



**UM SÉCULO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*:
TRAÇANDO OS AVANÇOS CIENTÍFICOS
E AS SUAS CONTRIBUIÇÕES
PARA A SEGURANÇA ALIMENTAR
EM PORTUGAL**

Descoberta há 100 anos, *Listeria monocytogenes* é uma bactéria causadora de uma doença invasiva grave, denominada listeriose. As boas práticas de fabrico, planos de higiene e desinfeção, e sistemas de segurança alimentar bem-adaptados são a melhor forma de prevenção da doença.

Gonçalo Almeida¹, Vânia Ferreira² e Paula Teixeira²

¹ Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária



² Universidade Católica Portuguesa, CBQF – Centro de Biotecnologia e Química Fina – Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia



Na sequência de um surto de listeriose em animais de laboratório^[1], *L. monocytogenes* foi identificada como o agente infeccioso por Murray *et al.* em 1924. Contudo, só 57 anos depois foi reconhecida a ligação entre listeriose humana e a ingestão de alimentos contaminados pelo microrganismo, após um surto no Canadá envolvendo 41 casos e 18 mortes^[2]. Após esse incidente, e com o aumento do número de surtos reportados, foi reconhecida como patogénico alimentar, despertando grande interesse e preocupação por parte das autoridades e da Indústria Alimentar.

A listeriose é uma doença rara, mas apresenta a maior taxa de hospitalização e de mortalidade na União Eu-

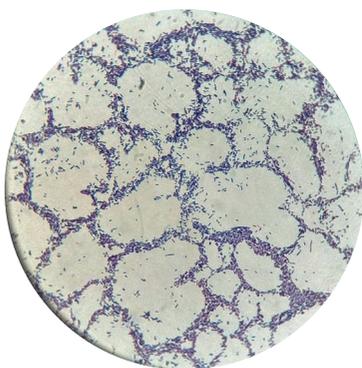


Figura 1 – Esfregaço de *L. monocytogenes* após coloração de Gram observado ao microscópio com uma ampliação de 1000X.

ropeia (UE) entre as infeções alimentares. Segundo a EFSA (Agência Europeia de Segurança Alimentar), em 2022 a taxa de notificação foi de 0,62 casos por 100 000 habitantes, com 286 mortes^[3]. Em comparação, as taxas de notificação por 100 000 habitantes para as infeções causadas por *Campylobacter* spp. e por *Salmonella* spp. foram de 43,1 casos (34 mortes) e 15,3 casos (81 mortes), respetivamente. Em Portugal, a taxa de notificação foi semelhante à média da UE, tendo sido reportados 63 casos, 60 hospitalizações e 10 mortes.

A prevenção da doença centra-se em boas práticas de fabrico, planos de higiene e desinfeção específicos para *L. monocytogenes* e implementação de sistemas de gestão de segurança alimentar, garantindo o cumprimento dos critérios microbiológicos. Nos EUA aplica-se uma política de “tolerância zero” em produtos alimentares prontos a consumir. Enquanto na UE o critério estabelece a ausência em 25 g de produto se o alimento permitir o crescimento do microrganismo ou inferior a 100 *L. monocytogenes*/g se o produto não permitir o seu crescimento.

Apesar de toda a inovação no setor alimentar e do esforço contínuo para produzir produtos seguros, ainda ocorrem casos e surtos de listeriose decorrentes do consumo de alimentos contaminados. Controlar a presença e a sua multiplicação é um desafio significativo para os sistemas de gestão de segurança alimentar devido à natureza ubíqua.

O número de casos em Portugal tem vindo a aumentar desde os primeiros dados publicados em 2007 por Almeida *et al.*^[4], quase triplicando em 2022. A comunidade científica tem estudado o microrganismo em várias vertentes. Neste artigo são realçados alguns dos contributos de investigadores portugueses.

Estudos de prevalência ao longo da cadeia alimentar, da produção à distribuição, contribuem para a avaliação da exposição

A capacidade de crescer a temperaturas de refrigeração (inferiores a 4 °C) e em ambientes com baixa atividade de água, medidas comuns para controlar o crescimento microbiano em alimentos, são características que facilitam a sua transmissão por via alimentar. Os alimentos implicados em surtos de liste-

riose incluem laticínios, produtos cárneos e de pescado, marisco e vegetais. Conhecer a prevalência de *L. monocytogenes* nos diversos alimentos no mercado permite avaliar o risco de exposição do consumidor e possibilita às autoridades priorizar os alimentos a serem analisados mais frequentemente para garantir a segurança alimentar.

