



UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

***Listeria monocytogenes* EM SALADA COM FRANGO PRONTA A CONSUMIR:  
ESTUDO DA VIDA ÚTIL UTILIZANDO UM *CHALLENGE TEST***

JOANA FILIPA SANTOS FERREIRA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

Professora Doutora Marília Catarina  
Leal Fazeres Ferreira

Professora Doutora Maria João dos  
Ramos Fraqueza

Professora Doutora Ana Rita Barroso  
Cunha de Sá Henriques

ORIENTADORA:

Professora Doutora Ana Rita  
Barroso Cunha de Sá Henriques

2018

LISBOA





UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

***Listeria monocytogenes* EM SALADA COM FRANGO PRONTA A CONSUMIR:  
ESTUDO DA VIDA ÚTIL UTILIZANDO UM CHALLENGE TEST**

JOANA FILIPA SANTOS FERREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

Professora Doutora Marília Catarina  
Leal Fazeres Ferreira

Professora Doutora Maria João dos  
Ramos Fraqueza

Professora Doutora Ana Rita Barroso  
Cunha de Sá Henriques

ORIENTADORA:

Professora Doutora Ana Rita  
Barroso Cunha de Sá Henriques

2018

LISBOA

*Aos meus pais*



## **Agradecimentos**

A realização deste estudo só foi possível graças ao contributo e colaboração de várias pessoas e instituições, às quais gostaria de agradecer sinceramente e de coração:

Obrigada à Professora Doutora Ana Rita Henriques, minha orientadora, por todo o esforço, entrega e dedicação a este projeto, sem a qual a realização deste estudo não seria possível. Serei eternamente grata.

Obrigada ao Professor Doutor Telmo Nunes, pela indispensável ajuda na análise estatística, mas também pelo precioso tempo e atenção dispensados a este projeto.

Obrigada à Professora Doutora Marília Ferreira, pelo encaminhamento inicial deste projeto, assim como pelo tempo dispensado.

Obrigada à minha empresa empregadora, pela oferta das saladas, sem as quais a realização deste estudo não seria possível.

Obrigada à Engenheira Maria José Fernandes do laboratório de Tecnologia dos produtos animais da FMV, pela ajuda técnica e pela compreensão que sempre demonstrou.

Obrigada à D. Helena Fernandes do laboratório Tecnologia dos produtos animais da FMV, pela ajuda técnica e pela compreensão que sempre demonstrou.

Obrigada à D. Maria Paula, do secretariado do Departamento de Produção Animal e Segurança Alimentar da FMV.

Obrigada aos meus pais e irmã, sem eles este percurso não teria sido possível, obrigada pela compreensão e força que me deram.

Obrigada ao meu namorado Pedro, por toda a compreensão demonstrada.

Obrigada à minha grande amiga Marisa Mata, por todo o companheirismo vivido neste percurso académico.

Por fim, obrigada à Faculdade de Medicina Veterinária por estes 2 anos de ensino e aprendizagem.

A todos o meu bem hajam!

### **Apoio financeiro:**

O presente trabalho foi financiado pelo projeto UID/CVT/00276/2013 do Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa.



*Listeria monocytogenes* em salada com frango pronta a consumir: estudo da vida útil utilizando um *challenge test*

## Resumo

*Listeria monocytogenes* é o agente causal da listeriose, infecção rara, mas severa, cuja taxa de fatalidade pode atingir 20% na população humana. A listeriose é quase exclusivamente transmitida pelo consumo de alimentos contaminados.

Os alimentos prontos a consumir são muito associados a *L. monocytogenes*, pois são conservados por longos períodos em refrigeração, durante os quais *L. monocytogenes* pode desenvolver-se devido ao seu caráter psicrotrófico. A legislação europeia estabeleceu limites para presença e quantificação de *L. monocytogenes* em alimentos, consoante a etapa da cadeia alimentar em que estes se encontram: no produtor, o alimento deverá demonstrar ausência de *L. monocytogenes* em 25g e na distribuição comercial poderá conter um máximo de  $10^2$  ufc/g de alimento.

Usando um *challenge test*, o presente trabalho visou avaliar a evolução do desenvolvimento da estirpe *L. monocytogenes* CECT 4031 inoculada artificialmente em salada com frango pronta a consumir, durante a vida útil refrigerada. Esta estirpe foi selecionada por pertencer ao serótipo 1/2a, que é aquele que mais comumente é isolado dos alimentos e que é associado a muitos casos de doença humana.

Antes da inoculação, *L. monocytogenes* foi exposta a um choque com posterior adaptação ao frio (5°C), com o objetivo de simular uma possível adaptação ao ambiente industrial, que é geralmente refrigerado para a produção de saladas prontas para consumir. Utilizou-se uma suspensão com 5 log ufc/ml de *L. monocytogenes* CECT 4031, para a inoculação das saladas que foram mantidas a 5°C durante os 7 dias de vida útil. As saladas foram analisadas nos dias 0, 4 e 7 e realizaram-se três réplicas experimentais. Os resultados mostraram que *L. monocytogenes* variou de  $6,1 \pm 0,6$  log ufc/g a  $6,4 \pm 0,8$  log ufc/g do dia 4 ao dia 7, respetivamente. Os resultados foram analisados e comparados com curvas de crescimento de referência e foram explorados potenciais cenários, considerando a vida útil refrigerada do alimento em estudo. A partir dos resultados estimou-se a quantidade de *L. monocytogenes* que poderia hipoteticamente estar presente na fase de produção, de forma que o limite legal de 100 ufc/g de alimento no final da vida útil não fosse ultrapassado.

Palavras-chave: *L. monocytogenes*; choque e adaptação ao frio; *challenge test*; salada de frango; alimento pronto a consumir.



*Listeria monocytogenes* in ready-to-eat chicken salad: challenge testing for shelf life assessment

**Abstract**

*Listeria monocytogenes* is the causal agent of listeriosis, a rare but severe life-threatening human illness, with a fatality rate of about 20%. Listeriosis is almost exclusively transmitted by food consumption.

*L. monocytogenes* is especially related to ready-to-eat foods, because of the long refrigerated shelf life, during which *L. monocytogenes* may thrive and develop, due to its psychrotrophic character. European legislation establishes two different limits for *L. monocytogenes* in ready-to-eat foods, according to the food chain stakeholder: in the producer absence of *L. monocytogenes* in 25g of food is required, whereas while the foods are placed on the market up to 100 ufc/g may be present.

Using a challenge test, this work aimed to assess *L. monocytogenes* CECT 4031 growth when artificially inoculated in a ready-to-eat chicken salad, during its refrigerated shelf life. This *L. monocytogenes* strain was selected because it belongs to serotype 1/2a, the one that is most commonly isolated from foods and associated with many cases of human illness.

Before inoculation, *L. monocytogenes* was previously exposed to a cold stress and adaptation to refrigerated temperature (5°C), in order to recreate a possible adaptation to the industrial environment, which is usually kept under refrigeration for the preparation of ready-to-eat salads. A 5 log cfu/ml suspension of *L. monocytogenes* CECT 4031 was used to inoculate the salads that were kept at 5°C during its 7 days shelf life. Salads were analyzed at day 0, 4 and 7 and three experimental replicates were performed. *L. monocytogenes* enumeration ranged from 6.1±0.6 log cfu/g to 6.4±0.8 log cfu/g from day 4 to day 7, respectively. Results were analyzed and compared with reference growth curves and potential scenarios were explored, considering the refrigerated shelf life of chicken salads. The hypothetical maximum concentration of *L. monocytogenes* that could be present at the production stage was estimated, in order to comply with the mandatory limit of 100 cfu/g at the end of shelf life.

Keywords: *L. monocytogenes*; cold stress and adaptation; *challenge test*; chicken salad; ready-to-eat food.



## ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	i
Apoio financeiro	iii
Resumo	v
<i>Abstract</i>	vii
Índice geral	ix
Índice de tabelas	xi
Índice de figuras	xi
Lista de abreviaturas	xiii
1. Introdução	1
Objetivo do estudo	3
2. <i>Revisão bibliográfica</i>	5
2.1 <i>Listeria monocytogenes</i> : breve caracterização	5
2.2 Linhagens filogenéticas de <i>L. monocytogenes</i> e respetiva distribuição	7
2.3 A listeriose	8
2.3.1. Nos animais	8
2.3.2 No Homem	8
2.3.2.1. Formas de listeriose e sintomas	10
2.3.2.2. Grupos de risco	11
2.3.2.3. Dados oficiais na União Europeia	12
2.3.2.4. Distribuição por género e faixa etária	14
2.3.2.5. Distribuição sazonal	14
2.3.3. Notificação de listeriose humana	15
2.3.3.1 Doença de declaração obrigatória em Portugal	16
2.4. <i>Listeria monocytogenes</i> nos alimentos	17
2.4.1. Contaminação dos alimentos por <i>L. monocytogenes</i>	20
2.4.2. Sobrevivência no ambiente fabril	22
2.4.2.1 Biofilmes	23
2.4.2.2. Resistência a biocidas	25
2.5. Prevenção e controlo	27
2.6. Estudos de vida útil de alimentos	32
2.6.1. Conceito de vida útil de um alimento	32
2.6.2. Fatores que influenciam a vida útil de um alimento	32
2.6.3 Definição de estudo de vida útil de alimentos	33
2.6.4 Delineamento do estudo de vida útil	34
2.6.5 Indicadores nas análises de vida útil	34
2.6.6 Diferentes tipos de estudo de vida útil	34
3. Material e métodos	37
3.1. Processo de produção e recolha das amostras	37
3.2 Estirpe escolhida para o estudo	37
3.2.1. Adaptação ao frio	38
3.2.2. Preparação da suspensão de <i>L. monocytogenes</i> para inoculação das saladas	38
3.3. Métodos físico-químicos	39
3.3.1. Determinação do potencial hidrogeniónico (pH)	39
3.3.2. Determinação da atividade da água ( $a_w$ )	39
3.4. Métodos microbiológicos	39
3.4.1 Preparação das amostras	39
3.4.2 Contagem de microrganismos aeróbios totais (AT) a 30°C	40

3.4.3 Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	40
3.4.4 Contagem de <i>L. monocytogenes</i>	40
3.4.5 Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i>	41
3.5 Modelos matemáticos utilizados no estudo	41
3.6 Análise dos dados	41
4. Resultados e discussão	43
4.1 Determinação do pH	43
4.2 Determinação atividade da água ( $a_w$ )	43
4.3 Contagem de microrganismos aeróbios totais (AT) a 30°C	44
4.4 Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	46
4.5 Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i>	48
4.6 Quantificação de <i>L. monocytogenes</i>	48
5. Conclusão	52
6. Referências bibliográficas	54
Anexo I - Ficha Técnica de Produto Acabado – Salada com Frango	

## Índice de tabelas

Tabela 1. Serótipos de <i>Listeria monocytogenes</i> isolados de casos invasivos no Homem.	7
Tabela 2. Zoonoses confirmadas em humanos na União Europeia em 2015 e respetiva fatalidade.	10
Tabela 3. Fatalidade por listeriose na União Europeia de 2007 a 2015.	14
Tabela 4. Substâncias ativas biocidas utilizadas na indústria alimentar e mecanismos de ação.	26
Tabela 5. Médias e desvios-padrão dos valores de pH e de $a_w$ durante o estudo de vida útil.	43
Tabela 6. Evolução estimada do desenvolvimento de <i>L. monocytogenes</i> considerando $\mu_{max}$ : 0.017 log ufc/g/dia.	50

## Índice de figuras

Figura 1. Representação gráfica da fisiopatologia da listeriose humana.	9
Figura 2. Número de casos confirmados de listeriose por idade e género na União Europeia em 2015.	13
Figura 3. Casos confirmados de listeriose humana na União Europeia no período de 2008 a 2015.	15
Figura 4. Distribuição por idade dos casos de listeriose reportados em Portugal em 2015.	16
Figura 5. Distribuição por idade dos casos letais de listeriose reportada em Portugal em 2015.	17
Figura 6. Percentagem da não conformidade de amostras recolhidas em fábricas produtoras de alimentos, 2008 – 2015.	19
Figura 7. Percentagem da não conformidade de amostras recolhidas no retalho, 2008 – 2015.	19
Figura 8. Visão geral esquemática das vias de transmissão e do sistema de controlo de <i>Listeria monocytogenes</i> na cadeia alimentar dos alimentos prontos a consumir.	21
Figura 9. Evolução das médias das contagens de AT a 30°C nas amostras correspondentes ao controlo branco de “Salada com frango” ao longo do tempo.	44
Figura 10. Evolução das médias das contagens de AT a 30°C nas amostras de “Salada com Frango” inoculadas com <i>L. monocytogenes</i> , ao longo do tempo de estudo.	45
Figura 11. Evolução das médias das contagens de <i>Enterobacteriaceae</i> nas amostras de controlo branco “Salada com frango” com <i>L. monocytogenes</i> , ao longo do tempo de estudo.	46
Figura 12. Evolução das médias das contagens de <i>Enterobacteriaceae</i> nas amostras de “Salada com frango” inoculadas com <i>L. monocytogenes</i> , ao longo do tempo de estudo.	47
Figura 13. Evolução das médias das contagens de <i>L. monocytogenes</i> nas amostras de “Salada com frango” inoculadas, ao longo do tempo de estudo.	48
Figura 14. Comparação da curva de crescimento de <i>L. monocytogenes</i> obtida no presente trabalho com a curva de crescimento do modelo preditivo gerada no <i>software</i> ComBase.	49



## **Lista de abreviaturas**

AT- Aeróbios totais

UFC- unidades formadoras de colónias

ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

EFSA - *European Food Safety Authority*

ACMSF - Comité Consultivo da Segurança Microbiológica de Alimentos

ECDC – *European Center for Disease Control and Prevention*

PCR - *Polimerase Chain Reaction*

pH – Potencial Hidrogeniónico

PET - Politereftalato de etileno

BHI - *Brain Heart Infusion*

ALOA – Agar Listeria Ottaviani Agosti

TGA – Agar Triptose Glucose Extract

VRDB – Agar *Violet Red Bile Dextrose*

VBNC - *Viable but non culturable*

LOG – logaritmo

HACCP - Hazard Analysis and Critical Control Point

°C - Graus Celsius

µg - Micrograma

g – Grama



## Introdução

O consumo de produtos prontos a consumir aumentou significativamente nos últimos tempos. O estilo de vida atual com a conseqüente falta de tempo para dedicar à preparação de alimentos faz com que o consumidor opte por alimentos mais fáceis e rápidos de preparar. Ciente desta necessidade, a indústria alimentar vem desenvolvendo várias referências adaptadas a estes estilos de vida, sobretudo alimentos prontos a consumir. Por definição legal, são alimentos prontos-a-consumir todos aqueles destinados pelo produtor ou fabricante ao consumo humano direto, sem necessidade de cozedura ou outra transformação eficaz para eliminar ou reduzir para um nível aceitável os microrganismos perigosos (Regulamento n.º 2073/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de novembro de 2005).

