



## **AVALIAÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM ALIMENTOS E NO AMBIENTE DE COMERCIALIZAÇÃO DE PRODUTOS PRONTOS PARA CONSUMO EM PIRASSUNUNGA, SP**

Sarah Hwa in Lee, Isabella Rodrigues Motté, Maria Eugênia de Andrade Schiavoni,  
Carlos Humberto Corassin, Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de  
Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP

### **RESUMO**

A manutenção da qualidade higiênico-sanitária dos alimentos prontos para consumo é de grande importância para a saúde pública, com a finalidade principal de evitar a bactérias patogênicas nos ambientes de manipulação desses alimentos, tais como *Staphylococcus* coagulase positivos (CP) e *Listeria monocytogenes*. Neste trabalho, investigou-se a ocorrência destas bactérias em 112 amostras de alimentos incluindo salgados fritos, produtos cárneos, queijos, entre outros alimentos prontos para consumo, e de superfícies no ambiente de quatro estabelecimentos varejistas de Pirassununga, SP. Não foram encontradas amostras positivas para *L. monocytogenes*. Porém, *Staphylococcus* CP foram confirmados em 21 amostras (18,7%), das quais 5 de alimentos e 16 coletadas no ambiente, principalmente de mãos de manipuladores. Os resultados indicam possíveis falhas na aplicação de ferramentas de qualidade, principalmente de Boas Práticas de Fabricação, nos estabelecimentos avaliados.

**Palavras chave:** *L. monocytogenes*; *S. aureus*; produtos cárneos; salgados fritos.



## 1. INTRODUÇÃO

Alimentos e ambientes de manipulação e produção de alimentos em condições inadequadas de higiene podem ser facilmente contaminados por microrganismos patogênicos, tais como *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (Oliveira *et al.*, 2017). Estes microrganismos são responsáveis por toxi-infecções transmitidas por alimentos, principalmente prontos para a comercialização e consumo (Rodrigues *et al.*, 2017). *S. aureus* é uma bactéria esférica não esporulada, sem motilidade, Gram-positiva que pode ocorrer em pares, pequenas correntes e principalmente no formato de cacho de uva. Trata-se de uma bactéria anaeróbia facultativa e catalase positiva (Lee *et al.*, 2016) pertencente à microbiota comensal dos seres humanos e de várias espécies de animais, sendo encontrada no ar, poeira, esgoto, água e superfícies ambientais.

A ocorrência de *S. aureus* em qualquer tipo de alimento representa grande perigo para a Saúde Pública, uma vez que pode haver produção de enterotoxinas, capazes de desencadear um processo de intoxicação caso ingeridas em poucas horas. A intoxicação estafilocócica é caracterizada por sintomas como náusea, vômito, dores abdominais e diarreia, os quais aparecem entre 30 minutos a 8 horas após a ingestão de alimento contaminado, com duração de 24 a 48 h e completa recuperação entre 1 a 3 dias, sendo difícil estimar a incidência de intoxicação por *S. aureus* devido ao fato de a maioria dos casos não serem relatados (Gonzalez *et al.*, 2017).

*S. aureus* é frequentemente isolado de alimentos como queijos, leites cru, alimentos cárneos e outros produtos fritos prontos para o consumo, além das mãos e mucosa nasal de manipuladores de alimentos (Fagundes *et al.*, 2010). Além disso, alguns estudos têm demonstrado a presença de enterotoxinas produzidas por *S. aureus* ou de genes relacionados com suas enterotoxinas em alimentos (Nunes *et al.*, 2017), em manipuladores ou superfícies de alimentos (Lee *et al.*, 2016), o que ressalta a importância das Boas Práticas de Fabricação (BPF) para evitar contaminações a partir do contato dos alimentos com superfícies inertes ou com as mãos de manipuladores de alimentos.