Dada a uniformidade nos hábitos de consumo europeus e a globalização do mercado de alimentos, os dados recolhidos são facilmente aplicáveis noutros países. Guerra *et al.*^[5] e Mena *et al.*^[6] analisaram vários produtos comercializados em Portugal e concluíram que os consumidores portugueses enfrentavam um risco considerável de contrair listeriose através de alimentos, especialmente os “prontos a comer”, como pastelaria, frutos secos, queijos e enchidos.

Outros estudos avaliaram a incidência de *L. monocytogenes* em carne de aves, queijos de leite cru, diferentes enchidos, frutos e vegetais, bem como em moluscos frescos na cadeia de produção.

A preferência por alimentos “prontos a comer” tem aumentado entre os consumidores, tanto para consumo em casa como para levar para o trabalho, uma tendência que se intensificou durante a pandemia de COVID-19. Como esses produtos não serão sujeitos a tratamentos térmicos que destruam *Listeria* antes do consumo, as indústrias que os produzem devem implementar medidas de controlo adicionais, como a criação de zonas de fabrico com um controlo mais rigoroso, como as “salas brancas”, para garantir a segurança dos produtos. Um estudo realizado em unidades de fabrico de produtos cárneos “prontos a comer” revelou a presença do microrganismo em 25% das amostras analisadas, o que levou à reavaliação e à implementação de protocolos de higiene especificamente desenhados para controlar *L. monocytogenes*^[7]. O consumo de produtos de conveniência tem aumentado, sendo crescente a diversidade no mercado de frutas lavadas e cortadas “prontas a comer”. Apesar de alguns surtos terem sido atribuídos à ingestão de pêsegos, nectarinas e ameixas em 2023, maçãs em 2015 e melões em 2011, não existem muitos estudos sobre a presença de *L. monocytogenes* nestes produtos. Em Portugal, o microrganismo não foi detetado em amostras de pera Rocha cortada^[8].

Metodologias de deteção ou de enumeração são necessárias para verificar a eficácia dos sistemas de segurança alimentar

As metodologias para deteção de *L. monocytogenes* usam etapas de enriquecimento seguidas de isolamento em meios seletivos. Dado que *L. monocytogenes* não compete bem com as outras espécies de *Listeria* e que as colónias nos meios de isolamento seletivos podem não permitir distingui-las, surgiram estudos com alternativas às normas existentes ou comparações com métodos alternativos. Por exemplo, foi comparada a eficácia dos meios utilizados no enriquecimento e avaliados os meios utilizados para o isolamento, demonstrando que a adição de sangue melhorava a recuperação e a diferenciação de espécies.

Foram ainda avaliadas metodologias alternativas de análise mais rápidas, como as que se baseiam em reações antigénio-anticorpo ou métodos de biologia molecular. A espectroscopia de infravermelho revelou-se uma alternativa rápida e com alta sensibilidade para a identificação após enriquecimento seguido de isolamento em meios seletivos.



Figura 2 – Colónias de *L. monocytogenes* em dois meios de cultura seletivos: Agar Listeria Agosti-Otaviani (ALOA) e PALCAM.

Diversidade em ambiente de produção alimentar demonstra a existência de estirpes residentes

Vários estudos indicam que a principal fonte de contaminação de produtos alimentares processados é a contaminação cruzada através de equipamento e do ambiente fabril.

Os métodos de tipagem molecular têm sido essenciais na identificação de fontes e vias de contaminação por *L. monocytogenes*. Estes métodos permitem verificar

a existência de estirpes de *L. monocytogenes*, i.e., linhagens geneticamente semelhantes que permanecem durante meses, ou até anos, na mesma instalação de processamento alimentar. Estas estirpes são denominadas persistentes e podem contaminar recorrentemente o produto final. Há registo de surtos de listeriose causados por estas estirpes, ex. o ocorrido nos EUA e que foi associado a salsichas de peru.

