

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE TRÊS ÁGARES SELETIVOS NO ISOLAMENTO DE *Listeria monocytogenes*¹

Denize Aparecida RODRIGUES², Bernadette Dora Gombossi de Melo FRANCO²,

Mariza LANDGRAF², Maria Teresa DESTRO^{2,*}

RESUMO

A variedade de protocolos existentes para a pesquisa de *Listeria* sp em alimentos e outras amostras é muito grande, o que dificulta a escolha daquele que possa apresentar melhores resultados. Os protocolos recomendados nas metodologias tradicionais indicam vários caldos de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo, assim como meios de isolamento seletivo. O presente estudo teve por finalidade comparar a eficiência dos ágar cloreto de lítio-feniletanol-moxalactam (LPM), PALCAM (PAL) e do ágar hemolítico ceftazidimacloreto de lítio (HCLA) no isolamento de *L. monocytogenes* a partir de diferentes tipos de amostras colhidas em uma linha de processamento de “nuggets” congelados de frango. Um total de 413 amostras foi examinado. As amostras foram primeiramente enriquecidas em caldo Half Fraser, seguido do enriquecimento em caldo BLEB. Aliquotas deste enriquecimento foram semeadas por esgotamento em placas contendo os meios LPM, PAL e HCLA. Colônias típicas foram selecionadas e submetidas à identificação bioquímica. O meio HCLA permitiu o isolamento de *L. monocytogenes* em 60,1% do total de amostras examinadas, enquanto PAL e LPM permitiram o isolamento em aproximadamente 47,9% das amostras. O desempenho do HCLA foi estatisticamente diferente dos demais meios ($p < 0,05\%$) para todos os tipos de amostras, exceto para as de manipuladores onde os 3 meios apresentaram desempenho semelhante. Os resultados obtidos com o HCLA foram superiores aos dos demais meios e seu uso, simultaneamente com o PAL, mostrou-se de grande utilidade.

Palavras-chave: *L. monocytogenes*; isolamento; HCLA; PALCAM; LPM.

SUMMARY

EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF THREE SELECTIVE AGARS FOR *L. monocytogenes* ISOLATION. There is a variety of protocols for *Listeria* spp detection in foods and other sources. Therefore, the decision on which method to be used becomes very difficult. Conventional isolation methodologies indicate different pre-enrichment and enrichment broths as well as different isolation media. The comparison between the efficiency of PALCAM (PAL), lithium chloride-phenylethanol-moxalactam (LPM) and haemolytic ceftazidime-lithium chloride (HCLA) agars was carried out. A total of 413 samples from different sources, collected from a chicken nuggets processing plant, was pre-enriched in Half Fraser broth followed by enrichment in BLEB. They were streaked onto LPM, PAL and HCLA plates and typical colonies were submitted to biochemical identification. *L. monocytogenes* (Lm) was isolated from 60.1% of the samples when HCLA was used and from approximately 47.9% when PAL and LPM were considered. The difference between the efficiency of HCLA and the other two media was statistically significant ($p < 0.05$) for all samples but food handlers. For food handler samples all three media showed the same efficiency. The combined use of HCLA and PAL allowed the identification of the highest number of Lm positive samples indicating that these media can be a good choice.

Keywords: *L. monocytogenes*; isolation; HCLA; PALCAM; LPM.

1 - INTRODUÇÃO

A fim de atender a Legislação Brasileira e as exigências dos países importadores, os diversos segmentos da indústria alimentícia brasileira têm dado maior atenção à pesquisa de *Listeria*, tanto em seus produtos quanto no ambiente de produção.

A variedade de protocolos existentes para a pesquisa de *Listeria* e/ou *L. monocytogenes* em alimentos, ou em outras amostras de interesse para a indústria de alimentos, é muito grande tornando difícil a escolha daquele que possa apresentar melhores resultados.

A metodologia tradicional para isolamento de listérias está baseada no emprego de enriquecimento primário da amostra em meio líquido seletivo, seguido ou não de enriquecimento secundário também em meio seletivo. A seguir, alíquotas deste caldo de enriquecimento são semeadas em placas de ágar seletivos e, após in-

cubação, colônias suspeitas do microrganismo são identificadas através da avaliação de suas características.