*L. monocytogenes* também é um microrganismo de elevada preocupação em saúde, visto que é considerada uma bactéria patogênica potencialmente letal para o homem e outros animais (Barancelli *et al.*, 2014). Essa bactéria é um bastonete Gram-positivo pequeno, com extremidades arredondadas, anaeróbio facultativo, móvel, não esporulado, com 0,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 1 a 2  $\mu\text{m}$  de comprimento, em média. Suas células podem ser vistas isoladas ou em cadeias pequenas em forma de Y ou V (Oliveira *et al.*, 2017). A listeriose, doença causada por *L. monocytogenes*, é considerada uma doença humana grave que acomete principalmente gestantes, recém-nascidos, idosos e pacientes imunocomprometidos (Barancelli *et al.*, 2014). A maioria dos casos de listeriose leva à hospitalização, resultando em cerca de 20 a 30% de letalidade. As principais síndromes clínicas incluem infecções sistêmicas (com comprometimento do sistema nervoso central), infecções perinatais e aborto, além de casos de gastroenterite febril (Oliveira *et al.*, 2019).

*L. monocytogenes* pode ser encontrada em inúmeros ambientes, incluindo solo, água, esgoto, vegetação, fezes de animais selvagens, bem como em fazendas e em instalações de processamento de alimentos (Campagnollo *et al.*, 2018). Essa diversidade de ambientes está associada à capacidade da bactéria em multiplicar-se em uma ampla faixa de temperatura (0 a 45 °C), sobreviver ao congelamento e ao armazenamento por longos períodos (Oliveira *et al.*, 2017).

O objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência de *S. aureus* e *L. monocytogenes* em salgados fritos, queijos, presuntos, mortadelas, salames e outros frios para consumo imediato e, a partir disso, determinar os pontos de contaminação no ambiente de comercialização desses produtos em estabelecimentos varejistas localizados na cidade de Pirassununga, São Paulo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Área de Estudo e Amostragem

A coleta de amostras foi realizada em 4 estabelecimentos que comercializam salgados fritos, queijos, presuntos, mortadelas, salames e outros frios para consumo



imediatos, localizados na região de Pirassununga, Estado de São Paulo, no período de novembro de 2018 a fevereiro de 2019. Em cada estabelecimento, foram realizadas duas visitas com intervalo de 1-2 semana para coleta das amostras das superfícies dos ambientes e de alimentos (mínimo: 100 g). Foram colhidos diversos tipos de produtos prontos para consumo, tais como queijos, presunto, mortadelas, apresuntados, bacons e salames fatiados, além de salgados fritos para consumo imediato que estavam disponíveis para venda direta ao consumidor no momento das visitas. Foram colhidas em média 27 amostras por estabelecimento, sendo cerca de 8 a 10 amostras de alimentos, evitando-se repetição de tipos e marcas de produtos.

As amostras ambientais foram colhidas através de suabes ou esponjas desidratadas estéreis dos seguintes pontos: pisos (área de atendimento, preparo e/ou armazenamento de produtos), ralos (área de atendimento, cozinha e banheiros), mãos e pés dos manipuladores, equipamentos e utensílios, como fatiadores, facas, modeladores, geladeiras, mesas e embaladeiras. As coletas dos pisos, ralos, balcões de exposições e de parte dos alimentos foram feitas com as esponjas desidratadas estéreis. Para os pisos e balcões fez-se a coleta com a esponja em uma área delimitada por moldes de papel esterilizado de 0,25 m<sup>2</sup>. Os ralos e os alimentos foram amostrados sem área delimitada pela dificuldade de operação, portanto coletou-se toda a superfície possível. As amostras de utensílios, de modo geral, e das mãos e pés dos funcionários foram coletadas com suabes umedecidos em água peptonada salina a 0,1%, contidos em tubos estéreis. O número total de amostras colhidas no estudo foi 112. Todas as amostras foram transportadas em caixas térmicas com gelo reciclável, e enviadas ao laboratório para a execução imediata das análises.