Na União Europeia (UE), a listeriose continua a ser uma doença grave, com alta morbidade, hospitalização e mortalidade em populações vulneráveis. Esta doença atinge essencialmente grávidas, indivíduos imunodeprimidos e idosos, verificando-se em casos de doença grave uma fatalidade que ronda os 20% (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, 2011). A listeriose é causada por *Listeria monocytogenes*, uma bactéria Gram-positiva pertencente à família *Listeriaceae*. Alimentos prontos a consumir, como produtos láteos, produtos de charcutaria, alimentos à base de pescado e produtos de origem vegetal, são suscetíveis de contaminação por *Listeria monocytogenes*. Esta bactéria patogénica é facilmente eliminada por processos térmicos, químicos e de higienização utilizados na indústria alimentar. Contudo, a capacidade de sobreviver no ambiente fabril devido à formação de biofilmes nas superfícies de preparação de alimentos e a tolerância a desinfetantes de uso comum na indústria alimentar conferem uma vantagem seletiva a *L. monocytogenes*, que recontamina os alimentos após os tratamentos listericidas (Iranzo, Navarro, Gascó, Cucart, & Cartón, 2015).

O Regulamento (CE) n.º 2073/2005, de 15 de novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, define que os alimentos prontos para consumo suscetíveis de permitir a multiplicação de *L. monocytogenes*, exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos, não podem apresentar *L. monocytogenes* em 25g antes de deixar de estar sob o controlo imediato do operador da empresa do sector alimentar que o produziu. Uma vez colocados no mercado e durante a sua vida útil, *L. monocytogenes* não poderá ultrapassar 100 unidades formadoras de colónias por grama. Para ser possível a *L. monocytogenes* ocorrer num alimento durante a vida útil, sem violação da embalagem, a contaminação terá que ter tido lugar na indústria produtora, ainda que a sua presença não seja detetável nos ensaios.

Segundo o laboratório europeu de referência para *L. monocytogenes* existem vários tipos de estudos de vida útil que validam os procedimentos de processamento de segurança alimentar, condições de armazenamento do produto e tempo de prateleira, como é o caso dos ensaios de *challenge testing*. Os estudos de vida útil utilizados juntamente com modelos de microbiologia preditiva permitem prever a dinâmica de microrganismos patogénicos nos alimentos (European Reference Laboratory on *Listeria monocytogenes* [EURL Lm], 2014).

## **Objetivo do estudo**

O objetivo principal do presente estudo foi avaliar a evolução do desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* inoculada artificialmente em salada com frango refrigerada pronta a consumir, durante o período de vida útil. Utilizando modelos matemáticos, procurou determinar-se a quantidade de *L. monocytogenes* que poderia contaminar o alimento no produtor, de forma a que o limite legal de 100 ufc/g de alimento durante a vida útil não fosse ultrapassado.



## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. *Listeria monocytogenes*: breve caracterização

*Listeria monocytogenes* foi descoberta por E.G.D. Murray, em 1924, quando este estudava uma epidemia que afetava coelhos e porcos numa quinta em Cambridge. Em 1929 foi considerada pela primeira vez um agente patogénico de animais. Em 1980, na sequência de vários surtos atribuídos ao consumo de alimentos contaminados com *L. monocytogenes*, esta bactéria passou a ser considerada uma ameaça para a saúde pública pela comunidade científica, pela indústria alimentar e pelos consumidores. Foi então reconhecida como agente patogénico transmissível através de alimentos, causando uma doença designada listeriose. O nome do género *Listeria* é uma homenagem a Joseph Lister (1827 – 1912), um cirurgião inglês, pioneiro da Higiene, que introduziu técnicas de antissepsia na prática cirúrgica, prevenindo a infeção das feridas cirúrgicas (Arunakul, 2003; Iranzo, Navarro, Gascó, Cucart & Cartón, 2015).

*L. monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva pertencente à família *Listeriaceae*, que cresce na presença ou na ausência de oxigénio (anaeróbia facultativa), catalase positiva e que se desenvolve intracelularmente. Possui a forma de pequenos bastonetes, não forma esporos e possui flagelos peritricos (Iranzo *et al.*, 2015).

*L. monocytogenes* consegue desenvolver-se em ambientes com temperaturas entre 0,4° e 45°C, sobrevive por longos períodos em alimentos congelados e consegue multiplicar-se a temperaturas de refrigeração, no entanto a sua temperatura ótima de crescimento varia entre os 30° e os 37°C (Di Ciccio, Meloni & Ianieri, 2015).

As concentrações elevadas de sal são toleradas por *L. monocytogenes*, pois sobrevive na presença de concentrações superiores a 10% (Chan, Boor & Wiedmann, 2007; Autoridade de Segurança Alimentar e Económica [ASAE], 2011).

Relativamente ao pH consegue crescer em ambientes com valores de pH entre 4,3 e 9,4 e apresenta uma taxa específica de crescimento máxima com valores de pH compreendidos entre 6 e 8. A atividade da água ( $a_w$ ) também influencia o desenvolvimento de *L. monocytogenes* e estima-se que o limite máximo seja de 0.92, em condições de temperatura e pH favoráveis. No caso dos produtos com atmosfera protetora, concentrações de CO<sub>2</sub> superiores a 80% são consideradas inibitórias (ASAE, 2011).

Anteriormente, o género *Listeria* incluía 15 espécies: *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, *L. weihenstephanensis*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia* e *L. grandensis*

(Todd & Notermans, 2010). Atualmente, reconhecem-se 17 espécies distintas, pois duas novas espécies foram descritas na última década, a saber *L. newyorkensis* e *L. booriae*. Estas novas espécies foram isoladas de fontes rurais e de materiais em decomposição (Orsi & Wiedmann, 2016).

Apenas *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são consideradas agentes patogênicos para humanos e animais, no entanto *L. monocytogenes* ainda é o único agente importante na perspectiva da saúde humana (Orsi & Wiedmann, 2016). A via oral é a principal via de exposição, tanto para animais como para humanos, e estima-se que 99% de todos os casos humanos de listeriose sejam transmitidos por alimentos contaminados (Orsi *et al.*, 2016; *European Food Safety Authority [EFSA]*, 2018)

*Listeria monocytogenes* está largamente distribuída no meio ambiente, tem como principais reservatórios o solo e a água, no entanto existem outros reservatórios importantes que têm influência na sua disseminação ao longo da cadeia alimentar, como a indústria alimentar e os manipuladores de alimentos (ASAE, 2011).

A temperatura, o stress osmótico e o pH têm impacto no perfil de virulência de *L. monocytogenes* (Duodu *et al.*, 2010; Walecka, Molenda, Karpíšková & Bania, 2011). O leite e as características específicas do leite, como o teor de gordura, demonstraram ter uma influência na virulência *in vitro* de *L. monocytogenes* (Pricope, Nicolau, Wagner & Rychli, 2013). Mahoney e Henriksson (2003) relataram que a patogenicidade de *L. monocytogenes* depende da natureza do alimento no qual está presente.

Até agora, apenas um número limitado de estudos investigou o impacto dos alimentos na virulência *in vitro* e *in vivo* de *L. monocytogenes* (NicAogáin & O'Byrne, 2016). No entanto a maioria dos estudos tem como limitação o facto de serem realizados em ambientes experimentais, representando apenas um passo da sequência de eventos associados à infecção natural de *L. monocytogenes*. É necessário conhecer a sua sobrevivência no ambiente alimentar, mas também é necessário conhecer as condições relativas à passagem no trato gastrointestinal e das barreiras intestinais, placentárias e sanguíneas do hospedeiro. Todas estas etapas afetam a virulência de *L. monocytogenes* e a sua capacidade para infetar hospedeiros. Quando exposta a condições adversas, como as encontradas no ambiente alimentar ou no trato gastrointestinal, *L. monocytogenes* molda o seu transcriptoma, de forma a ativar redes de resposta complexas relacionadas não apenas com o stress, mas também com a virulência. O principal regulador de resposta ao stress é o fator alternativo  $\sigma^B$  que contribui diretamente para a regulação da expressão dos genes de virulência, como *inlA*, *inlB* e *prfA* (EFSA, 2018).

A patogenicidade de *L. monocytogenes* também tem sido relacionada com a sua viabilidade no ambiente ácido do estômago e, posteriormente, na presença da bÍlis no intestino delgado (Jiang Olesen, Andersen, Fang, & Jespersen, 2010).

## 2.2. Linhagens filogenéticas de *L. monocytogenes* e respetiva distribuição

Várias técnicas têm sido utilizadas para estudar a filogenia de *L. monocytogenes*., Os serótipos de *L. monocytogenes* podem ser categorizados em 4 grupos filogenéticos, nomeadamente: linhagem I e II e outras menos comuns, linhagem III e linhagem IV (Orsi & Wiedmann, 2016). Os serótipos da linhagem I são clonais e incluem os serótipos 1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e e estão associados em grande parte aos casos de listeriose humana, possuindo um elevado potencial patogénico, superior aos dos serótipos da linhagem II (Eskhan & Abu-Lail, 2012; Orsi & Wiedmann, 2016). Os serótipos da linhagem II são amplamente diversos e devido à transferência horizontal de genes incluem os serótipos 1/2a, 1/2c, 3a e 3c. Os isolados da linhagem III e IV são raros e têm sido sobretudo recuperados a partir de ruminantes, e de poucos casos clÍnicos humanos e em alimentos, representando os serótipos 4a, 4b e 4c (Chen, Regan, Laksanalamai, Healey & Hu, 2017; Orsi & Wiedmann, 2016).

Dos 13 serótipos conhecidos de *L. monocytogenes* apenas três (1/2a, 1/2b e 4b) estão associados a mais de 90% das infeções humanas e animais (Chen *et al.*, 2017; Cabrita, Correia, Dias & Brito, 2004).

Na tabela 1 são apresentados os serótipos associados a casos de listeriose invasiva nos Estados Unidos da América em 2011. O serótipo 1/2a foi o que se identificou com maior frequência (43%).

Tabela 1 – Serótipos de *Listeria monocytogenes* isolados de casos invasivos no Homem (*United States of America Centers for Disease Control and Prevention* [CDC], 2013).

Serótipo	N	%
4b	90	33
1/2a	117	43
1/2b	50	18
Outros serótipos	13	5
Não tipáveis	1	>1

A maioria dos serótipos de *Listeria monocytogenes* isolados de alimentos e do meio ambiente são estirpes do serogrupo IIa, especialmente serótipos 1/2a e 1/2b. O serótipo 1/2a é o mais isolado de alimentos, enquanto o serótipo 4b causa a maioria dos surtos de listeriose humana (Chen *et al.*, 2017; Lomonaco, Nucera & Filipello, 2015).

O serótipo 1/2a geralmente forma biofilmes de maior densidade do que o serótipo 4b. Tal facto poderá explicar a maior frequência de isolados 1/2a nos alimentos, devido à contaminação cruzada a partir de superfícies de preparação de alimentos onde *L. monocytogenes* na forma de biofilmes (Crandall *et al.*, 2012).

## **2.3 A listeriose**

### **2.3.1. Nos animais**

A listeriose é uma doença infecciosa que afeta uma ampla gama de mamíferos, incluindo ruminantes. Nos ruminantes, as ovelhas são os mais afetados, exibindo quadros sintomáticos de encefalite, septicemia, aborto, mastite e gastroenterite (Linke *et al.*, 2014).

Alguns estudos associam a alimentação à base de algumas silagens com a infeção do animal. Os animais também podem estar expostos a *L. monocytogenes* por contato direto com material infetado de outros animais, nomeadamente fezes, urina e produtos de aborto (Picoux, 2008; Scott, 2013).

Vários fatores, incluindo mudanças repentinas na ração, mudanças climáticas (por exemplo, temperaturas muito baixas), períodos prolongados de transporte foram associados com o início de listeriose clínica em ruminantes. Outros fatores como gravidez, parto e lactação, também podem diminuir a imunidade do hospedeiro, deixando assim os animais mais suscetíveis à doença (Picoux, 2008).

### **2.3.2 No Homem**

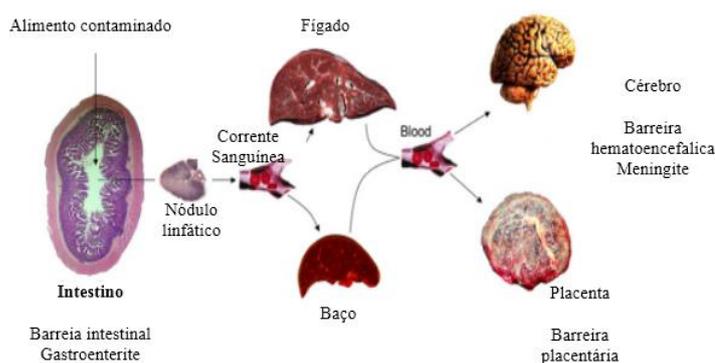
Mais de 97% dos casos de listeriose humana que foram reportados na União Europeia (UE) resultaram em hospitalização (EFSA & European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC], 2016). Em 2015, 2206 casos humanos foram reportados e 1524 foram confirmados laboratorialmente (EFSA, 2016).