Num estudo realizado em duas cooperativas de queijos da Beira Baixa, em 1996-97, foi encontrada uma alta prevalência de *L. monocytogenes*, tendo os autores considerado a situação como um problema de saúde pública. Salienta-se que em 2015 a Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) ordenou a retirada do mercado e enviou para destruição cerca de 29 toneladas de queijo produzido na Cooperativa de Produtores de Queijo da Beira Baixa, de Idanha-a-Nova, devido à presença de *L. monocytogenes*.

No âmbito de um projeto europeu, em 2007, avaliou-se a distribuição de *Listeria* ao longo do tempo em oito queijarias dos Açores e do sul de Portugal continental, investigando-se as relações genéticas entre isolados e a sua persistência. Algumas considerações deste estudo: a ocorrência parece ser independente da dimensão da indústria de laticínios, ou seja, instalações de produção, tipo de queijo produzido ou ponto do ciclo de produção.

Foram utilizadas técnicas de tipagem molecular para comparar os perfis de ADN entre isolados de *L. monocytogenes* recolhidos em fábricas e de pacientes com listeriose na zona de Coimbra. Em 2006, num estudo em queijarias, *L. monocytogenes* foi detetada em 25% das instalações, sem relação genética com isolados de pacientes. Noutro estudo, em 2006, com queijarias de São Jorge, o isolado de uma amostra de leite cru, foi geneticamente relacionado com uma estirpe epidémica responsável por surtos nos EUA e no Reino Unido. A persistência de estirpes específicas de *Listeria* durante períodos até quatro anos foi também observada em fábricas de alheira no Norte de Portugal, bem como em fábricas de panificação. Alguns dos isolados foram relacionados geneticamente com isolados de pacientes.

Os estudos referidos evidenciam as vantagens da ligação entre a indústria alimentar e os centros de in-

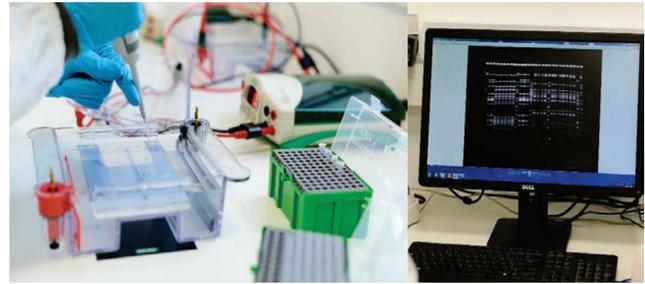


Figura 3 – Separação dos fragmentos de ADN por eletroforese e imagem dos fragmentos de ADN obtidos após eletroforese, sendo visíveis as diferenças entre isolados.

vestigação, sobretudo para as empresas com menos recursos disponíveis para investigar as vias e fontes de contaminação do microrganismo. Estes estudos fornecem dados que lhes permitem implementar medidas para mitigar a contaminação microbiana e, desta forma, diminuir o desperdício alimentar proveniente da destruição dos alimentos não conformes. A utilização de técnicas de tipagem molecular permitiu detetar um surto de listeriose na região de Lisboa e Vale do Tejo, em 2010, identificando queijos de uma fábrica no Alentejo como potenciais responsáveis.

A sequenciação total do genoma (WGS) começa a afigurar-se como a técnica de eleição na deteção de surtos e a caracterização de isolados provenientes de alimentos por WGS começa a ser uma realidade.

Adaptação a condições adversas: resistência a desinfetantes e outros fatores de stress

Tanto em alimentos como em ambientes de processamento, *L. monocytogenes* encontra condições adversas que tem de ultrapassar para se desenvolver ou para sobreviver, como valores de pH baixos, ácidos orgânicos, elevadas concentrações de sal, valores de atividade de água desfavoráveis, resíduos de desinfetantes, temperatura, etc.

A capacidade de resposta a estes fatores depende da estirpe e da sua proveniência, i.e., do ambiente fabril ou de um alimento, onde poderá ocorrer uma adaptação prévia da bactéria a uma ou várias condições ambientais desfavoráveis.