## 2.2 Isolamento e Identificação de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*

Os procedimentos para isolamento e identificação de *S. aureus* nas amostras de alimentos e ambientais foram realizados conforme descrito por Lancette & Bennett (2001). Resumidamente, após preparar diluições seriadas dos alimentos (25 g / 225 mL de água peptonada salina a 0,1 %, homogeneizados em Stomacher Tecnal®) e ambientais (suabes e esponjas), foram semeados 100 µL das diluições em placas de Petri contendo ágar Braid Packer (BP). A alíquota sobre o agar BP foi espalhada com



auxílio de alça de Drigalski, após o que as placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 48 horas. Após o período de incubação, contaram-se as colônias típicas de *S. aureus* (circulares pretas ou cinzas escuras, com bordas perfeitas e rodeadas por um halo transparente). Em seguida, 3-5 colônias típicas de cada placa foram transferidas para tubos contendo caldo Infusão Cérebro Coração (ICC), os quais foram incubados a 37 °C por 24 horas. Após esse período, as colônias foram submetidas à coloração de Gram e ao teste de coagulase, para confirmação de *Staphylococcus* coagulase positivos (CP).

*L. monocytogenes* foi pesquisada nas amostras de alimentos e ambientais seguindo estritamente os procedimentos preconizados no *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) (Hitchins, 2003). Deste modo, alíquotas de 100 µL das diluições iniciais dos alimentos e da solução de coleta dos suabes e esponjas foram transferidas para o caldo Fraser seletivo para *L. monocytogenes*, incubando-se a 37 °C por 24 horas. Após esse período, os caldos que apresentaram escurecimento foram separados para estriamento com alça microbiológica na superfície do meio OXFORD, seguido de incubação a 37 °C por 24 horas. As colônias presuntivas de *L. monocytogenes* neste meio foram transferidas para outra placa contendo agar Trypticase de Soja com 0,6% de extrato de levedura, incubadas a 35°C por 48h e submetidas à coloração de Gram, teste de catalase e motilidade.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados de ocorrência de *S. aureus* coagulase positiva e *L. monocytogenes* em alimentos e superfícies no ambiente de comercialização de produtos prontos para consumo de Pirassununga, SP. Foram analisadas 112 amostras coletadas de quatro estabelecimentos de varejo, as quais foram categorizadas em grupos de alimentos prontos para consumo, superfícies com contato com alimentos e de superfícies sem contato com alimentos. Nenhuma das amostras apresentou *L. monocytogenes*. Das 33 amostras de alimentos analisadas, 5 foram positivas para *Staphylococcus* CP, sendo uma de sanduíche, duas de frios fatiados e 2 de salgados fritos. No entanto, essas 5 amostras positivas para



*Staphylococcus* CP apresentaram contagens entre  $1,0 \times 10^1$  e  $1,0 \times 10^2$  unidades formadoras de colônias (UFC)/g (dados não mostrados em tabela), ou seja, abaixo do limite tolerável de  $1,0 \times 10^3$  estabelecido pela legislação brasileira para amostras indicativas desses produtos (ANVISA, 2001).

**Tabela 1** – Ocorrência de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva (CP) e *Listeria monocytogenes* em alimentos e superfícies no ambiente de comercialização de produtos prontos para consumo de Pirassununga, SP.

Tipo de Amostra	Amostras analisadas (N)	Amostras positivas			
		<i>Staphylococcus</i> CP		<i>L. monocytogenes</i>	
		N	%	N	%
<i>Alimentos prontos para consumo:</i>					
Sanduíches	6	1	16,7	0	0
Queijos fatiados	4	0	0	0	0
Frios fatiados <sup>1</sup>	13	2	15,4	0	0
Salgados fritos <sup>2</sup>	7	2	28,6	0	0
Carnes curadas <sup>3</sup>	3	0	0	0	0
<i>Superfícies com contato com alimentos:</i>					
Mãos de manipuladores	19	10	52,6	0	0
Utensílios <sup>4</sup>	7	0	0	0	0
Equipamentos <sup>5</sup>	9	1	11,1	0	0
Mesas e pias	11	2	18,2	0	0
<i>Superfícies sem contato com alimentos:</i>					
Calçados (manipuladores)	19	3	15,8	0	0
Chão	9	0	0	0	0
Ralo	5	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>112</b>	<b>21</b>	<b>18,7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

<sup>1</sup> Frios fatiados: presuntos, apresetados, salames e mortadelas.

<sup>2</sup> Salgados fritos: coxinhas, quibes, espeto de frango, risoles com recheio de carne ou queijo.

<sup>3</sup> Carnes curadas: bacon, linguiças.

<sup>4</sup> Utensílios: tábuas de carne, mesas e pias.