A listeriose humana é na sua maioria de origem alimentar, no entanto, o contacto com animais infetados ou a transmissão de homem para homem, por exemplo em ambiente hospitalar, ou de mãe para filho são também possíveis formas de transmissão da doença. *L. monocytogenes* é transmitida aos alimentos através da introdução de fontes ambientais (matérias-primas, animais, solo, poeira e água) no ambiente de processamento de alimentos (EFSA, 2018).

Na UE, a listeriose continua a ser uma doença grave, com alta morbidade, hospitalização e mortalidade em populações vulneráveis, como mulheres grávidas, idosos e doentes crónicos. Esta doença atinge essencialmente grávidas, indivíduos imunodeprimidos e idosos verificando-se, em casos de doença grave, uma fatalidade que ronda os 30%. Os sintomas, nestes casos, traduzem-se em manifestações clínicas como a meningite e septicémia. Durante a gravidez, existe a possibilidade de o feto ser afetado, resultando em aborto ou em comprometimento do sistema nervoso central do neonato. No caso de indivíduos imunodeprimidos, os sintomas são muitas vezes confundidos com uma gripe. Esta bactéria está entre as principais causas de morte por infeções de origem alimentar em países desenvolvidos (ASAE, 2011).

Após a ingestão e a passagem pelo estômago (Figura 1), *L. monocytogenes* multiplica-se no lúmen intestinal, atravessa a barreira intestinal e acede à corrente sanguínea, atingindo primeiramente o fígado e o baço e disseminando-se posteriormente a outros órgãos, como o cérebro ou a placenta (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

Figura 1 – Representação gráfica da fisiopatologia da listeriose humana (adaptado de Vázquez-Boland *et al.*, 2011).



Em indivíduos saudáveis, a infeção por *L. monocytogenes* pode causar apenas gastroenterite. Os relatórios de surtos mostraram que o consumo de um alimento com um nível elevado de contaminação pode causar apenas a forma menos severa de listeriose e que alimentos prontos a consumir à base de carne e de peixe, bem como certos tipos de queijo, são frequentemente

identificados como fontes de infecção (EFSA, 2016; EFSA, 2018).

Como se pode verificar na tabela 2, *Listeria monocytogenes* apresentou a mais elevada taxa de fatalidade em humanos, com 270 mortes reportadas, de entre todos os agentes patogénicos considerados em 2015 na União Europeia.

Tabela 2 – Zoonoses confirmadas em humanos na União Europeia em 2015 e respetiva fatalidade (adaptado de EFSA, 2016).

Doença	Número de casos com confirmação laboratorial	Hospitalizações		Mortes	
		Número de casos com hospitalização	Proporção de hospitalização	Número de mortes	Taxa de fatalidade (%)
Campilobacteriose	229213	19302	31,2	59	0,03
Salmonelose	94625	12353	38,4	126	0,24
Yersiniose	7202	530	30,9	0	0
Infeção STEC	5901	853	36,3	8	0,24
<b>Listeriose</b>	<b>2206</b>	<b>964</b>	<b>97,4</b>	<b>270</b>	<b>17,1</b>
Tularemia	1079	89	55,6	0	0
Hidatidose	872	107	59,8	1	0,49
Febre Q	833	NA	NA	3	0,36
Brucelose	437	130	69,5	1	0,74
Triquinelose	156	30	34,5	0	0
Febre do Nilo	127	54	83,1	2	1,57
Raiva	0	NA	NA	0	0

### 2.3.2.1. Formas de listeriose e sintomas

A listeriose pode ocorrer na forma invasiva ou não invasiva e as características clínicas da variam de indivíduo para indivíduo. Os sintomas podem surgir 2 a 30 dias após a exposição ao agente patogénico (ASAE, 2011).

A listeriose invasiva atinge o útero, corrente sanguínea ou o sistema nervoso central. Nos adultos e nos recém-nascidos, as manifestações clínicas de listeriose descritas com maior frequência são septicémia e/ou infeções meníngeas. A infeção neonatal ocorre quando a listeriose atinge grávidas, fetos ou recém-nascidos. A mulher grávida pode contrair listeriose em qualquer momento da gravidez, mas a maioria dos casos é relatada no terceiro trimestre e os sintomas na grávida confundem-se com os de uma síndrome gripal, contudo cerca de 25% dos neonatos com listeriose morrem. No primeiro trimestre, a listeriose pode resultar em aborto espontâneo (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2004). Estas infeções são geralmente devidas ao consumo de alimentos contaminados pela mãe, que depois

transmite a infecção ao feto, ou são transmitidas em ambiente hospitalar após o nascimento. Algumas mulheres grávidas com listeriose podem não apresentar sintomas (ASAE, 2011).

A probabilidade de *L. monocytogenes* invadir o tecido intestinal depende de vários fatores, como a quantidade ingerida, suscetibilidade do hospedeiro e virulência do isolado específico. Estima-se que a dose infecciosa de *L. monocytogenes* varie de  $10^5$  até  $10^9$  ufc/g ou ml de alimento e depende de fatores como o estatuto imunológico do hospedeiro e da estirpe de *L. monocytogenes*. Para os grupos de risco, estima-se que a dose infecciosa seja mais baixa, variando de  $10^1$  a  $10^2$  ufc/g ou ml de alimento (FAO, 2004). As formas de listeriose invasiva ocorrem quando *L. monocytogenes* atravessa a barreira intestinal e é absorvida por células do sistema imunitário, os fagócitos. Uma vez que é capaz de escapar à fagocitose, os fagócitos podem ser o meio pelo qual *L. monocytogenes* é transportada no hospedeiro (FAO, 2004).

Em adultos com idade superior a 65 anos e indivíduos imunodeprimidos, as apresentações clínicas mais comuns são formas invasivas, com septicemia, meningite e meningoencefalite. Podem ocorrer também infecções focais, incluindo artrite séptica, osteomielite e infecção de órgãos torácicos e abdominais, da pele e dos olhos, sendo estas formas, no entanto, menos comuns. Raramente, jovens adultos saudáveis também podem desenvolver formas invasivas de listeriose (FAO, 2004).

As formas não-invasivas manifestam-se em gastroenterite e infecções cutâneas (EURL Lm, 2014). A listeriose em indivíduos não gestantes acontece através do consumo de alimentos contaminados e tem como sintomas típicos febre, fadiga, cefaleia, náuseas, vômitos, cólica abdominal, diarreia, dor articular e mialgias. A manifestação da infecção por *L. monocytogenes* pode ser limitada a estes sintomas em indivíduos saudáveis (FAO, 2004). Os períodos de incubação podem ser longos, desde 2 a 3 semanas até três meses (FAO, 2004).

*L. monocytogenes* também pode causar uma forma de infecção zoonótica designada por listeriose cutânea primária, transmitida através do contacto com animais infetados, sendo sobretudo uma infecção ocupacional (FAO, 2004).

#### **2.3.2.2. Grupos de risco**

Os grupos de população com maior risco de contrair listeriose são os indivíduos imunodeprimidos, grávidas, recém-nascidos, idosos e crianças. A doença foi associada à gravidez e predominantemente associada a indivíduos imunodeprimidos com mais de 60 anos. Segundo a EFSA, as taxas de notificação de listeriose têm vindo a aumentar nos indivíduos com mais de 65 anos (ASAE, 2011).

Com base num estudo realizado no Reino Unido, verificou-se não ser possível determinar causas específicas para o aumento do risco de listeriose nos padrões de compra e consumo em indivíduos com mais de 65 anos (EFSA, 2018). Essencialmente, o facto de serem diagnosticadas mais condições crónicas, como diabetes, artrite, cancro ou doenças cardiovasculares em indivíduos com mais de 65 anos e a toma de, pelo menos, um medicamento com frequência, associado ao enfraquecimento do sistema imunitário leva a que este grupo seja mais suscetível a doenças transmitidas pelos alimentos como a listeriose (CDC, 2013). Além da maior suscetibilidade devido a condições subjacentes, as práticas médicas e os medicamentos são apontados como fatores de risco para a listeriose humana (Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food [ACMSF], 2009). São de especial interesse os tratamentos com inibidores da bomba de prótons, pois pensa-se que influenciam a suscetibilidade a vários agentes patogénicos, como *Campylobacter*, *Salmonella* e *Listeria*. A bomba de prótons aumenta o pH gástrico, estimula a multiplicação da microbiota intestinal, aumenta a translocação bacteriana e altera vários efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios (Bavishi & DuPont, 2011; Bouwknegt, Wilfrid, Kubbinga, Weda & Havelaar, 2014).

### **2.3.2.3. Dados oficiais na União Europeia**

A vigilância da listeriose humana concentra-se em formas invasivas severas de infeção por *L. monocytogenes*, principalmente manifestadas como septicémia, meningite ou aborto espontâneo. A listeriose tem a maior proporção de hospitalização de todas as zoonoses sob vigilância da União Europeia. (EFSA, 2018).

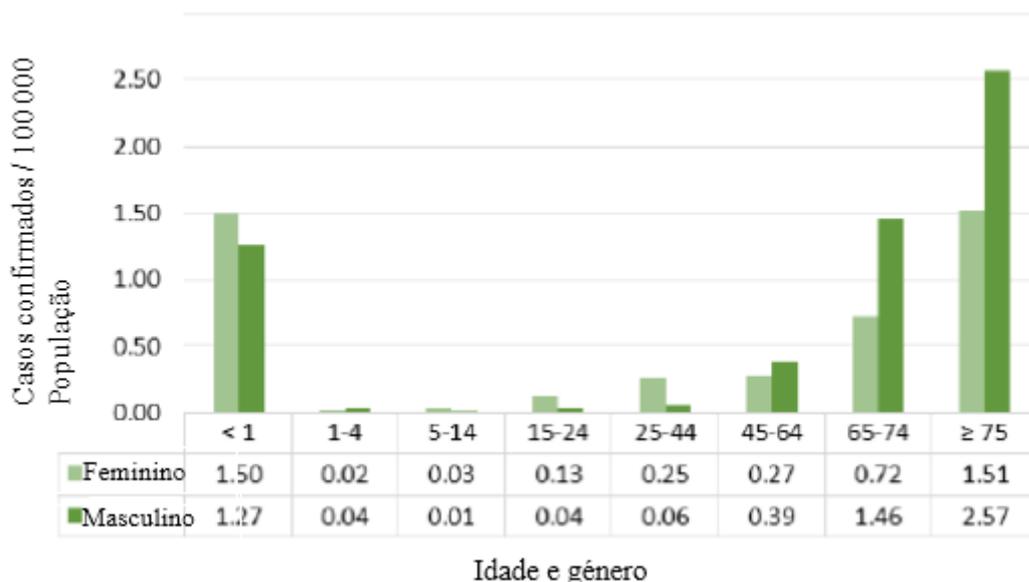
Apesar da aplicação dos novos critérios de segurança dos alimentos para *L. monocytogenes* a partir de 2006, 27 Estados Membros relataram 1763 casos humanos confirmados de listeriose e 191 mortes em 2015. A taxa de notificação da União Europeia foi de 0.44 casos por 100000 habitantes em 2013, o que representou um aumento de 8,6% em relação a 2012 (EFSA, 2018). Em 2014, 2194 casos confirmados de listeriose foram notificados por 28 países da União Europeia, com uma taxa global de 0,6 por 100000 habitantes. A Alemanha e a França apresentaram o maior número de casos relatados (597 e 374, respetivamente), correspondendo a 44,3% de todos os casos relatados. As taxas de incidência mais elevadas foram observadas na Dinamarca (1,5/ 100000), Islândia (1,5/ 100000), Suécia (1,2/ 100000), Finlândia (1,1/ 100000) e Espanha (1,1/ 100000).

A taxa de notificação da listeriose invasiva aumentou entre 2008 e 2015, de 0,30 para 0,46 casos por 100000 habitantes. A taxa de notificação é a estimativa mais próxima de uma taxa de incidência baseada na população na UE. O número de casos relatados aumentou 60% de 1381 casos confirmados em 2008 para 2206 casos em 2015. A maioria dos casos de listeriose são esporádicos e mais de 98% das infeções invasivas de *L. monocytogenes* são adquiridas em casa e em viagens dentro da União Europeia.

Em 2015, foram registadas 270 mortes, o maior número anual de óbitos relatados devido a listeriose desde 2008. A taxa de letalidade geral foi de 17,7% em 2015 (EFSA & ECDC, 2016; EFSA, 2018).

A distribuição por género dos casos confirmados de listeriose confirmados para os quais foi fornecida informação (N = 2193) foi de 54,1% de homens e 45,9% de mulheres nos países da União Europeia, correspondendo a uma proporção de 1,2:1 entre homens e mulheres. Na figura 2 pode verificar-se que os casos confirmados de listeriose em 2015 atingiram maioritariamente indivíduos com idade acima dos 65 anos e crianças com menos de um ano de idade. A taxa para homens foi o dobro daquela para as mulheres na faixa etária dos 65-74 anos em 2015. Na faixa etária dos 65-74 anos, a taxa para os homens foi superior a 140 vezes àquela verificada para os homens na faixa etária dos 5 a 14 anos.

Figura 2 – Número de casos confirmados de listeriose por idade e género na União Europeia em 2015 (ECDC Surveillance Atlas of Infectious Diseases).



#### 2.3.2.4. Distribuição por género e faixa etária

Na tabela 3 pode verificar-se os valores da taxa de fatalidade nas diferentes faixas etárias. A taxa de fatalidade foi significativamente menor no grupo etário das mulheres com idades compreendidas entre 1 e 44 anos. Para as restantes faixas etárias não existem diferenças significativas na taxa de letalidade no que respeita a géneros.