Vários são os caldos de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivos descritos na literatura, assim como meios de isolamento seletivo [2, 9, 11, 18, 21].

Os caldos de enriquecimento descritos apresentam composição básica muito semelhante, variando apenas a concentração e combinação dos agentes seletivos. Já os meios de isolamento de *Listeria* apresentam uma gama maior de variáveis. De maneira geral, exploram a resistência de *Listeria* a vários antibióticos como por exemplo, ácido nalidíxico, polimixina B, moxalactam, cefotetan, cicloheximida, entre outros. Estes antibióticos são utilizados em conjunto com outros agentes seletivos tais como feniletanol, cloreto de lítio, acriflavina, anidrido glicínico e telurito de potássio.

Alguns meios possuem corantes que atuam como indicadores da utilização de carboidratos, como é o caso do ágar PALCAM [24], ou sistemas indicadores empregando esculina e íons ferrosos como no caso do próprio ágar PALCAM e do ágar Oxford [6]. Já com outros meios, como o ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam [13] que não contém agentes diferenciais em sua formulação, há necessidade de se utilizar a iluminação oblíqua

¹ Recebido para publicação em 28/03/2002. Aceito para publicação em 28/05/2003 (000825).

² Universidade de São Paulo – Depto. de Alimentos e Nutrição Experimental. Av. Prof. Lineu Prestes 580, Bl 14, CEP 05508-900, SP. E-mail: mtdestro@usp.br

* A quem a correspondência deve ser enviada.

transmitida (técnica de Henry) para que colônias suspeitas de *Listeria* possam ser identificadas.

A adição de sangue de diversas espécies animais aos meios de isolamento também tem sido proposta por diversos pesquisadores. A função do sangue seria não só tornar o meio mais rico, e assim auxiliar na recuperação do microrganismo, como também permitir a diferenciação entre cepas hemolíticas e não hemolíticas do gênero *Listeria*. Dentre estes meios, pode-se destacar os descritos por BLANCO et al. [4], por FORRET, DOREY [10] e o ágar hemolítico ceftazidima cloreto de lítio (HCLA) descrito por POYSKY et al. [21].

Recentemente, meios cromogênicos têm sido desenvolvidos e comercializados. Segundo os fabricantes alguns destes meios permitiriam a diferenciação entre *Listeria monocytogenes* e as outras espécies do gênero.

Dentre os meios seletivos mais empregados nos diversos países estão o ágar Oxford, o ágar Oxford modificado, ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LPM) [17] e o ágar PALCAM.

Uma vez que são escassos em nosso meio estudos avaliando a eficiência de meios de cultura no isolamento de patógenos em amostras naturalmente contaminadas, este estudo teve por objetivo comparar a eficiência dos ágar PALCAM (PAL), cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LPM) e do ágar hemolítico ceftazidima cloreto de lítio (HCLA) no isolamento de *Listeria monocytogenes*, a partir de diferentes tipos de amostras colhidas em uma linha de processamento de “nuggets” congelados de frango.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Material

Um total de 413 amostras de diferentes tipos (ambiente, equipamentos, manipulador e produto) coletadas em uma linha de processamento de “nuggets” congelados de frango foi examinado para a presença de *L. monocytogenes*.

Amostras ambientais e de equipamentos foram colhidas com auxílio de zaragatoas estéreis que foram recolhidas em 25mL de caldo Lethen (Difco). As amostras de mãos de manipuladores foram obtidas através da técnica de enxágüe de uma das mãos, conforme descrito por DESTRO et al. [7]. As amostras do alimento foram colhidas segundo recomendado por PAGOTTO et al. [19].