<sup>5</sup> Equipamentos: fatiadores, modeladoras, batedeiras e refrigeradores.

Com relação à avaliação das superfícies com contato com alimentos, das dezenove amostras das mãos dos manipuladores, 10 (52,6%) foram positivas para *Staphylococcus* CP, enquanto somente uma amostra de equipamento e 2 de mesas



foram positivas para este microrganismo. Quanto às 33 amostras de superfícies sem contato com os alimentos, somente três coletadas de calçados dos manipuladores foram positivas para *Staphylococcus* CP.

No presente estudo, todas as análises realizadas nos queijos fatiados foram negativas para *Staphylococcus* CP. No entanto, 2 amostras de frios fatiados (15,4%) foram positivas para *S. aureus* CP, diferenciando-se dos dados reportados por Neto (2018), o qual não encontrou nenhuma amostra de presunto fatiado positiva para esta bactéria em supermercados no interior de São Paulo. Tonello & Ecket (2016) também não observaram *S. aureus* CP em amostras de presuntos cozidos em estabelecimentos na cidade de Cascavel-PR. Sabe-se que o fracionamento de frios como o presunto aumenta a superfície de exposição do produto, deixando-o mais suscetível à contaminação por agentes patogênicos. Este fato, aliado à contaminação por contato com superfícies insuficientemente higienizadas, foram possivelmente as principais causas da ocorrência de *S. aureus* CP nos frios fatiados no presente estudo, uma vez que 13 amostras (28,3%) das superfícies com contato com alimentos (equipamentos, utensílios, mãos de manipuladores, mesas e pias) foram positivas para *S. aureus* CP.

No presente estudo, *L. monocytogenes* não foi detectada em nenhuma amostra de alimento ou superfície, indicando que os estabelecimentos avaliados adotam práticas adequadas de higienização do ambiente para este patógeno. O leite e derivados, principalmente os queijos frescos, constituem os principais alimentos envolvidos em surtos de listeriose (Campagnollo *et al.*, 2018). Adicionalmente, os resultados do nosso estudo não corroboram os dados de ocorrência de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo reportados no Brasil. Fai *et. al.* (2011) analisaram 40 amostras de presunto suíno cozido de 26 supermercados de Fortaleza/CE, observando a ocorrência de *L. monocytogenes* em 57,7% das amostras devido a falhas nas BPF. Em Porto Alegre/RS, Tallamini (2016) encontraram *L. monocytogenes* em 100% das amostras de presunto cozido fatiado comercializado no Mercado Público do município.

Com relação à análise de *S. aureus* CP nas superfícies com contato com alimentos, os resultados do presente trabalho indicam falhas nas BPF (Brasil, 2002), uma vez que este microrganismo foi detectado em várias amostras das mãos dos



manipuladores. A contaminação de alguns calçados dos manipuladores por *S. aureus* CP indica que os mesmos foram usados além do local de trabalho, sendo ideal nesses casos, para evitar contaminação do ambiente, dos funcionários e alimentos que a empresa forneça vestuário e calçado próprio para uso no estabelecimento, conforme estabelecido pela ANVISA para evitar contaminações cruzadas. Possivelmente devido a essas falhas, alguns alimentos como sanduíches, frios fatiados e salgados fritos apresentaram contaminação por *S. aureus* CP. Considerando que essa bactéria é pertencente à microbiota comensal dos seres humanos (Oliveira *et al.*, 2017), os dados obtidos reforçam a necessidade de realizar a antissepsia das mãos antes entrar na área de processamento ou reiniciar o trabalho, bem como após manipular materiais contaminados.

#### **4. CONCLUSÕES**

Os resultados do presente trabalho indicam deficiências nos procedimentos de higienização dos serviços de alimentação avaliados, indicando possíveis riscos à saúde dos consumidores. Embora *L. monocytogenes* não tenha sido detectada em nenhuma amostra, a presença de *S. aureus* CP em alimentos e amostras ambientais, principalmente na superfície das mãos de manipuladores, reforçam a necessidade de implementação de ferramentas de qualidade nos estabelecimentos avaliados, sobretudo referentes às BPF.

