.</i>	12
3.1 - TEMPERATURA.....	13

3.2 – ACIDEZ E pH	13
3.3 – NaCl e a_w	14
3.4 – RESISTÊNCIA AOS AGENTES DE LIMPEZA E DESINFECÇÃO.....	15
4 - OCORRÊNCIA E COMPORTAMENTO DE <i>Listeria</i> spp. EM QUEIJOS	17
5 - PREVENÇÃO E CONTROLO DE <i>Listeria</i> spp.	20
5.1 – PREVENÇÃO NAS QUEIJARIAS	20
5.2 – CONTROLO E BREVE ABORDAGEM AO SISTEMA HACCP.....	23
5.3 – IDENTIFICAÇÃO DOS PCC'S NAS INDÚSTRIAS DE LACTICÍNIOS E ALGUMAS MEDIDAS PREVENTIVAS	26
III - MATERIAL E MÉTODOS.....	27
1 – COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	27
1.1 - QUEIJOS.....	27
1.2 - SALMOURA.....	28
1.3 - ZARAGATOAS	28
1.4 – OUTRAS AMOSTRAS	29
1.4.1 - Solução antibolor	29
1.4.2 - Cintas	30
1.4.3 - Sépalas de cardo	30
1.4.4 - Infusão de cardo.....	30
1.4.5- Ar da câmara de cura	31
1.4.6 - Sal	31
2 - MEIOS DE CULTURA, REAGENTE E CULTURAS MICROBIOLÓGICAS ..	32
2.1 – CALDOS DE ENRIQUECIMENTO.....	32
2.1.1 - <i>Modified Fraser Broth (MFB)</i>	32
2.1.2 - <i>Buffered Listeria Enrichment Broth (BLEB)</i>	33
2.2 – MEIOS DE ISOLAMENTO SELECTIVOS.....	33
2.2.1 - Gelose de Oxford	33
2.2.2 - Palcam.....	34
2.3 – MEIO COM TRIPTONA DE SOJA, EXTRACTO DE LEVEDURA E AGAR (TSYEA)	34
2.4 - GELOSE DE SANGUE	35
2.5 - MEIO PARA O TESTE CAMP	35
2.6 - SISTEMA DE IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICO MINIATURIZADO	36

2.7 - RAPID' <i>L. mono</i>	36
2.8 - CULTURAS MICROBIOLÓGICAS	36
3 - MÉTODOS UTILIZADOS NA PESQUISA, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Listeria</i> spp.....	37
3.1 - ENRIQUECIMENTO.....	39
3.1.1 - Queijo, Salmoura, Cardo, Sal, Solução antibolor	39
3.1.2 - Zaragatoas e Cintas.....	39
3.2 - ISOLAMENTO	39
3.3 - IDENTIFICAÇÃO.....	40
3.3.1 - Iluminação de Henry.....	40
3.3.2 - Pesquisa da Catalase.....	41
3.3.3 - Coloração de Gram	41
3.3.4 - Reação de hemólise	42
3.3.5 - Teste de CAMP.....	42
3.3.6 - Sistema de identificação bioquímico miniaturizado.....	43
3.3.7 - RAPID' <i>L. mono</i>	44
4 - CONFIRMAÇÃO DEFINITIVA E FAGOTIPAGEM	45
5 - ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	45
5.1 - DETERMINAÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO (SAL) NA SALMOURA.....	45
5.2 - DETERMINAÇÃO DO CLORETO DE SÓDIO (SAL) NO QUEIJO	46
5.3 - DETERMINAÇÃO DO PH NA SALMOURA	46
IV – APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	47
1-INCIDÊNCIA DE <i>Listeria monocytogenes</i> E OUTRAS <i>Listeria</i> spp NAS DIFERENTES AMOSTRAS ANALISADAS.....	47
1.1 - QUEIJOS.....	47
1.2- SALMOURA.....	51
1.3 - ZARAGATOAS	53
1.4 – OUTRAS AMOSTRAS	57
2 - COMPARAÇÃO ENTRE OS MEIOS DE ISOLAMENTO.....	59
3 - COMPARAÇÃO ENTRE OS PERIODOS DE ENRIQUECIMENTO	61
V - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
VI - BIBLIOGRAFIA.....	66

RESUMO

Este trabalho visa contribuir para o conhecimento dos pontos críticos de controlo (PCC) numa unidade produtora de queijo de ovelha da Região da Beira Baixa. Foram recolhidas 10 amostras de queijo, 10 amostras de salmoura, 50 zaragatoas e 14 amostras variadas (cardo, sal, solução antibolor, cintas, ar das câmaras de cura).

In the present work, and after a brief description of the main characteristics of the género *Listeria*, is made a revision of the important aspects of the listeriose, such as its patogenia and clinical forms. O actual protagonismo da *L. monocytogenes* é evidenciado fazendo-se referência às principais epidemias de listeriose bem como a estudos realizados sobre a contaminação dos queijos pela bactéria.

A análise dos resultados permite-nos concluir que, em relação aos queijos, 80% mostrou estar contaminado com *L. innocua*. Nos queijos em que foi efectuada uma análise separadamente a 25g de casca e a 25g de massa, verificou-se que a contaminação apenas estava localizada no exterior.

Quanto à salmoura, 90% das amostras evidenciaram a presença de *L. innocua*, estando uma das amostras igualmente contaminada com *L. monocytogenes*.

Em relação às zaragatoas, 34% mostraram estar contaminadas com *L. innocua*. A *L. rnonocvtogenes* foi isolada numa amostra e em simultâneo com a *L. innocua*.

Em 30% das outras amostras, o resultado da pesquisa de *Listeria* foi positivo, tendo sido a *L. innocua* a espécie isolada em todos os casos. A *L. monocytogenes* foi isolada apenas uma vez, simultaneamente com a *L. innocua*.

Em relação ao prolongamento dos períodos de enriquecimento, e considerando a totalidade das amostras, verificou-se que o prolongamento de 24h para 3 dias não se revelou positivo no aumento de detecção de *Listeria*. O aumento de dois para sete dias traduziu-se num aumento de 7,5% na detecção de *Listeria*.

Relativamente ao meio de isolamento, e considerando a totalidade das amostras, conclui-se que o meio Oxford foi aquele que permitiu uma taxa de isolamento superior quando comparada com o Palcam.