Tabela 3 – Fatalidade por listeriose na União Europeia de 2007 a 2015 (ECDC Surveillance Atlas of Infectious Diseases).

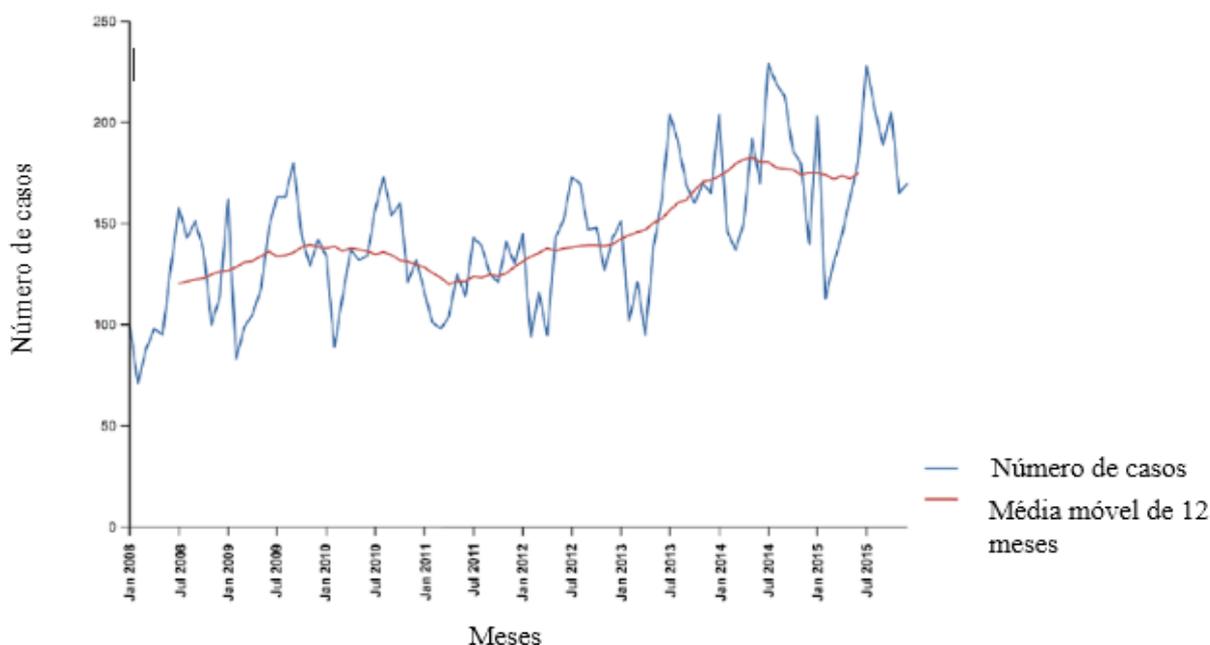
Idade (anos)	Masculino (n=779)		Feminino (n=715)	
	Total	Mortes	Total	Mortes
1 – 44	36	6	105	6
45 - 64	204	47	142	26
65 - 47	219	38	157	37
>75	320	58	311	68

#### 2.3.2.5. Distribuição sazonal

De 2008 até 2015, observou-se um padrão sazonal nos casos de listeriose relatados na União Europeia (Figura 3), tendo-se registado um maior número de casos de doença nos meses de verão. Dezoito Estados-Membros, incluindo pela primeira vez Portugal, forneceram informações sobre casos de listeriose. Na maioria dos casos, houve um aumento de 38% de casos confirmados em 2014 para 44,9% em 2015 (EFSA & ECDC, 2018).

Uma vez que a listeriose é na sua maioria de origem alimentar e associada a produtos prontos a consumir, julga-se que a sazonalidade possa estar relacionada com as temperaturas elevadas dos meses de verão, bem como com um aumento do consumo de produtos prontos a consumir. As oscilações de temperatura a que os produtos tenham sido submetidos no retalho durante descargas, transporte, exposição em loja, etc., podem contribuir para um aumento da sazonalidade dos casos de listeriose (EFSA & ECDC, 2018).

Figura 3 – Casos confirmados de listeriose humana na União Europeia no período de 2008 a 2015 (EFSA & ECDC, 2018).



### 2.3.3. Notificação de listeriose humana

A doença é comunicada pelos Estados-Membros da União Europeia e pelos países do Espaço Económico Europeu em conformidade com a Decisão n.º 1082/2013 sobre ameaças transfronteiriças graves para a saúde, que revoga a Decisão n.º 2119/98 / CE11. Os casos são reportados anualmente ao Sistema Europeu de Vigilância (TESSy) de acordo com a definição de caso da União Europeia para listeriose. Os dados humanos são publicados anualmente nos relatórios de resumo da UE e estão disponíveis no Atlas de vigilância interativo no site do ECDC. Além disso, os relatórios epidemiológicos anuais estão disponíveis no site do ECDC e da EFSA (EFSA, 2018).

O relatório de serogrupos por tipagem por PCR foi introduzido na vigilância a nível da União Europeia em 2012. Entre 2012 e 2015, um número crescente de países passou da serotipagem convencional para o das linhagens baseadas em PCR. Para resolver esta mudança de relatório no conjunto de dados, os serótipos foram agrupados em quatro linhagens seguindo o esquema publicado e aceite:

- 1 / 2a + 3a = IIa;
- 1 / 2b = IIb;
- 1 / 2c + 3c = IIc;
- 4b + 4d, e = IVb.

Os números de casos com serogrupos IIb e IIc foram relativamente baixos, o que não permitiu realizar análises significativas. Os serogrupos IIa e IVb constituíam 87% de todos os serogrupos relatados (EFSA, 2018).

### 2.3.3.1. Doença de declaração obrigatória em Portugal

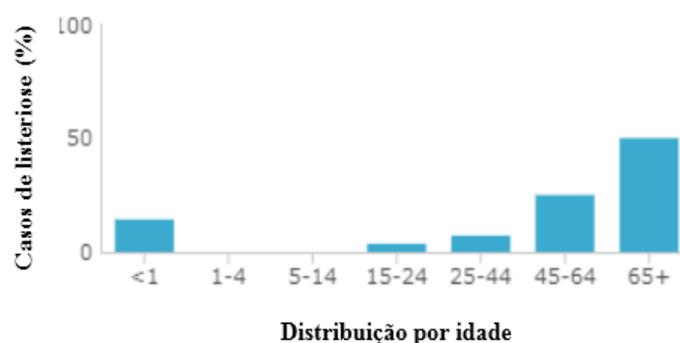
Em Portugal, a listeriose tem sido uma doença de notificação obrigatória desde abril de 2014. Foi realizado um estudo retrospectivo que abrange 90% da população, através do qual se conseguiu chegar à deteção de um surto associado com queijo fresco de 2009 a 2012 (Despacho nº 5681-A de 29 de abril de 2014 sobre doenças de notificação obrigatória).

Em 2015, foram relatados 2206 casos humanos confirmados de listeriose. Portugal relatou listeriose pela primeira vez em 2015. A taxa de notificação da União Europeia em 2015 foi de 0,46 casos por 100000 habitantes, muito semelhante aos números de 2013 e 2014. As maiores taxas de notificação foram observadas em Espanha, Malta, Suécia, Estónia e Finlândia: 0,99, 0,93, 0,90, 0,84 e 0,84 casos por 100000 habitantes, respetivamente. Espanha melhorou o sistema de vigilância para a listeriose em 2015, o que resultou em um aumento de casos confirmados em 36,5%. As taxas mais baixas foram notificadas pela Bulgária, Croácia e Roménia (<0.1 por 100000 indivíduos). Chipre e Luxemburgo relataram zero casos.

Na União Europeia, a vigilância da listeriose humana invasiva foi estabelecida em 2008 e, desde então, os países melhoraram os seus sistemas nacionais de vigilância.

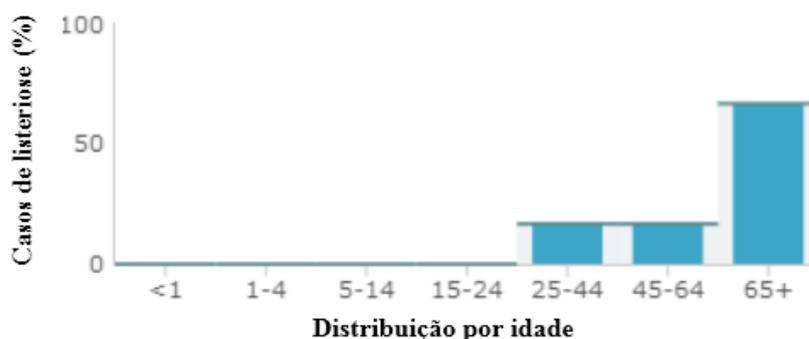
Em 2015, dos casos de listeriose reportados, em Portugal 28 foram confirmados e 6 foram letais. Na figura 4 pode verificar-se que, dos casos reportados, há maior incidência em indivíduos com mais de 45 anos e com menos de um ano de vida.

Figura 4 – Distribuição por idade dos casos de listeriose reportados em Portugal em 2015 (ECDC Surveillance Atlas of Infectious Diseases).



Na figura 5 é possível verificar que os casos letais de listeriose ocorreram principalmente em pessoas com idade superior a 65 anos.

Figura 5 – Distribuição por idade dos casos letais de listeriose reportada em Portugal em 2015 (ECDC Surveillance Atlas of Infectious Diseases).



#### 2.4. *Listeria monocytogenes* nos alimentos

De acordo com o Regulamento (CE) n.º 2073/2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, alimentos prontos para consumo são alimentos destinados pelo produtor ou fabricante ao consumo humano direto, sem necessidade de cozedura ou outra transformação, eficazes para eliminar ou reduzir para um nível aceitável os microrganismos patogénicos.

Este regulamento define que nos alimentos prontos para consumo suscetíveis de permitir o desenvolvimento de *L. monocytogenes*, que se encontram sob o controlo do operador, que se efetue a pesquisa de *L. monocytogenes* (ISO 11290-1:1996) e que para produtos colocados no mercado, durante o seu período de vida útil, se aplique o método de contagem de *L. monocytogenes* (ISO 11290-2:1996). É de referir que o mesmo regulamento permite a utilização de outros métodos validados, que sejam considerados equivalentes (ASAE, 2011).

Os critérios utilizados para estabelecer um alimento como suscetível de permitir o desenvolvimento de *L. monocytogenes* são o  $\text{pH} > 4,4$  ou uma atividade da água  $a_w > 0,92$  ou, simultaneamente,  $\text{pH} > 5,0$  e  $a_w > 0,94$  (Comissão Europeia, 2005).

Nos limites estabelecidos no Regulamento (CE) n.º 2073/2005 para os produtos prontos para consumo, *L. monocytogenes* não deve estar presente em 25 g de amostra enquanto estiver dentro das instalações do produtor e não deve existir em quantidade superior a 100 ufc/g durante a vida útil já no mercado.

Os alimentos prontos para consumo são na maioria das vezes conservados durante longos períodos em refrigeração. Uma vez que *L. monocytogenes* consegue multiplicar-se a

temperaturas de refrigeração, a sua presença nos alimentos prontos para consumo é particularmente importante, uma vez que a cadeia de frio não impede o seu desenvolvimento. (Chan *et al.*, 2007; ASAE, 2011).

Tendo em conta que este tipo de géneros alimentícios não necessita de tratamento térmico antes de ser consumido, constitui a categoria de alimentos mais perigosos para o consumidor, considerando a ocorrência de *L. monocytogenes*.

É possível encontrar *L. monocytogenes* numa grande variedade de alimentos frescos e processados, tais como produtos lácteos, produtos de charcutaria, carne de vaca e porco, produtos da pesca, produtos prontos a consumir, independentemente da sua apresentação, pré-cozinhados, frescos, congelados ou fumados (Comissão Europeia, 2010).

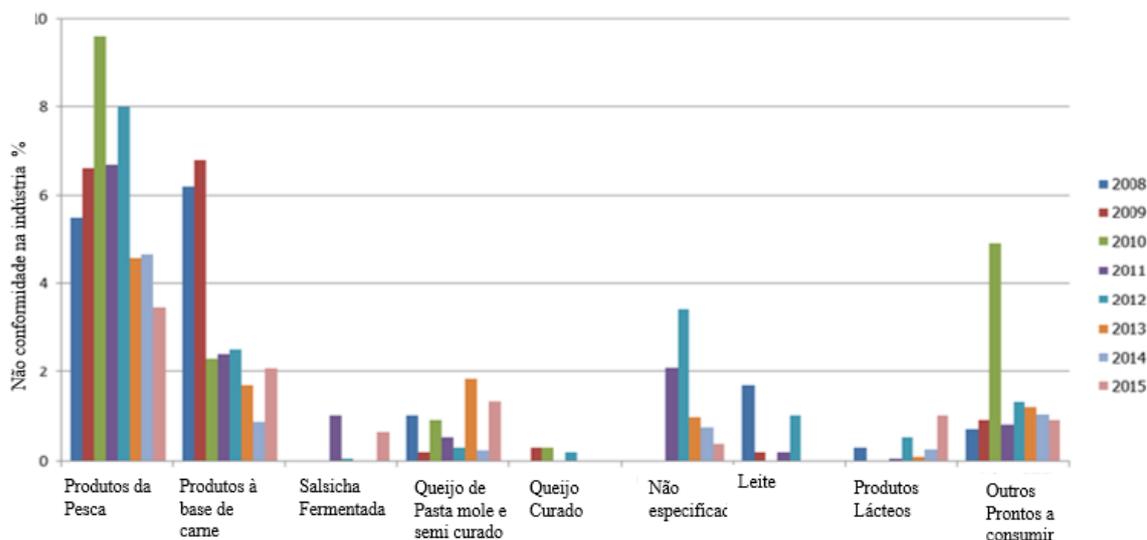
Em Portugal em 2010-2011, foi conduzido um programa coordenado de vigilância para avaliar a prevalência de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo selecionados aleatoriamente no comércio retalhista. Esses alimentos pertenciam às categorias de a) peixe fumado embalado (não congelado), b) queijo de pasta mole ou semicurado, excluindo queijo fresco, c) produtos embalados à base de carne tratados termicamente (Comissão Europeia, 2010).