2.2 – Métodos

Porções de 25g de alimento foram homogeneizadas, por 1 min., com 225mL de caldo Half-Fraser (HF - caldo Fraser adicionado de suplemento SR 166M, ambos Oxoid) e foram incubadas a 30°C por 22h. Aliquotas de 0,1mL foram transferidas para tubos contendo 9,9 mL de caldo tamponado para enriquecimento de *Listeria* (BLEB adicionado do suplemento SR141E, ambos Oxoid) e os tubos incubados por 22h a 30°C. Para as amostras de ambiente e equipamentos, a totalidade do conteúdo de

cada tubo contendo as zaragatoas foi transferida para frascos contendo 225mL de Caldo HF. Após homogeneização manual procedeu-se como descrito para as amostras de alimento. Dos 100mL da solução de enxágüe das mãos dos manipuladores, 25mL foram transferidos para 225mL de HF e processados conforme descrito para as demais amostras.

Aliquotas de caldo BLEB foram semeadas por esgotamento em placas com ágar PAL (Oxoid), ágar LPM (Difco) e ágar HCLA preparado de acordo com POYSKY et al. [21]. As placas foram incubadas a 30°C por 24 – 48h. De cada placa de PAL e de LPM foram selecionadas três colônias típicas suspeitas de *Listeria* e da placa de HCLA foram selecionadas 2 colônias típicas (com halo de hemólise) e 1 colônia atípica que foram purificadas em ágar soja tripticase adicionado de 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE, ambos Oxoid).

A seguir, as cepas foram submetidas à caracterização bioquímica empregando-se as provas de produção de catalase, de β -hemólise em ágar sangue de cavalo a 4%, motilidade em ágar semi-sólido, produção de ácidos a partir de ramnose, dextrose, xilose e manitol. As cepas foram ainda submetidas ao teste API *Listeria* (bioMérieux) para identificação complementar.

2.3 – Análise estatística

Para a comparação da eficiência dos meios de cultura avaliados empregou-se o teste de χ^2 de McNemar, a nível de significância de 5% [22].

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo MOSSEL [18], 3 fatores podem influenciar o desempenho de um meio de cultura: os constituintes do alimento, a microbiota acompanhante e o efeito do processamento na viabilidade dos microrganismos pesquisados.

Para a escolha dos ágar seletivos empregados neste estudo, levou-se em consideração os agentes seletivos e os sistemas empregados na diferenciação das colônias para evitar o uso de meios com princípios semelhantes. Assim, selecionou-se o LPM que tem como agente seletivo anidrido glicínico (10g/L), cloreto de lítio (5g/L) e moxalactam (20mg/L). As colônias de *Listeria* apresentam cor verde-azulada e com aspecto de vidro moído quando examinadas sob luz obliquamente transmitida [13]. No PAL, emprega-se acriflavina (5mg/L), cloreto de lítio (15g/L), ceftazidime (20mg/L) e polimixina B (10mg/L) e tem como sistema indicador a hidrólise da esculina e a fermentação de manitol [24]. No HCLA tem-se como agentes seletivos, cloreto de lítio (7,5g/L), colistina metano sulfonato (115.000 UI/L) e ceftazidime (20mg/L) e como sistema indicador a observação da produção de β -hemólise e de colônias com coloração verde azulada quando examinadas sob iluminação oblíqua [20].

Na Figura 1 encontram-se as porcentagens de isolamento de *L. monocytogenes* para as diferentes amostras examinadas empregando-se os diferentes ágar.

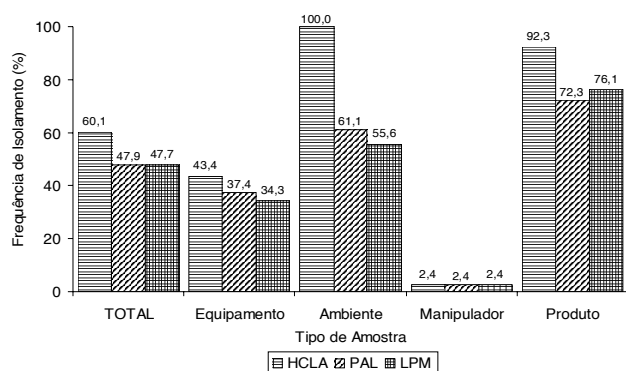


FIGURA 1 - Comparação de eficiência dos ágaros seletivos PALCAM (PAL), Cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LPM) e hemolítico ceftazidime cloreto de lítio (HCLA), no isolamento de *L. monocytogenes* a partir de diferentes tipos de amostras provenientes de uma linha de processamento de "nuggets" congelados de frango.