Não há para já evidências de que a resistência aos desinfetantes esteja correlacionada com a capacidade

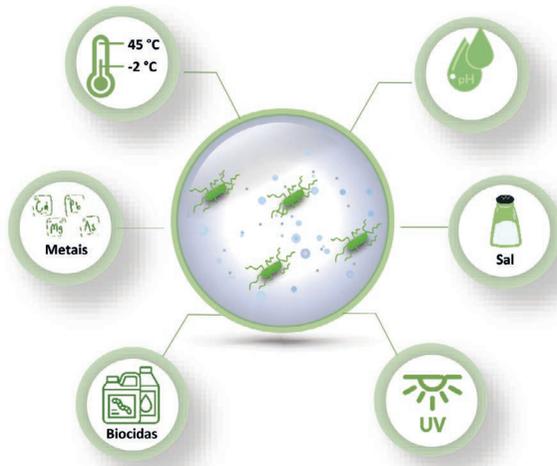


Figura 4 – Fatores que afetam o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em alimentos e ambiente de processamento alimentar: temperatura, metais pesados, biocidas, radiação UV, concentração de sal e valores de pH.

de persistência. No entanto, uma comparação sobre a influência da temperatura, sal e pH no crescimento e a suscetibilidade a desinfetantes entre estirpes persistentes e não persistentes revelou que a taxa de crescimento era maior nas estirpes persistentes, sugerindo maior capacidade de adaptação.

Estratégias de mitigação para controlar *L. monocytogenes*

O tratamento térmico, a salga, a acidificação, a congelação, a secagem e os conservantes são algumas das técnicas utilizadas na indústria alimentar para evitar ou retardar o crescimento de microrganismos e prolongar a vida útil dos alimentos.

Os conservantes mais utilizados são os ácidos sórbico, benzoico e fórmico, o nitrato e o nitrito. A utilização de óleos essenciais como conservantes tem sido uma das estratégias propostas para ir ao encontro das preferências dos consumidores por menos aditivos de síntese química nos alimentos. Os óleos essenciais possuem terpenos e fenóis com propriedades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e inseticida, etc. Podem ser extraídos de plantas e subprodutos da indústria alimentar e aplicados diretamente nos alimentos, como revestimentos ou em embalagens. Estudos em Portugal avaliaram a atividade listericida de

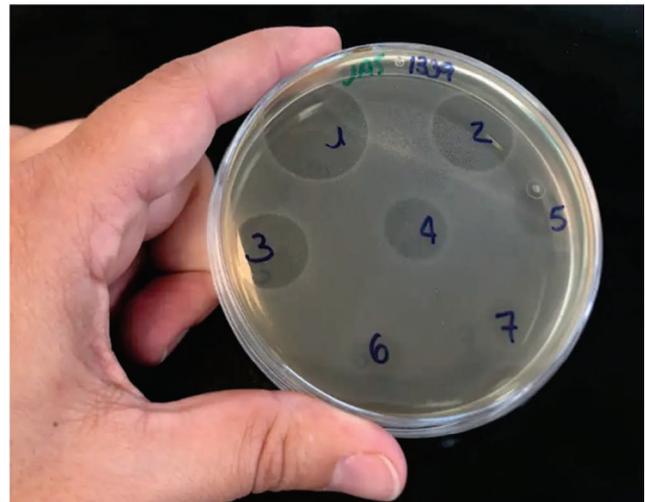


Figura 5 – Ação de bacteriocinas produzidas por bactérias do ácido láctico no crescimento de *L. monocytogenes*. Os halos de inibição (1 a 4) são indicativos da ação das bacteriocinas contra a bactéria.

óleos obtidos de alecrim, tomilho e orégãos. Apesar da atividade que demonstram, as alterações sensoriais que causam limitam a sua utilização.

Outra estratégia “natural” é o biocontrolo utilizando culturas de microrganismos como *Carnobacterium divergens* e outras bactérias do ácido láctico, que produzem bacteriocinas, ácidos orgânicos e outras substâncias antimicrobianas que inibem *L. monocytogenes*. A nisina (E234) é a única bacteriocina aprovada para utilização como conservante. Como outras bacteriocinas, não podem ser adicionadas purificadas, utilizam-se culturas bacterianas que as produzem nos alimentos. São vários estudos em Portugal sobre a

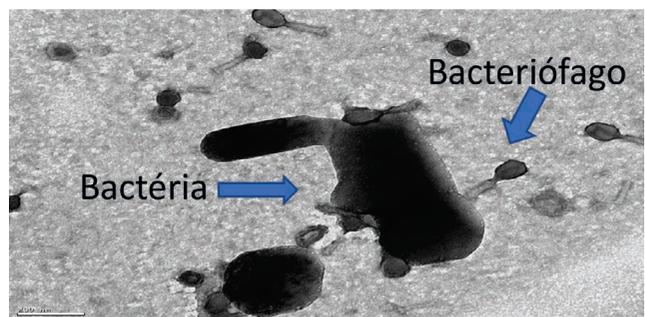


Figura 6 – Ação dos bacteriófagos LISTEX P100 sobre as células de *L. monocytogenes* levam à morte da bactéria por lise (Foto obtida no âmbito do projeto Biocold Pasteurization).

utilização de bacteriocinas em diferentes alimentos e existem culturas produtoras de bacteriocinas disponíveis no mercado.