De acordo com a EFSA e o ECDC, em Portugal as taxas mais elevadas de incumprimento dos critérios de *L. monocytogenes* registaram-se em queijo, produtos da pesca e produtos à base de carne tratados termicamente.

Com base num estudo realizado em indústrias produtoras de alimentos e estabelecimentos retalhistas, na União Europeia, foi possível verificar o incumprimento das diferentes subcategorias de alimentos prontos a consumir com *L. monocytogenes* em 2008-2015. Os resultados não conformes são apresentados nas Figura 4 e 5. A análise de dados foi realizada pela EFSA, que utilizou mais de 2200 amostras recolhidas no retalho (incluindo hospitais e lares) e em ambientes de processamento (indústrias alimentares).

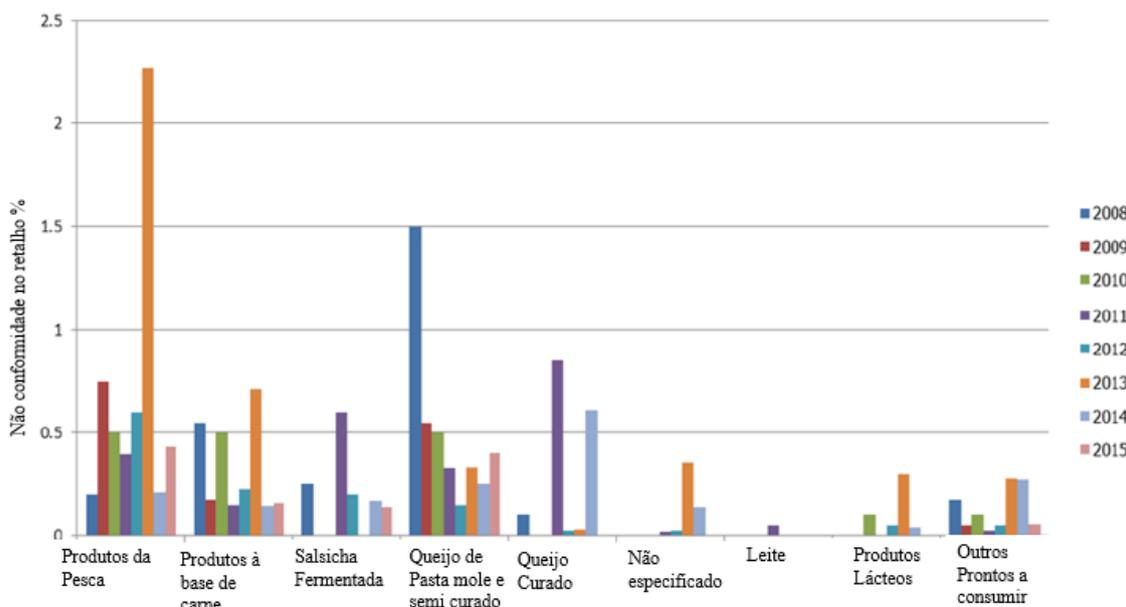
Na Figura 6, pode verificar-se que de 2008 a 2010 em unidades produtoras de processamento de alimentos, os produtos da pesca prontos a consumir eram a categoria de alimentos com o maior nível de incumprimento. Seguiram-se os produtos prontos a consumir à base de carne com um nível de incumprimento que variou de 0,9% a 6,8% e os queijos de pasta mole e semicurado (0,2-1,8%) e queijo curado (0-0,3%).

Figura 6 – Percentagem da não conformidade de amostras recolhidas em fábricas produtoras de alimentos, 2008 – 2015 (EFSA, 2018).



Considerando as amostras recolhidas no retalho, os produtos da pesca prontos a consumir apresentaram a maior percentagem de não conformidade em 2013. Seguiram-se os queijos de pasta mole e semicurados com um nível de incumprimento inferior a 0,6%, exceto em 2008 (1,5%). Para o queijo curado, o nível de incumprimento foi inferior a 0,3%, exceto em 2011 (0,9%) e 2014 (0,6%).

Figura 7 – Percentagem da não conformidade de amostras recolhidas no retalho, 2008 – 2015 (EFSA, 2018).



#### **2.4.1. Contaminação dos alimentos por *L. monocytogenes***

*L. monocytogenes* é um microrganismo ubiqüitário e amplamente distribuído no ambiente. Os seus reservatórios principais são o meio ambiente onde está presente no solo, água, plantas e nos animais. Os produtos alimentares e o Homem são também reservatórios de *L. monocytogenes*. Ao longo das últimas décadas *L. monocytogenes* tem sido isolada de uma grande variedade de ambientes, como campos de cultivo, águas residuais, pântanos, canais de rega, efluentes, animais e fezes humanas (Alvarez-Ordóñez, Leong, Hickey, Beaufort & Jordan, 2015).

A indústria alimentar tem vários vetores de contaminação, nomeadamente alimentos de origem animal crus ou transformados, alimentos de origem vegetal crus e os manipuladores, quer enquanto portadores-sãos, quer através da roupa e sapatos (Osaili, Alaboudi & Nesiari, 2011). Uma vez no interior de um estabelecimento alimentar, *L. monocytogenes* é capaz de aderir a vários tipos de superfície como poliéster, aço inoxidável e vidro. Assim que instalada, a sua multiplicação é favorecida por ambientes com elevada humidade e onde existam resíduos de alimentos (Orsi, den Bakker & Wiedmann, 2011).

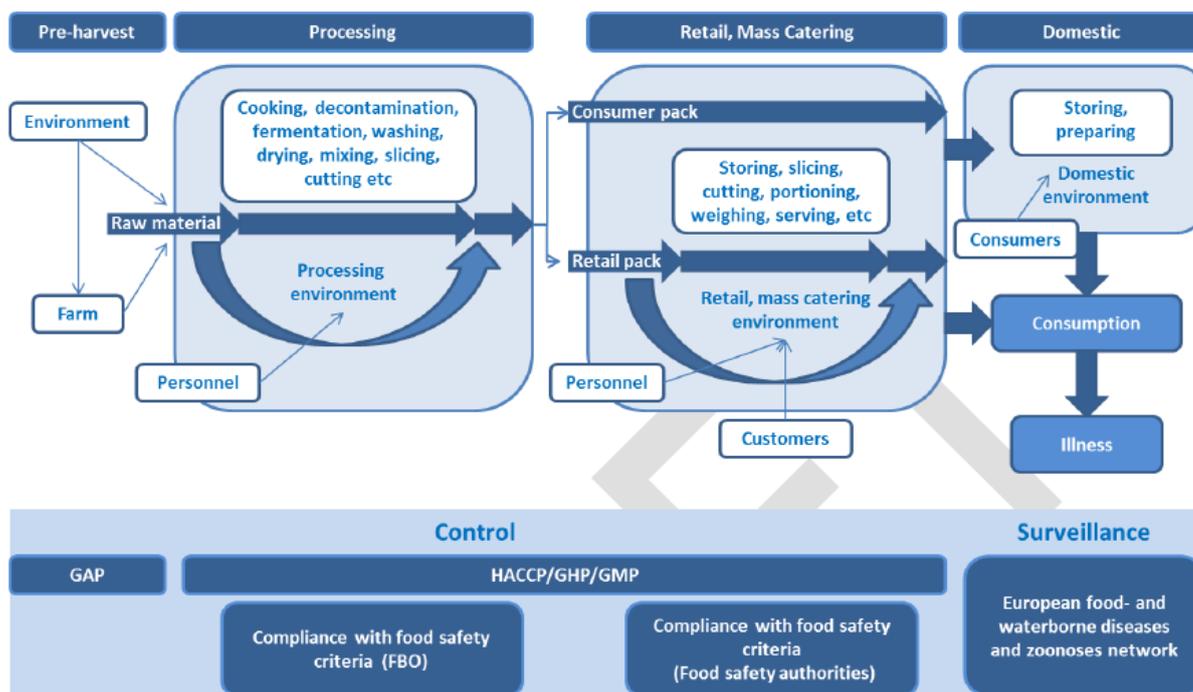
*L. monocytogenes* tem a capacidade de aderir, crescer e formar biofilmes nas superfícies de preparação de alimentos. O tipo de superfície, quantidade de nutrientes disponíveis, a presença de outros microrganismos, humidade e corrosão da respetiva superfície condicionam a formação do biofilme (Iranzo *et al.*, 2015).

Muitas vezes os alimentos são contaminados após o processamento e *L. monocytogenes* permanece e multiplica-se nos mesmos durante a vida útil, constituindo um perigo potencial para o consumidor.

Na figura 8, podem observar-se vários cenários possíveis relativos à contaminação por *L. monocytogenes* desde a produção primária até ao consumidor final. O ambiente, indivíduos e materiais crus são as fontes principais de contaminação que devem ser consideradas durante o processamento de alimentos prontos a consumir.

Tanto a contaminação da matéria-prima como a contaminação cruzada durante o processamento dos alimentos podem afetar a ocorrência e a concentração de *L. monocytogenes* no produto final. No que diz respeito à exposição dos consumidores, a contaminação de matérias-primas pode ser crítica quando ocorre produção de alimentos transformados e as condições de processamento não são suficientes para reduzir ou eliminar a bactéria do produto final (EFSA, 2018).

Figura 8: Visão geral esquemática das vias de transmissão e do sistema de controlo de *Listeria monocytogenes* na cadeia alimentar dos alimentos prontos a consumir (EFSA, 2018).



Consideram-se fatores de risco associados à contaminação de alimentos prontos a consumir, por *L. monocytogenes*:

- no ambiente de processamento: ausência de sistemas Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) bem implementados, educação e formação de manipuladores de alimentos, programas de limpeza e desinfecção validados, monitorização de superfícies de contato com alimentos;
- nas práticas de fabrico e preparação: tipo de processo, exposição à recontaminação após um tratamento letal;
- nas características do produto: pH,  $a_w$ , sal, conservantes, tipo de embalagem;
- nas condições de armazenamento: tempo e temperatura (EFSA, 2018).

As categorias de alimentos prontos a consumir geralmente associadas à listeriose humana continuam a ter um impacto significativo na saúde pública. Além disso, os alimentos de origem vegetal ou mesmo alimentos congelados foram também causadores de surtos, como foi o caso do melão, maçãs e gelados. Assim sendo, quase todos os alimentos prontos a consumir sob certas condições podem assegurar a multiplicação de *L. monocytogenes*, levando a que, quando consumidos por indivíduos altamente suscetíveis, exista grande potencial para o desenvolvimento da doença (Iranzo *et al.*, 2015; EFSA, 2018).

#### 2.4.2. Sobrevivência no ambiente fabril

*L. monocytogenes* é um microrganismo bastante resistente a diversas condições ambientais quando comparada com muitas outras bactérias transmitidas por alimentos, o que lhe permite sobreviver durante mais tempo em condições adversas. Pode multiplicar-se até alcançar elevadas concentrações, mesmo a temperaturas de refrigeração habituais na grande maioria dos ambientes de produção de alimentos (Iranzo *et al.*, 2015)..

Como saprófita, *L. monocytogenes* coloniza superfícies que contactam com alimentos e ambientes de processamento. Uma vez instalada, *L. monocytogenes* é difícil de erradicar.

Tendo colonizado um ambiente de produção de alimentos, *L. monocytogenes* pode espalhar-se por toda a instalação através de aerossóis, pessoal, fluxos de trabalho, de alimentos e materiais de contato contaminados, o que acaba por levar a uma persistência da bactéria nas instalações, se os procedimentos de higienização forem ineficazes. Geralmente, os ambientes de produção de alimentos exibem uma multiplicidade de compartimentos, alguns dos quais com design inadequado, o que dificulta a eficácia de higienização. O problema é desencadeado também por outros fatores, como a adaptação do serótipo ao ambiente e consequente formação de biofilmes que levam à persistência da bactéria (Carpentier & Cerf, 2011; EFSA, 2018).

*L. monocytogenes* pode persistir durante meses, ou mesmo anos, em vários ambientes de produção de alimentos, incluindo ambientes com baixas temperaturas. A persistência pode também dever-se à capacidade de adaptação de *L. monocytogenes* a fatores físico-químicos e devido a outros determinantes genéticos que aumentam a capacidade de sobrevivência. (Schmitz-Esser, Muller, Stessl & Wagner, 2015)

Existe alguma evidência de que alguns serótipos persistentes podem subsistir mesmo em meios ácidos. O sistema de resposta à tolerância ácida permite a sobrevivência de *L. monocytogenes* a baixos valores de pH, nomeadamente até 5,5, algumas células bacterianas também podem adaptar-se ao stress ácido severo com pH de 3,5 (Di Ciccio *et al.*, 2015).

*L. monocytogenes* também está adaptada ao stress osmótico, particularmente a altas concentrações de sal. A adaptação ao frio é uma característica particular de *L. monocytogenes*, muitas vezes associada à tolerância ao stress osmótico (Cabanés, Sousa & Cossart, 2011).