Pode-se observar, na *Figura 1*, que o meio HCLA permitiu o isolamento de *L. monocytogenes* em 60,1% (248/413) do total de amostras examinadas enquanto que PAL e LPM permitiram o isolamento em 47,9% (198/413) e 47,8% (197/413) das amostras respectivamente.

Quando se avalia o desempenho dos meios por tipo de amostra analisada verifica-se que o HCLA apresentou melhor desempenho que os demais meios tanto para amostras de equipamento, ambiente quanto de produto (*Figura 1*). Para manipuladores não houve diferença entre o desempenho dos três meios. A diferença entre os resultados obtidos com o meio HCLA e os meios LPM e PAL são estatisticamente significativas ($p < 0,05$), já entre os meios LPM e PAL não o são ($p > 0,05$).

Semelhança entre o comportamento de PAL e LPM foi também observado por WARBURTON et al. [28]. Porém, VAN NETTEN et al. [25] verificaram ser o ágar PAL superior ao LPM. Estes mesmos autores notaram ainda que o ágar PAL apresentava melhor seletividade que o LPM, fato este também observado no presente trabalho.

Alguns pesquisadores relataram o bom desempenho do LPM no isolamento de *Listeria monocytogenes* [5, 15], enquanto que em outros estudos verificou-se o oposto [8, 26, 29]. O mesmo ocorre com o PAL, onde resultados diferentes foram obtidos por grupos diferentes [2, 16, 20, 27].

Numa avaliação realizada sobre meios de isolamento para *Listeria monocytogenes* foi acordado pelos membros da International Standard Organization (ISO) que o meio PAL apresentava ótimo desempenho mas que o meio Oxford, que permite a seleção de *Listeria* sp, poderia ser substituído por outro meio que permitisse a diferenciação de *Listeria monocytogenes* das demais listérias [2].

Para diversas amostras (26 amostras) só foi possível isolar *L. monocytogenes* a partir do meio HCLA, sendo as mesmas negativas tanto no LPM quanto no PAL.

O HCLA apresentou seletividade semelhante ao PAL (dados não apresentados) porém, devido a adição de

sobrecamada contendo sangue de cavalo é possível separar *L. monocytogenes* de outras espécies, principalmente *L. innocua*, que normalmente ocorrem em alimentos e amostras ambientais.

A adição de sangue aos meios seletivos para isolamento de *Listeria* tem sido pesquisada já há algum tempo [3, 8, 10, 12, 23] porém, estudos com o HCLA ainda são raros. Quando descreveram o meio, em 1993, POYSKY et al. [21] compararam seu desempenho ao dos ágaros Oxford e Oxford modificado e verificaram uma maior recuperação de *L. monocytogenes* quando empregaram o HCLA.

A utilização de mais de um meio de isolamento que empregue diferentes agentes seletivos e sistemas de identificação das colônias é de fundamental importância para aumentar a chance de isolamento do organismo alvo. Este procedimento é recomendado para bactérias cuja presença em alimentos, mesmo que em uma população pequena, pode expor o consumidor à situação de risco, como o caso de *Salmonella* [1] e *L. monocytogenes*.

Isto pode ser verificado na metodologia recomendada por HITCHINS [12] que sugere o emprego simultâneo dos ágaros Oxford (OXA) e LPM ou OXA e PAL para a pesquisa de *L. monocytogenes* em alimentos. Já o Serviço de Inspeção e Segurança de Alimentos do Departamento de Agricultura dos EUA [24] sugere para o isolamento desta espécie bacteriana a partir de produtos cárneos e amostras ambientais, o emprego do agar Oxford modificado (MOX), seguido da purificação das colônias suspeitas em ágar com sobrecamada de sangue de cavalo ("horse blood overlay agar"). O emprego do HCLA concomitantemente ao MOX seria uma boa alternativa para diminuir o tempo gasto na análise quando se emprega a metodologia do USDA.