#### **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ANVISA. (2001). Resolução – RDC no 12, de 2 de janeiro de 2001. Disponível em [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_12\\_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b). Acesso em 06/12/2019.



Barancelli, G.V., Camargo, T.M, Gagliardi, N.G., Porto, E., Souza, R.A., Campioni, F., Falcão, J.P, Hofer, E., Cruz, A.G., & Oliveira, C.A.F. (2014). Pulsed-Field Gel Electrophoresis characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from cheese manufacturing plants in São Paulo, Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 173: 21-29.

Brasil (2002). Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)

Campagnollo, F.B., Gonzales-Barron, U., Cadavez, V. A.P., Sant'Ana, A.S., Schaffner, D.W. (2018). Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in traditional Minas cheeses: The cases of artisanal semi-hard and fresh soft cheeses. *Food Control*, 92: 370-379.

Fagundes, H., Barchesi, L., Nader Filho, A., Ferreira, L.M., & Oliveira, C.A.F. (2010). Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in São Paulo state, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 376-380.

Fai, A.E.C., Figueiredo, E.A.T., Verdin, S.E.F., Pinheiro, N.M.S., & Braga, A.R.C. (2011). *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza/CE: fator de risco para a saúde pública. *Ciência & Saúde Coletiva*, 16(2): 657-662.

Gonzalez, A.G.M., Marques, L.M.P., Gomes, M.D.S.A., Beltrão, J.C.D.C., Pinheiro, M.G., Esper, L.M.R., Paula, G.R., Teixeira, L.A. & Aguiar-Alves, F. (2017). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Minas Frescal cheese: evaluation of classic enterotoxin genes, antimicrobial resistance and clonal diversity. *FEMS Microbiology Letters*, 364: fnx232.



Hitchins, A.D. (2003). Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. In: US Food and Drug Administration (FDA), *Bacteriological Analytical Manual Online*. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>.

Lancette, G.A. & Bennett, R.W. (2001). *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: DOWNES F. P; ITO, K. (Eds). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (pp. 387-403). Washington: Apha.

Lee, S.H.I., Cappato, L.P., Corassin C.H, Cruz, A.G. & Oliveira, C.A.F. (2016) Effect of peracetic acid on biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* isolated from dairy plants. *Journal of Dairy Science*, 99: 2384-2390.

Neto, E. S. (2018). *Avaliação da qualidade do presunto e muçarela fatiados e perfil dos manipuladores nos supermercados do interior de São Paulo*. Dissertação (Mestrado)- Curso Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista de Jaboticabal. 68 f.

Nunes, M.M. & Caldas, E.D. (2017). Preliminary quantitative microbial risk assessment for *Staphylococcus* enterotoxins in fresh Minas cheese, a popular food in Brazil. *Food Control*, 73: 524–531.

Oliveira, C.A.F., Corassin C.H., Lee, S.H.I., Gonçalves, B.L. & Barancelli, G.V. (2017). Pathogenic bacteria in cheese, their implications for human health and prevention strategies. In: *Nutrients in Dairy and Their Implications on Health and Disease*. San Diego, CA: Academic Press, pp 61-75.

Oliveira, N.A., Bittencourt, G.M., Barancelli, G.V., Kamimura, E.S., Lee, S.H.I. & Oliveira, C.A.F. (2019). *Listeria monocytogenes* in Brazilian foods: occurrence, risks to human health and their prevention. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 7: 320-330.



Rodrigues, M.X., Silva, N.C.C., Trevilin, J.H., Cruzado, M.M.B., Mui, T.S., Duarte, F.R.S., Castillo, C.J.C., Canniatti-Brazaca, S.G. & Porto, E. (2017). Molecular characterization and antibiotic resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from cheese processing plants. *Journal of Dairy Science*, 100: 5167–5175.

Tallamini, S.C. (2016). *Avaliação de bactérias psicotróficas presentes em presunto cozido e a influência de fatores ambientais na manutenção da qualidade microbiológica e inocuidade do alimento*. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 137 f.

Tonello, C., & Ecket, R.G. (2016). Contaminação Microbiológica de presuntos comercializados em estabelecimentos comerciais com e sem certificação no Programa de Alimento Seguro. *Higiene Alimentar*, 30: 77-81.