



**ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA**  
**INSTITUTO POLITÉCNICO DE CASTELO BRANCO**

**ISOLAMENTO DE *Listeria monocytogenes***  
**A PARTIR DE DIFERENTES AMOSTRAS DE**  
**SILAGEM - COMPARAÇÃO DE MÉTODOS**

**E Engenharia de Produção Animal**

Relatório do Trabalho de Fim de Curso

*Ana Emília Gonçalves Soares*

---

**CASTELO BRANCO**

1999

# *Índice*

	<b>Páginas</b>
<b>Agradecimentos</b>	I
<b>Resumo</b>	II
<b>Abstract</b>	III
<b>Abreviaturas</b>	IV
<b>Índice de figuras</b>	V
<b>Índice de tabelas</b>	VI
<b>I - Introdução</b>	1
<b>II - Revisão Bibliográfica</b>	3
<b>1- Silagem</b>	4
1.1 - Introdução	4
1.2 - Sazonalidade da produção das plantas forrageiras	5
1.3 - Transformações bioquímicas e microbiológicas durante a fermentação	5
1.3.1 - Respiração	5
1.3.2 - Microbiologia do ensilado	6
1.3.3 - Trocas bioquímicas	8
1.3.3.1 - Carbohidratos	8
1.3.3.2 - Proteínas	9
1.3.3.3 - Ácidos orgânicos e capacidade tampão	10
1.3.3.4 - Pigmentos	11
1.4 - Factores que contribuem para uma silagem de boa qualidade	11
1.4.1 - Corte da planta no estágio vegetativo ideal	11
1.4.2 - Picagem ou laceração do material a ser ensilado	12
1.4.3 - Enchimento do silo	12
1.4.4 - Expulsão do ar durante o carregamento do silo	12

1.4.5 - Isolamento da massa ensilada	12
1.5 - Características de uma boa silagem	13
1.6 - Uso de aditivos	13
<b>2 - <i>Listeria monocytogenes</i> e outras <i>Listeria</i> sp.</b>	15
2.1 - Apontamento histórico	15
2.2 - Caracterização	15
2.2.1 - Morfologia	15
2.2.2 - Características culturais	16
2.2.3 - Características nutricionais	16
2.2.4 - Características bioquímicas	16
2.3 - Taxonomia	17
2.4 - Tipagem	18
2.4.1 - Serotipagem	18
2.4.1 - Fagotipagem	19
2.5 - Patogenicidade	19
2.6 - Listeriose em Humanos	20
2.6.1 - Incidência	20
2.6.2 - Susceptibilidade e resistência à infecção	21
2.6.3 - Sintomatologia	21
2.7 - Listeriose nos Animais	22
2.8 - Principais mecanismos de transmissão	23
<b>III - Material e Métodos</b>	25
<b>1 - Métodos de amostragem</b>	26
<b>2 - Meios de cultura, reagentes e culturas microbiológicas</b>	28
2.1 - Caldos de enriquecimento	28
2.1.1 - <i>Listeria Enrichment Broth</i>	28
2.1.2 - <i>Modified Fraser Broth</i>	28
2.1.3 - <i>Buffered Listeria Enrichment Broth</i>	29
2.2 - Meios de isolamento	30
2.2.1 - Gelose de Oxford	30
2.2.2 - Palcam	30

2.3 - Agar de triptona de soja com extracto de levedura	31
2.4 - Reagente da catalase	31
2.5 - Gelose de sangue	32
2.6 - Meio para o teste de CAMP	32
2.7 - Culturas microbiológicas	33
2.8 - Sistema de identificação	33
2.9 - Solução de Ringer	33
<b>3 - Métodos utilizados na pesquisa, isolamento e identificação de</b>	
<i>Listeria</i> sp.	34
3.1 - Preparação das amostras	35
3.2 - Enriquecimento	35
3.3 - Sementeira directa	36
3.4 - Isolamento	36
3.5 - Confirmação da suspeita de <i>Listeria</i> sp. e identificação	
da espécie	37
3.5.1 - Iluminação de Henry	37
3.5.2 - Caracterização bioquímica e morfológica	37
3.5.2.1 - Pesquisa da catalase	38
3.5.2.2 - Coloração de Gram	38
3.5.2.3 - Reacção de Hemólise	39
3.5.2.4 - Teste de CAMP	40
3.5.2.5 - Sistema de identificação bioquímica	
miniaturizado	40
3.6 - Confirmação definitiva e tipagem	41
<b>4 - Análises físico - químicas</b>	42
4.1 - Determinação da actividade da água ( $a_w$ )	42
4.2 - Determinação do pH	42
<b>IV - Resultados e Discussão</b>	43
<b>1 - Resultados globais</b>	44
<b>2 - Presença de <i>Listeria</i> sp. nas amostras analisadas</b>	44
<b>3 - Confirmação da identificação e tipagem dos isolamentos</b>	46

<b>4 - Comparação entre a sementeira directa e a sementeira com enriquecimento</b>	47
<b>5 - Comparação entre os caldos de enriquecimento</b>	48
<b>6 - Prolongamento do período de enriquecimento</b>	48
<b>7 - Comparação entre os meios de isolamento</b>	49
<b>8 - Comparação entre os diferentes volumes de inóculo para espalhamento</b>	50
<b>9 - Actividade da água ( <math>a_w</math> ) e pH</b>	51
V - Conclusões	52
VI - Bibliografia	54
Anexo I - Protocolo do API - <i>Listeria</i>	
Anexo II - Registo de dados	

## Resumo

Este trabalho teve como principal objectivo contribuir para a selecção de um método mais eficaz e rápido de isolamento de *L. monocitogenes* e outras *Listeria* sp. em amostras de silagem.

Para tal, foi comparado: a inoculação directa pela técnica de espalhamento *vs.* inoculação após enriquecimento pela técnica de espalhamento, dois caldos de enriquecimento, dois períodos de enriquecimento, dois meios de isolamento e, finalmente, dois volumes de inóculo.

A pesquisa decorreu entre Fevereiro e Julho.

Verificou-se que a silagem de milho da Escola Superior Agrária de Castelo Branco e a silagem de milho da Quinta das Ínsuas apresentavam *L. innocua* serovar 6b. A fagotipagem das 12 estirpes enviadas ao *Institut Pasteur de Paris* permitiu a identificação de 4 lisovares diferentes. No entanto, 4 das estirpes foram não tipáveis (cerca de 42%).

Aconselha-se como método de análise o uso dos dois caldos de enriquecimento MFB + BLEB, com um enriquecimento de 7 dias. Como meio de isolamento, o mais adequado foi o Oxford e o volume de inóculo para espalhamento poderá ser variável, consoante o nível de contaminação da amostra.