4 - CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo indicam a superioridade do ágar HCLA sobre os demais meios de isolamento seletivos empregados, indicando que este pode ser uma boa escolha para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* em alimentos, amostras ambientais ou de equipamentos, acompanhado, preferencialmente pelo PAL. A dificuldade de aquisição no mercado interno da colistina metanosulfonato, componente do HCLA, aliada ao seu preparo trabalhoso, podem interferir na popularização do seu emprego na pesquisa rotineira de *L. monocytogenes*.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANDREWS, W.H.; FLOWERS, R.S.; SILLIKER, J.; BAILEY, J.S. *Salmonella*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4 ed. APHA, Washington, 2001. p. 357-380.
- [2] ART, D.; ANDRE, P. Comparison of three selective isolation media for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. **Zentralbl. Bakteriol.**, v. 275, n. 1, p. 79-84, 1991.

- [3] BEUMER, R.R. ISO11290-1, horizontal method for the detection of *Listeria monocytogenes*: change of isolation media. **XIV International Symposium on Problems of Listeriosis**, Mannheim, Alemanha, 13-16 maio de 2001. Book of Abstracts, p. 124.
- [4] BLANCO, M.; FERNANDÉZ-GARAYZABAL, J.F.; DOMINGUEZ, L.; BRIONES, V.; VASQUEZ-BOLAND, J.A.; BLANCO, J.L.; GARCIA, J.A.; SUAREZ, G. A technique for the direct identification of haemolytic-pathogenic listeria on selective plating media. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 8, n. 4, p. 125-128, 1989.
- [5] BUCHANAN, R.L.; STAHL, H.G.; BENCIVENGO, M.M.; CORRAL, F.D. Comparison of lithium chloride phenylethanol moxalactam and modified Vogel Johnson agars for detection of *Listeria* spp in retail-level meats, poultry and seafood. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, n. 3, p. 599-603, 1989.
- [6] CURTIS, G.D.W.; MITCHELL, R.G.; KING, A.F.; GRIFFIN, E.J. A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 8, p. 95-98, 1989.
- [7] DESTRO, M.T.; LEITÃO, M.F.F.; FARBER, J.M. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 62, p. 705-711, 1996.
- [8] DESTRO, M.T.; SERRANO, A.M.; KABUKI, D.Y. Comparison of two plating media for the isolation of *Listeria* sp from some Brazilian dairy and meat products. **Rev. Microbiol.**, v. 23, n. 4, p. 256-259, 1992.
- [9] DOMINGUEZ, L.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.F.; BLANCO, M.M.; BRIONES, V.; VASQUEZ-BOLAND, J.A.; BLANCO, J.; SUAREZ, G. Overlay technique for direct detection and identification of haemolytic *Listeria* on selective plating medium. Comparison of five media. **Z. Lebensm. Uters. Forsch.**, v. 191, n. 1, p. 16-19, 1990.
- [10] DONNELLY, C.W. Conventional methods to detect and isolate *Listeria monocytogenes*. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis and food safety**. Marcel Dekker, New York. 1999. p. 225-260.
- [11] FORRET, J.; DOREY, F. Evaluation of a new culture medium to detect *Listeria monocytogenes* in raw milk. **Sci. Aliments**, v. 17, n. 2, p. 219-225, 1997.
- [12] HITCHINS, A.D. *Listeria monocytogenes*. In: USA. Food and Drug administration. **Bacteriological Analytical Manual** online. Chapter 10. Aug 2002. Disponível em <http://www.cfsan.fda.gov> .
- [13] JOHANSSON, T. Enhanced detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* from foodstuffs and food-processing environments. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 40, n. 1/2, p. 77-85, 1998.
- [14] LEE, W.H.; McCLAIN, D. Improved *Listeria monocytogenes* selective agar. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53, n. 5, p. 1215-1217, 1986.