Os bacteriófagos têm sido usados como agentes biocidas há décadas. Alguns são comercializados para utilização em alimentos, como o caso do LISTEX P100, e têm mostrado resultados promissores, como apresentado no trabalho realizado em Portugal com amostras de *sashimi* inoculadas. Estes bacteriófagos poderão ser usados em produtos alimentares para os quais não seja possível utilizar um processo de destruição térmica do microrganismo.

Conclusões

Listeria monocytogenes continua a ser um dos desafios de saúde pública urgentes e globais a nível de segurança alimentar em países desenvolvidos, pela elevada mortalidade, 20–30% dos casos, mas também pelo impacto económico associado, incluindo o elevado desperdício alimentar que origina.

Em 2023 foram emitidas 106 notificações de ocorrência de *Listeria* em produtos alimentares pelo sistema RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*), não existindo nenhum alerta de Portugal.

Os estudos de prevalência do microrganismo em Portugal foram realizados há alguns anos, portanto, atualmente, poderão estar desatualizados. Para além disso, o critério microbiológico atualmente aplicado baseia-se na capacidade de multiplicação de *Listeria* no produto alimentar. Portanto, para além da deteção, deveria ser realizada uma avaliação da carga do microrganismo presente.

A persistência nas indústrias alimentares tem sido objeto de estudo, no entanto, algumas questões relevantes foram apontadas pela EFSA^[9] tais como: quais os subtipos de *L. monocytogenes* frequentemente associados à persistência e quais as principais características que potenciam esta capacidade de persistência? Quais os fatores existentes nas indústrias que podem contribuir para a persistência?

Deveria ser prestada alguma atenção à produção primária e ao ambiente como fontes de contaminação e dispersão de *L. monocytogenes*, tendo em conta as alterações climáticas em curso e as transformações nos sistemas de produção alimentar.

Com a evolução da tecnologia e com uma redução dos custos de WGS, abre-se a possibilidade de ampliar o conhecimento sobre as características genéticas e recorrer a estudos retrospectivos utilizando os isolados depositados em coleções de culturas. Há, assim, uma oportunidade única para avançar no conhecimento sobre *L. monocytogenes*, identificar marcadores de virulência e persistência e definir medidas de controlo e prevenção mais eficazes. O projeto em curso, financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), GenoPheno4trait (PTDC/BAA-AGR/4194/2021), contribuirá certamente para esses propósitos. ☺



Bibliografia

- [1] Murray, E.G.D. et al. (1926). A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *J Pathol Bacteriol*, **29**:407–439.
- [2] Schlech, W.F. et al. (1983). Epidemic listeriosis – Evidence for transmission by food. *N Engl J Med*, **308**:203–206.
- [3] EFSA & ECDC (2023). The European Union One Health 2022 zoonoses report. *EFSA Journal*, **21**:e8442.
- [4] Almeida, G. et al. (2010). Distribution and characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates in Portugal, 1994–2007. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **29**:1219–1227.
- [5] Guerra, M.M. et al. (2001). *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. *Food Microbiol*, **18**: 423–429.
- [6] Mena, C. et al. (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiol*, **21**:213–216.
- [7] Henriques, A.R. et al. (2014). Assessing *Listeria monocytogenes* presence in Portuguese ready-to-eat meat processing industries based on hygienic and safety audit. *Food Res Int*, **63**:81–88.
- [8] Graça, A. et al. (2017). Microbiological quality and safety of minimally processed fruits in the marketplace of southern Portugal. *Food Control* **73**:775–783.
- [9] EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) et al. (2024). Persistence of microbiological hazards in food and feed production and processing environments. *EFSA Journal*, **22**:e8521.