A persistência de *L. monocytogenes* em ambientes de processamento de alimentos é considerada a principal fonte de contaminação dos alimentos prontos a consumir. Esta persistência pode ser causada por condições ambientais, nomeadamente:

- a) Sobrevivência à desinfeção, a desinfeção não é 100% eficaz e sobrevivem sempre algumas células;

- b) Uso de concentrações subletais do desinfetante que acontece quando se desinfeta através de spray ou pulverização sobre superfícies molhadas pode ocorrer em alguns locais diluição do desinfetante, o que reduz a sua concentração a valores subletais.
- c) Ocorrência de zonas de refúgio: existem zonas onde os procedimentos de higienização não conseguem ser eficazes, porque os produtos utilizados não penetram ou não chegam ou porque não é possível exercer ação mecânica nessas zonas, como em fissuras, poros, juntas, zonas pouco acessíveis e inacessíveis. Estas zonas de refúgio permitem a sobrevivência, proliferação e adesão às superfícies e a consequente formação de biofilmes.
- d) Formação de biofilmes (Iranzo *et al.*, 2015; Carpentier, 2011).

#### **2.4.2.1 Biofilmes**

Os biofilmes são constituídos por bactérias protegidas por uma matriz gelatinosa e adesiva, de natureza polimérica, gerada pelos próprios microrganismos e composta por uma mistura de proteínas, polissacáridos, lípidos e ácidos nucleicos. Esta matriz pode também conter outros materiais não celulares procedentes do meio em que o biofilme cresceu, como resíduos orgânicos que permitem ao biofilme aderir a diferentes superfícies (Donlan & Costerton, 2002). A matriz extracelular é constituída por polissacáridos, proteínas, lípidos, minerais e DNA de origem microbiológica e representa 75% a 95% do volume de um biofilme maduro (Iranzo *et al.*, 2015).

É possível que se formem biofilmes numa ampla variedade de superfícies, incluindo tecidos vivos. Para que seja possível ocorrer formação de biofilmes é necessário que as superfícies estejam em contacto com um fluido que contenha minerais e moléculas orgânicas, bem como microrganismos. A maioria das bactérias possui a capacidade de aderir a superfícies e dar arranque a um processo sequencial que conduz à formação de um biofilme (Donlan & Costerton, 2002).

A formação de biofilmes depende principalmente da interação das células bacterianas com a superfície de fixação e com o ambiente envolvente. A fixação das bactérias a uma superfície é um processo físico-químico determinado por forças electrostáticas entre as células e a superfície. Os fatores que determinam o desenvolvimento de um biofilme são:

- a) O meio: composição, temperatura, presença ou não de biocidas;
- b) Microrganismos: Identidades e população;

- c) Hidrodinâmica: Velocidade de fluxo, presença de forças de cisalhamento, tempo de retenção;
- d) Substrato: Rugosidade, química da superfície, pré-acondicionamento (Iranzo, *et al.*, 2015; Ortiz, López & Martínez-Suárez, 2014).

O facto de existirem bactérias com flagelos na superfície externa faz com que estas fiquem favorecidas na capacidade para formar biofilmes. As bactérias flageladas apresentam uma maior mobilidade, que pode ser necessária para se aproximarem das superfícies ultrapassando as forças de repulsão que possam existir, por exemplo, no caso de fluidos em repouso. Esta vantagem na mobilidade também permite à bactéria deslocar-se ao longo da superfície, facilitando a expansão do biofilme em desenvolvimento (Nguyen & Burrows, 2014).

A maioria das bactérias produzem polissacarídeos extracelulares que formam uma camada em torno das células conhecida como glicocálix. Este metabolito contém componentes adicionais, como ácidos nucleicos, proteínas, glicoproteínas e lipoproteínas e é um componente importante na matriz extracelular, característica de muitos biofilmes (Nguyen & Burrows, 2014; Ortiz, López & Martínez-Suárez, 2014).

As diferentes propriedades das superfícies de fixação como rugosidade da superfície, hidrofobicidade, facilidade em ser higienizada, resistência ao desgaste, são fatores importantes na formação de biofilmes sobre as mesmas. Dentro de um biofilme as bactérias podem multiplicar-se em modo protegido e sobreviver às mudanças nas condições do meio, agentes químicos agressivos ou agentes físicos, predadores, antibióticos, aditivos antimicrobianos e agentes desinfetantes. As principais vantagens para o desenvolvimento das bactérias num biofilme são:

- a) Proteção contra agentes antimicrobianos;
- b) Aumento da disponibilidade de nutrientes para crescimento;
- c) Aumento da ligação às moléculas de água, reduzindo a desidratação;
- d) Proximidade a outras bactérias facilitando a transferência de plasmídeos.

Estes fatores que permitem a multiplicação bacteriana em modo protegido são os mesmos fatores que influenciam a resistência a agentes biocidas e que assumem um grande impacto na eficácia da higienização (Doijad *et al.*, 2015).

A formação de biofilmes na indústria alimentar representa um perigo potencial, uma vez que podem funcionar como uma fonte persistente de contaminação microbiana, contribuindo para a transmissão de doenças (Iranzo *et al.*, 2015).

*Listeria monocytogenes* dispõe de mecanismos que lhe permitem a sobrevivência em condições ambientais adversas, podendo gerar contaminações persistentes se os procedimentos de higienização não forem aplicados de forma adequada (Allen *et al.*, 2016; Iranzo *et al.*, 2015). O aparecimento de estirpes persistentes de *L. monocytogenes* numa indústria em particular, pode não estar associada a fenómenos de evolução da bactéria para formas mais resistentes aos biocidas utilizados. A contaminação persistente pode dever-se às operações de desinfecção que não eliminam completamente as células bacterianas presentes, ou porque estas operações não se realizam de forma adequada, levando a que sobreviva um número viável de células capazes de se reproduzir, ou porque a bactéria adota um modo de multiplicação protegida na forma de biofilme. No entanto, aquando a identificação de estirpes persistentes é necessário rever e os protocolos e procedimentos de higienização nas instalações. A identificação de locais de difícil acesso aos desinfetantes, aplicação de tempos de contacto especificados e a avaliação de possíveis fontes de multiplicação bacteriana são pontos a considerar (Allen *et al.*, 2016; Iranzo *et al.*, 2015).

#### **2.4.2.2. Resistência a biocidas**

A higienização das instalações de fábricas produtoras de alimentos faz-se através da aplicação de biocidas nas superfícies que contactam com os alimentos. Os compostos ativos dos biocidas apresentam diferentes mecanismos de ação sobre as bactérias, em função da sua estrutura química, afetando diferentes componentes da estrutura celular (Gaulin, Le, Shum & Fong, 2011).

Na tabela 4 apresentam-se as substâncias ativas biocidas mais utilizadas nos processos de higienização.

Tabela 4 – Substâncias ativas biocidas utilizadas na indústria alimentar e mecanismos de ação (Iranzo *et al.*, 2015).

Substância actina	Alvo	Mecanismo de ação
Glutaraldeído	Parede celular, membrana externa	Dano da membrana e interferência no metabolismo
Quarternários amónio	de Membrana citoplasmática	Danos na bi-camada fosfolipídica da membrana citoplasmática
Halogénios	Componentes celulares	Inibição da síntese de DNA, oxidação dos grupos tiol em enzimas e proteínas
Peróxido hidrogénio	de Componentes celulares	Rotura das cadeias de DNA, oxidação dos grupos tiol em enzimas e proteínas
Ácido peracético	Componentes celulares	Degradação dos grupos tiol em enzimas e proteínas
Biguanidas poliméricas	Membranas externas, citoplasma e membrana citoplasmática	Libertação de lipossacarídeos da membrana externa, extração de iões potássio do citoplasma
Álcoois	Membrana celular e proteínas	Degradação da membrana celular, interferência com o metabolismo celular e lise celular

Os microrganismos podem apresentar resistência e tolerância aos desinfetantes utilizados para a sua eliminação. Apesar de terem diferentes significados quanto às implicações para o microrganismo ambos os termos são frequentemente confundidos. O termo “resistência” traduz a capacidade da bactéria para sobreviver à exposição a um biocida letal para o resto da população, enquanto “tolerância” representa a inibição não letal do microrganismo (Iranzo *et al.*, 2015).

A tolerância a um desinfetante está associada à adaptação ao mesmo. Esta adaptação é evidente quando é necessário aumentar a concentração mínima inibitória de um produto. Relativamente à resistência ao desinfetante, este tem, geralmente, um fundo genético que se expressa fenotipicamente por mecanismos bioquímicos. Esta alteração pode ser uma propriedade intrínseca do organismo ou pode ser adquirida por mutação ou aquisição de fragmentos de DNA cromossómicos ou extra-cromossómicos (Ortega-Morente *et al.*, 2013; Iranzo *et al.*, 2015).

É consensual que alguns serótipos de *L. monocytogenes* toleram maiores concentrações de desinfetantes.

Vários estudos demonstram que a eficácia antimicrobiana dos desinfetantes habitualmente utilizados na indústria alimentar diminui no caso das bactérias se encontrarem no interior de

biofilmes. Sabe-se que são necessárias concentrações até 1000ppm de cloro para reduzir de forma significativa a população bacteriana nos biofilmes multi-espécies, em comparação com 10ppm no caso de células planctónicas. Outros estudos comprovam a presença de bactérias em soluções desinfetantes, associada à presença de biofilmes nas paredes interiores dos recipientes e da solução biocida.

O aumento da resistência a biocidas está associado ao desenvolvimento e à estrutura do biofilme. Assim, uma maior resistência ocorre em biofilmes maduros com uma estrutura complexa (Iranzo *et al.*, 2015).

A maior resistência aos desinfetantes atribui-se a diferentes mecanismos, como:

- Difusão lenta ou incompleta do biocida no interior do biofilme;
- Diferente fisiologia das células no biofilmes;
- Expressão de respostas de adaptação de stress por parte de algumas células;
- Diferenciação de uma pequena subpopulação de células persistentes.

A maior resistência das bactérias no biofilme aos desinfetantes explica-se também pelo facto de algumas células se encontrarem num estado de multiplicação lenta, devido à limitação de nutrientes. Este tipo de células em estado de multiplicação lenta ou nula são menos suscetíveis à ação do biocida, pois assimilam substâncias biocidas de forma mais lenta (Iranzo *et al.*, 2015).

## **2.5. Prevenção e controlo**

A prevenção de *Listeria* na indústria deve ser baseada em todos os fatores que podem influenciar a sua multiplicação e sobrevivência no interior da mesma. *Listeria monocytogenes* é uma bactéria ubíqua, está largamente distribuída no meio ambiente e é encontrada dentro da indústria quando as fontes principais através de contaminações cruzadas entram dentro das zonas de produção. *L. monocytogenes* esta presente em matérias-primas não processadas como o leite, carne, peixe, por isso é tão difícil evitar a sua entrada nas instalações. Constantemente entram nas empresas estirpes de *Listeria monocytogenes* que deveriam ser eliminadas pelos processos térmicos, químicos e de higienização habituais. No entanto, determinadas estirpes devido a vários factores sobrevivem a estes processos e posteriormente podem colonizar as instalações e permanecer durante largos períodos de tempo, acabando por contaminar os produtos processados (Allen *et al.*, 2016).

É necessário estabelecer medidas que dificultem as contaminações cruzadas, diminuindo a quantidade de células viáveis presentes nas áreas de produção. Portanto é crucial a sua deteção assim como a implementação de medidas adequadas de eliminação. Para tal, devem aplicar-se

medidas de carácter estrutural e procedimentos de higienização eficazes e adequados (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

O plano de higienização das instalações e dos equipamentos é muito importante para evitar a acumulação de microrganismos. No entanto, a complexidade dos processos de produção e a sua automatização requerem equipamentos sofisticados e dotados de áreas com acesso difícil, que por vezes, impedem ou dificultam a eficácia da higienização. É possível encontrar fábricas com rigorosos procedimentos de limpeza e desinfecção com áreas específicas e equipamentos com carácter persistente e níveis microbiológicos inadequados.

Além da importância do plano de higienização, o plano de manutenção de equipamentos e instalações é também importante no controlo de *L. monocytogenes*. É muito importante manter em bom estado os pisos, paredes e outras áreas das instalações e equipamentos que possam apresentar fissuras, de forma a que não possam servir de reservatórios a *Listeria monocytogenes* (Allen *et al.*, 2016).

Apesar de o ar ainda não ter sido identificado com fonte de *L. monocytogenes* em alimentos, esta pode permanecer em aerossóis que geralmente se geram nas salas de trabalho, ou no ar que entra em contacto com as gotículas de condensação no teto.

É comum a presença de microrganismos nos aerossóis, pelo que o risco de contaminação é elevado. Os aerossóis podem ter origem a partir de muitas fontes, incluindo matérias-primas, pessoal e equipamentos em rotação ou movimento. As operações de higienização podem ser a principal fonte de aerossóis que transportam microrganismos (Iranzo *et al.*, 2015). Na maioria das unidades de produção, as superfícies que entram em contacto com os alimentos são higienizadas diariamente, no entanto, muitas outras superfícies como o interior de proteção de motores, estruturas elevadas, paredes e tetos não têm um plano de limpeza diário. Nessas áreas, a presença de nutrientes e humidade criam um ambiente propício ao desenvolvimento de biofilmes. Os aerossóis gerados durante os processos de limpeza, assim como o uso indiscriminado de água com pressão que liberta estes biofilmes das zonas contaminadas são, frequentemente a principal fonte de dispersão de *Listeria monocytogenes* (Iranzo *et al.*, 2015). Reduções da pressão da água ou alterações no ângulo de impacto com as superfícies auxiliam a reduzir o nível de dispersão (Iranzo *et al.*, 2015).

As contaminações cruzadas causadas por aerossóis e salpicos ocorrem normalmente pela higienização numa zona da sala de trabalho, enquanto noutros equipamentos estão a produzir alimentos. Outras vezes, a contaminação cruzada deve-se à presença do aerossol no ambiente, depois de realizadas as tarefas de desinfecção e enxaguamento os microrganismos presentes no ambiente depositam-se durante várias horas sobre a superfície dos equipamentos de produção e podem proliferar se encontram estes equipamentos molhados. O melhor método para reduzir

a contaminação cruzada a partir do ambiente passa por limitar a formação de aerossóis. Logo que as partículas se encontrem no ambiente é difícil controlar os seus movimentos, que são regidos por vários mecanismos, como correntes de ar, dispersão, força da gravidade ou convecção térmica (Iranzo *et al.*, 2015).