- [15] LOESSNER, M.J.; BELL, R.H.; JAY, J.M.; SHELEF, L.A. Comparison of seven plating media for enumeration of *Listeria* spp. **Appl. Environ Microbiol.**, v. 54, n.12, p. 3003-3007, 1988.
- [16] LUND, A.M.; ZOTTOLA, E.A.; PUSCH, D.J. Comparison of methods for isolation of *Listeria* from raw milk. **J. Food Prot.**, v. 54, n. 8, p. 602-606, 1991.
- [17] McCLAIN, D.; LEE, W.H. FSIS method for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from processed meat and poultry products. **Laboratory Communication n. 57**, Beltsville: USDA-FSIS, 1989, 12p.
- [18] MOSSEL, D.A.A. Introduction and perspective. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 2, p. 1-7, 1985.
- [19] PAGOTTO, F.; DALEY, E.; FARBER, J.; WARBURTON, D. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. In: Canada. **Compendium of Analytical Methods**. Vol. 3. Disponível em <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/english/publications/compendium/index.html>
- [20] PETERS. M.; AMTSBERG, G.; BECKMANN, G.T. The diagnosis of *Listeria* encephalitis in ruminants using cultural and immunohistological techniques. I. Comparison of different selective media and culture techniques for the detection of *Listeria* from ruminants brains. **Zentralbl. Veterinarmed., Reihe B**, v. 39, n. 6, p. 410-420, 1992.
- [21] POYSKY, F.T.; PARANJPYE, R.N.; LASHBROOK, L.C.; PETERSON, M.E.; PELROY, G.A., EKLUND, M.W. Selective and differential medium for isolation of *Listeria monocytogenes* from foods. **J. Food Prot.**, v. 56, n. 4, p. 326-329, 1993.
- [22] RYSER, E.T.; DONNELLY, C.W. *Listeria*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (Eds.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. APHA, Washington, 2001. Cap. 36, p. 343-363.
- [23] SIEGEL, S. Estatística não paramétrica (para ciências do comportamento). São Paulo: McGraw-Hill, 1975. 350p.
- [24] UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Food Safety Inspection Service. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, eggs and environmental samples. In: Microbiology laboratory guidebook. Cap.8. rev. 29/04/02. Disponível em <http://www.fsis.usda.gov>
- [25] VAN NETTEN, P., VAN GAAL, B.; MOSSEL, D.A.A. Selection, differentiation and counting haemolytic *Listeria* spp on PALCAM medium. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 12, n. 1, p. 20-22, 1991.
- [26] VAN NETTEN, P.; PERALES, I. VAN DE MOOSDIJK, A.; CURTIS, G.D.W.; MOSSEL, D.A.A. Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 8, p. 299-316, 1989.
- [27] WANG, G.-H.; YAN, K.-T.; FENG, X.-M.; CHEN, S.-M.; LUI, A.-P.; KOKUBO, Y. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from retail meats in Beijing. **J. Food Prot.**, v. 55, n. 1, p. 56-58, 1992.
- [28] WARBURTON, D.W.; FARBER, J.M.; POWELL, C.; TIWARI, N.P.; READ, S.; PLANTE, R.; BABIUK, T.; LAFFEY, P.; KAURI, T.; MAYERS. P.; CHAMPAGNE, M.-J.; HUNT, T.; LACASSE, P.; VIET, K.; SMANDO, R.; COATES, F. Comparison of methods for optimum detection of stressed and low levels of *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiol.**, v. 9, n. 2, p. 127-145, 1992.
- [29] WEDERQUIST, H.J.; SOFOS, J.N.; SCHMIDT, G.R. Culture media comparison for the enumeration of *Listeria monocytogenes* in refrigerated vacuum packaged turkey bologna made without chemical additives. **Lebensm.-Wiss. Technol.**, v. 28, n. 5, p. 455-461, 1995.

6 – AGRADECIMENTOS

FAPESP (processo 97/01697-0) pelo financiamento do projeto; CNPq e CAPES pela bolsa de mestrado concedida a D. A. Rodrigues.