A implementação de equipamentos adequados de ventilação e refrigeração pode impedir que essas partículas sejam fontes de contaminação.

O ar que entra nas salas de processamento de produção de produtos prontos para consumo deve passar por filtros microbiológicos e proceder de áreas que não apresentem risco de contaminação. Deve evitar-se a circulação de ar de zonas de baixo risco ou zonas sujas para outras de elevado risco, por isso em salas de alto risco ou salas limpas a pressão do ar deve ser positiva para o exterior.

O ar comprimido utilizado nos equipamentos também deverá ser mantido adequadamente, evitando a presença de água e de humidade nos equipamentos de pressão (Iranzo *et al.*, 2015).

Os lubrificantes utilizados nos equipamentos a fim de reduzir o atrito e o desgaste das peças, melhorar o funcionamento dos equipamentos podem uma fonte de contaminação. Normalmente os utilizados na indústria são formulações de óleos e emulsões que contêm água. Estes produtos podem ser contaminados por água, matéria orgânica, resíduos de outros lubrificantes, substâncias físicas e químicas, partículas de óxido e microrganismos. Assim por exemplo, é habitual a presença de *Listeria monocytogenes* nas acumulações de lubrificante nos eixos dos rolamentos das máquinas de evisceração em matadouros de aves (Iranzo *et al.*, 2015; Lahou, Jacxsens, Verbunt & Uyttendaele, 2015).

Foi estudado a sobrevivência de *Listeria monocytogenes* em lubrificantes utilizados em equipamentos na indústria, tendo sido inoculada a bactéria nos lubrificantes e quantificado ao fim de 14 dias. O teor de *Listeria monocytogenes* aumentou em alguns tipos de lubrificantes. De forma a evitar esta contaminação, é possível adicionar substâncias antimicrobianas, como glutaraldeído na dose de 25 partes por milhão (Iranzo *et al.*, 2015).

É necessário utilizar boas práticas de uso a fim de evitar contaminações nocivas nos lubrificantes que possam posteriormente passar para os equipamentos. Assim deve-se evitar a presença de água nos lubrificantes, mudar periodicamente o lubrificante para evitar que fique excessivamente sujo e por fim limpar as superfícies antes de adicionar uma nova aplicação de lubrificantes (Lahou, Jacxsens, Verbunt & Uyttendaele, 2015; Iranzo *et al.*, 2015).

Além da importância do plano de higienização, o plano de manutenção de equipamentos e instalações, o controlo de matérias-primas e processos assim como o controlo de biofilmes é também importante no controlo e combate a *L. monocytogenes*.

O controlo eficaz da contaminação por biofilmes requer que os protocolos de higienização incluam medidas destinadas a detetar a sua presença e monitorizar superfícies para confirmar a ausência de biofilmes, assim como a utilização de produtos adequados para prevenir a formação de biofilmes e eliminar os que já se formaram.

A presença de *Listeria monocytogenes* no produto final tem na sua origem vários factores, no entanto em grande número de casos a origem principal é a matéria-prima utilizada no processo de produção. Devido a este facto a indústria alimentar deve dispor de um sistema de avaliação de fornecedores que garanta que as suas matérias-primas e material de embalagem cumpram as condições necessárias para garantir a segurança dos alimentos.

Em condições normais de limpeza e desinfeção os biofilmes que podem estar presentes nas superfícies são indetetáveis a olho nu, devido ao seu tamanho microscópico.

Os biofilmes aparecem com mais frequência nos pontos com difícil acesso, onde não é possível exercer acção mecânica e onde os produtos químicos não chegam (zonas altas, cantos, curvas). Os biofilmes também se formam nas fissuras, riscos ou cavidades das superfícies (Iranzo *et al.*, 2015).

A aplicação dos detergentes e desinfetantes sobre as superfícies através de espuma com mangueira ou bicos nem sempre é suficiente para atingir os níveis desejados de higiene. Este processo não é muito eficaz para remoção da sujidade mais incrustada, assim como remoção dos biofilmes que a possam acompanhar.

A eliminação de biofilmes realiza-se geralmente através da aplicação de produtos de natureza enzimática juntamente com acção mecânica exercida nas superfícies. Estes produtos de natureza enzimática contêm na sua composição diferentes tipos de enzimas, como lipases, proteases e glicases que atuam sobre a matriz do biofilme, produzindo a sua degradação.

Quando se deteta a presença de *Listeria monocytogenes* no produto final, devem desencadear-se ações específicas para o seu controlo, que resumidamente são:

- a) Revisão das práticas de manipulação dos trabalhadores de produção, com o objetivo de verificar más práticas de higiene que possam provocar contaminações cruzadas;
- b) Revisão dos procedimentos de higienização, realizados pelos trabalhadores, a fim de verificar a sua eficácia e se correspondem ao estabelecido;
- c) Inspeção e verificação das instalações, a fim de determinar zonas problemáticas, definidas como aquelas que devido às suas características de desenho, materiais e forma, podem converter-se em reservatórios de *L. monocytogenes* e favorecer a sua persistência na fábrica;
- d) Implementação de um plano de higienização para eliminar a presença da bactéria.

O controlo da presença de microrganismos patogénicos na indústria inclui diversas estratégias destinadas a prevenir e eliminar este tipo de contaminação em matérias-primas, alimentos, equipamentos e instalações. Estas medidas são contempladas no programa de HACCP, mas é necessário conhecer em profundidade tanto as condições de acumulação de contaminação microbiológica e química como as medidas disponíveis para a sua prevenção, deteção e eliminação.

Além de todos os pontos acima mencionados, a aplicação consistente de boas práticas de fabrico em combinação com sistema HACCP bem implementado são a chave para minimizar a contaminação inicial no nível de fabricação ou para reduzir a multiplicação de *L. monocytogenes* (Iranzo *et al.*, 2015).

Segundo o *Codex alimentarius*, os princípios gerais de higiene dos alimentos englobam as práticas de higiene desde a produção primária até ao consumidor final. O objetivo que persegue a aplicação destes princípios é que os alimentos são inócuos e devem-se aplicar critérios baseados no sistema HACCP para garantir a segurança dos alimentos. As indústrias devem aplicar os princípios gerais de higiene para produzirem alimentos seguros e aptos para consumo, de modo a proteger os alimentos da contaminação, desenvolvimento e sobrevivência de agentes patogénicos, armazenando-os e preparando-os corretamente, e assim manter a confiança nos alimentos colocados no mercado (Iranzo *et al.*, 2015).

A prevenção passa também pelos consumidores após a aquisição dos produtos, através da manutenção da integridade da cadeia de refrigeração, especialmente no nível doméstico (EFSA, 2018).

## **2.6. Estudos de vida útil de alimentos**

### **2.6.1. Conceito de vida útil de um alimento**

A vida útil de um produto alimentar é um conceito que resulta da interação entre ciência, economia, regulamentação e a conveniência dos consumidores.

Segundo o *Institute of Food Safety and Technology*, a vida útil de um produto é o período durante o qual um alimento, quando armazenado nas condições recomendadas, é:

- a) Seguro;
- b) Garante as características sensoriais, químicas, físicas e microbiológicas desejáveis;
- c) Mantém o seu valor nutricional.

Todos os produtos alimentares vão perdendo qualidade ao longo do tempo, por isso é tão importante avaliar, testar, estabelecer e estudar o tempo de vida útil para cada alimento (Hough, 2006).

No estudo de vida útil de um alimento, além das análises microbiológicas, deverá ser também desenvolvida uma monitorização das características sensoriais do alimento. De facto, um alimento pode ser microbiologicamente seguro após algum tempo de armazenamento e ser rejeitado devido a alterações das suas propriedades sensoriais e nutricionais (Hough, 2006).

### **2.6.2. Fatores que influenciam a vida útil de um alimento**

O desenvolvimento microbiano influencia a vida útil de um alimento, pois o tempo necessário para que os microrganismos deteriorem os alimentos depende da quantidade inicial de microrganismos presentes no alimento, bem como da contaminação adicional que o alimento pode sofrer durante o embalamento e armazenamento (Mekalanos, 1992; Rodgers, 2004).

Existem outras formas de alteração da qualidade dos alimentos que não têm origem microbiológica; fatores físico-químicos também influenciam a vida útil de um alimento, como a alteração no teor de humidade de um alimento que induz perda de nutrientes, o escurecimento ou rancificação, no caso dos alimentos secos, e um acréscimo no teor de humidade que conduz a um aumento na vulnerabilidade à ação microbiana (Li, Wick & Marriott, 1999; Fan, Niemira & Sokorai, 2003). A degradação química pode resultar numa alteração do cheiro ou do sabor

do alimento, assim como na alteração da cor, escurecimento ou perda de nutrientes (Li *et al.*, 1999).

### **2.6.3. Definição de estudo de vida útil de alimentos**

O estudo de vida útil de um alimento consiste em simular o que acontece no retalho, para tal, é necessário que as amostras sejam armazenadas em condições semelhantes e posteriormente submetidas a uma série de análises a intervalos de tempo pré-determinados, até ao limite de aceitação (Labuza & Fu, 1997).

Durante esse período de tempo, são observadas as alterações sofridas pelo alimento e é determinado o tempo de deterioração até ao limite que se torna impróprio para o consumo (Corradini & Peleg, 2007).

#### **2.6.4. Delineamento do estudo de vida útil**

A vida útil de um alimento é, em grande parte, determinada pela sua composição, tipo de processamento, contaminação inicial, embalagem e temperatura de conservação.

Um delineamento experimental mal conduzido leva a conclusões incorretas acerca da vida útil do alimento (Hough, 2006; Fu & Labuza, 2000).

O estudo da vida útil de um alimento pode seguir vários métodos, incluindo o cálculo com base em dados publicados, uso de tempos de distribuição conhecidos para produtos similares já colocados no mercado ou uso das reclamações do consumidor como base para determinar a ocorrência de problemas (Corradini & Peleg, 2007).

#### **2.6.5. Indicadores nas análises de vida útil**

Conforme referido, a vida útil de um alimento pode ser definida como o período durante o qual um alimento mantém a sua segurança, a uma dada temperatura de armazenamento (*Codex Alimentarius Commission*, 1999).

Para uma abordagem segura nos estudos de vida útil, é necessário definir indicadores que meçam, ou correspondam, diretamente à qualidade de um alimento. Esses indicadores incluem avaliação microbiológica, sensorial e físico-química (Fu & Labuza, 2000).

#### **2.6.6. Diferentes tipos de estudo de vida útil**

Segundo o laboratório Europeu de Referência para *Listeria monocytogenes* existem vários tipos de estudos de vida útil que permitem validar os procedimentos de processamento de segurança alimentar, condições de armazenamento do produto e tempo de prateleira. Os estudos de vida útil relacionados com a segurança dos alimentos variam de acordo com o objetivo do estudo e dependem do tipo de produto, processo de produção e análise de risco do produto. Os estudos de vida útil relacionados com a segurança dos alimentos incluem:

a) Estudos de inibição do crescimento de agentes patogênicos: permitem avaliar a capacidade de produto alimentar com um tipo específico de processamento e embalagem para inibir o

desenvolvimento de certos agentes patogénicos quando mantidos em condições específicas de armazenamento (tempo e temperatura).

b) Estudos de inativação de agentes patogénicos: avaliam a capacidade de um de produto alimentar e de uma prática específica de fabricação ou sua combinação, para causar a inativação de certos agentes patogénicos. Estes estudos podem ser afetados pelas condições de armazenamento e embalagem e devem ser responsáveis por essas variáveis.

c) Estudos combinados de desenvolvimento e inativação: avaliam a capacidade de um determinado alimento ou processo para inativar certos patogénicos e inibir o desenvolvimento de outras bactérias patogénicas, ou para atingir um nível de inativação seguido de inibição do desenvolvimento de sobreviventes ou introduzidos após o processamento (ACMCF, 2009; EUR Lm, 2014).



### **3. Material e métodos**

#### **3.1. Processo de produção e recolha das amostras**

A salada com frango foi preparada manualmente numa linha produtiva em sala climatizada a temperatura compreendida entre 10 e 12°C na indústria ABC, que se encontra devidamente licenciada para o fabrico de alimentos prontos a consumir. A especificação técnica da salada com frango encontra-se no Anexo I, no qual é efetuada a descrição dos ingredientes e da respetiva quantidade. Os ingredientes são colocados numa saladeira de poliéster (PET) que é posteriormente selada com atmosfera protetora formulada com 30% de CO<sub>2</sub> e 70% de N<sub>2</sub>. (L'Air Liquide SA., Paris, França).

Após a produção, os lotes são armazenados à temperatura de 5°C e possuem uma vida útil de 6 dias.

Para o presente estudo, as amostras foram recolhidas aleatoriamente em três dias distintos, imediatamente após a produção, sendo transportadas para o laboratório em caixa isotérmica em menos de 2 horas.

#### **3.2. Estirpe escolhida para o estudo**

Para o estudo experimental utilizou-se uma estirpe de *Listeria monocytogenes* pertencente ao serótipo 1/2a (CECT 4031), da coleção de isolados do laboratório de Tecnologia dos Produtos Animais da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. Este serótipo de *L. monocytogenes* foi selecionado para o estudo, por ser o mais comumente isolado dos alimentos e por ser responsável, juntamente com os serótipos 1/2b e 4b, por mais de 95% dos casos de listeriose humana (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007; Lomonaco *et al.*, 2015).

### 3.2.1. Adaptação ao frio

A estirpe utilizada nos diferentes ensaios deste estudo estava armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , em criotubos de conservação contendo caldo de *Brain Heart Infusion* (BHI) (Scharlau, Espanha) suplementado com 15 % de glicerol (Merck, Alemanha). Todos os procedimentos descritos subsequentemente foram efetuados em câmara de fluxo laminar Bio II Advance (Telstar Life Science solutions, Terrassa, Espanha).

Para a revivificação da estirpe em estudo, transferiu-se para BHI agar (Scharlau) e incubou-se 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , posteriormente foi transferida novamente para BHI agar, incubando 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Depois, transferiu-se uma colónia isolada para 5 ml de caldo de BHI e incubou-se a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Após a revivificação da estirpe e de forma a induzir a sua adaptação ao frio, transferiu-se 1 ml de suspensão para 9 ml de caldo de BHI previamente arrefecido a  $5^{\circ}\text{C}$  e incubou-se durante 12 dias a  $5^{\circ}\text{C}$  (Chan *et al.*, 2007; Lokerse, Maslowska-Corker, Van de Wardt & Wijtzes, 2016).

Para confirmar a viabilidade bacteriana ao longo da adaptação ao frio, mediu-se a densidade ótica da suspensão bacteriana num espectrofotómetro (Ultrospec 2000 Pharmacia Biotech, Suécia) usando um comprimento de onda de 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ). As medições da densidade ótica foram efetuadas ao terceiro, quinto, sétimo, oitavo, décimo e décimo segundo dia acompanhada de sementeiras em Ottaviani Agosti Listeria Agar (ALOA) (BioMerieux, França) para confirmação da viabilidade dos isolados. Efetuaram-se três repetições da adaptação ao frio.

### 3.2.2. Preparação da suspensão de *L. monocytogenes* para inoculação das saladas

Depois da adaptação ao frio, a  $\text{OD}_{600}$  da suspensão de *L. monocytogenes* foi medida, de forma a se obter uma concentração de 5 log ufc/ml para utilizar como inóculo. Para o *challenge test* considerou-se o protocolo de Lokerse *et al.* (2016) com algumas adaptações. Por cada 100 g de alimento, inoculou-se 1 ml de suspensão com 5 log ufc/ml de *L. monocytogenes*, uniformemente distribuídos, com o auxílio de uma pipeta, por toda a salada.

Após a inoculação, a amostra para análise no dia 0 foi preparada e analisada, enquanto as amostras cuja análise ocorreria nos dias 4 e 7 foram conservadas em câmara de refrigeração a  $5^{\circ}\text{C}$  até ao momento da análise. Simultaneamente, foram preparados controlos brancos, para serem analisados nos dias 0, 4 e 7.

Efetuarão-se três repetições do estudo de inoculação.

### **3.3. Métodos físico-químicos**

#### **3.3.1. Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)**

A determinação do pH foi efetuada nos dias 0, 4 e 7 de vida útil das saladas. A avaliação foi feita de acordo com a NP-3441 (1990), recorrendo a um potenciómetro HI 9025 (Hanna Instruments, Estados Unidos da América). Para o efeito, foram utilizadas apenas as amostras relativas aos controlos brancos e foram efetuadas três medições por amostra em cada momento de análise.

#### **3.3.2. Determinação da atividade da água ( $a_w$ )**

A determinação do  $a_w$  foi efetuada de acordo com a norma ISO 21807:2004, utilizando um medidor da atividade da água Rotronic HygroPalm AW- KHS (West Sussex, Reino Unido) com sonda AW-40 mantida a  $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ . Para o efeito, foram utilizadas apenas as amostras relativas aos controlos brancos e foram efetuadas três medições por amostra em cada momento de análise.

### **3.4. Métodos microbiológicos**

#### **3.4.1 Preparação das amostras**

A preparação das amostras para análise microbiológica foi realizada de acordo com a ISO 6887-2:2003. As amostras para análise obtiveram-se pela recolha, com os devidos cuidados de assépsia, de pequenas porções de salada de diferentes zonas da respetiva embalagem. As amostras foram colocadas em saco de stomacher 400 com filtro lateral (Normax, Marinha Grande, Portugal) às quais se adicionou o volume requerido de água peptonada tamponada (Scharlau). A homogeneização foi realizada durante aproximadamente 60 segundos em homogeneizador Stomacher Lab-Blender 400 (Analytika, Grécia), procedendo-se posteriormente à preparação de diluições decimais seriadas com Triptona-sal (Scharlau).

### **3.4.2. Contagem de microrganismos aeróbios totais (AT) a 30°C**

Efetua-se uma sementeira por incorporação de 1 mL de cada diluição decimal em meio de cultura Triptose Glucose Extract Agar (TGA) (Scharlau). Após homogeneização, as placas foram incubadas por um período de 48 horas à temperatura de 30°C (ISO 4833:2003). Os resultados finais foram expressos em log do número de unidades formadoras de colónias por grama (log ufc/g).

### **3.4.3. Contagem de *Enterobacteriaceae***

De acordo com a ISO 21528-2:2004, as diluições decimais sucessivas foram semeadas individualmente por incorporação de 1 mL em meio de cultura *Violet Red Bile Dextrose* agar (VRDB) (Scharlau). Após homogeneização, as placas foram incubadas durante 48 horas à temperatura de 37°C. A contagem de colónias características foi efetuada e os resultados foram expressos em log ufc/g.

### **3.4.4. Contagem de *L. monocytogenes***

Para a contagem de *L. monocytogenes* foi considerada o disposto na ISO 11290-2:1996. Para isso, a partir da suspensão inicial e da seguinte (-1 e -2) semeou-se por espalhamento 0,2 mL em placas de ALOA (BioMérieux). As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. As colónias características foram enumeradas e os resultados expressos em log ufc/g.

### **3.4.5. Pesquisa de *L. monocytogenes***

Para a pesquisa de *L. monocytogenes* utilizou-se como referência a norma ISO 11290-1:1996. O enriquecimento seletivo de 25 g de amostra foi realizado com 225 mL de caldo Fraser I (Scharlau) que, após homogeneização em Stomacher, incubou a 30°C durante 24 horas.

Num tubo de ensaio contendo caldo Fraser II (Scharlau) inoculou-se 1 mL do primeiro enriquecimento e incubou-se por mais 24 horas a 37°C.

O isolamento foi efetuado mediante sementeira por estria à superfície em meio ALOA e incubou-se a 37°C durante 24 horas.

### **3.5. Modelos matemáticos utilizados no estudo**

Para o desenho da curva de crescimento de *L. monocytogenes* utilizou-se o suplemento DMFit Excel, versão 3.5, do software MS Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, Estados Unidos da América). Os resultados obtidos foram posteriormente comparados com os esperados, considerando um modelo de microbiologia preditiva aplicado a *L. monocytogenes*, utilizando para esse fim o programa ComBase Predictor (Hobart, Austrália). O modelo primário utilizado foi o de Baranyi & Roberts (1994) com os valores médios de pH e  $a_w$  obtidos no dia 0 do estudo de vida útil.

### **3.6. Análise dos dados**

Todos os dados da avaliação das características microbiológicas e físico-químicas foram tratados informaticamente numa base de dados criada no programa Microsoft Office Excel para Windows (Microsoft Corporation), efetuando-se uma análise descritiva com cálculos das médias e respetivos desvios-padrão das 3 repetições dos ensaios, correspondentes a três lotes de fabrico.

Considerando os resultados obtidos, efetuaram-se *t-test* para amostras emparelhadas, utilizando o *software* SPSS Statistics for Windows, versão 24.0 (IBM Corporation, Armonk, Estados Unidos da América).



## 4. Resultados e discussão

Os resultados apresentados são médias das três repetições efetuadas correspondentes aos três lotes de fabrico da salada com frango.

### 4.1 Determinação do pH

Como é possível verificar na Tabela 5, os valores de pH nas amostras correspondentes ao controlo branco da “Salada com frango” variou entre 6.14 e 6.39 durante a vida útil do produto (7 dias). As alterações verificadas nos valores de pH não foram estatisticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

### 4.2 Determinação atividade da água ( $a_w$ )

Como é possível verificar na Tabela 5, os valores de  $a_w$  nas amostras correspondentes ao controlo branco da “Salada de frango” oscilou entre 0.95 e 0.98 durante os sete dias do estudo, não tendo sido detetadas diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 5 – Médias e desvios-padrão dos valores de pH e de  $a_w$  durante o estudo de vida útil.

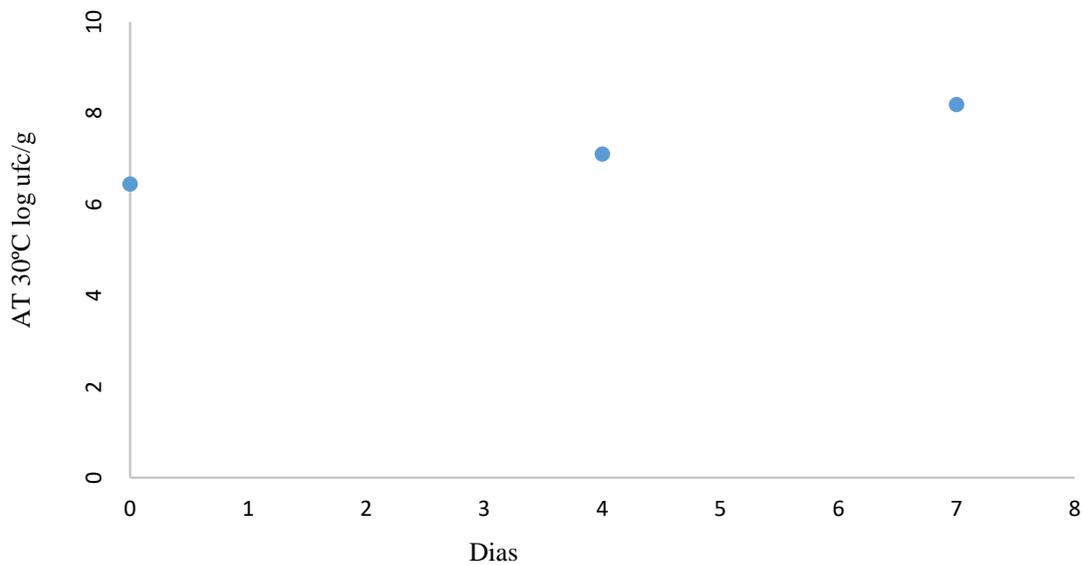
Dia do estudo	pH	$a_w$
0	6.14 ± 0.06	0.95 ± 0.03
4	6.21 ± 0.13	0.98 ± 0.02
7	6.39 ± 0.30	0.98 ± 0.01

Estes resultados relativos aos parâmetros pH e  $a_w$  confirmam a amostra em estudo, “Salada com frango”, como um alimento suscetível de permitir o crescimento de *L. monocytogenes*, de acordo com os limites considerados quer no Regulamento n° 2073/2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, quer no *Technical guidance document for conducting shelf-life studies on L. monocytogenes in foods* publicado pelo laboratório europeu de referência para *L. monocytogenes* (EURL Lm, 2014).

### 4.3 Contagem de microrganismos aeróbios totais (AT) a 30°C

A evolução das médias das três repetições de contagens de AT a 30°C nas amostras correspondentes ao controlo branco é ilustrada na Figura 9.

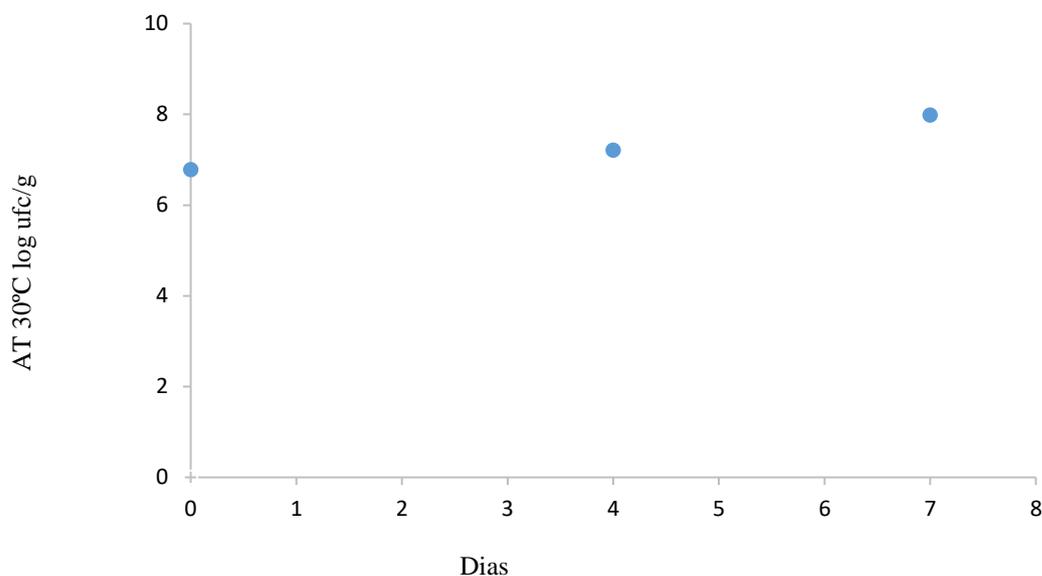
Figura 9 - Evolução das médias das contagens de AT a 30°C nas amostras correspondentes ao controlo branco de “Salada com frango” ao longo do tempo de estudo.



As contagens de AT a 30°C nas amostras correspondentes ao controlo branco de “Salada com frango” apresentaram uma evolução de aproximadamente 6 log ufc/g no dia 0 para cerca de 8 log ufc/g no último dia dos ensaios (dia 7), não tendo sido detetada nenhuma diferença estatisticamente significativa ( $p > 0.05$ ) entre os resultados obtidos nos dias de análise.

A evolução das contagens de AT a 30°C nas amostras inoculadas com *L. monocytogenes* foi semelhante à obtida nos controlos brancos, como é possível ver na Figura 10, não se verificando diferença significativa ( $p > 0.05$ ) entre as duas amostras.

Figura 10 – Evolução das médias das contagens de AT a 30°C nas amostras de “Salada com Frango” inoculadas com *L. monocytogenes*, ao longo do tempo de estudo.

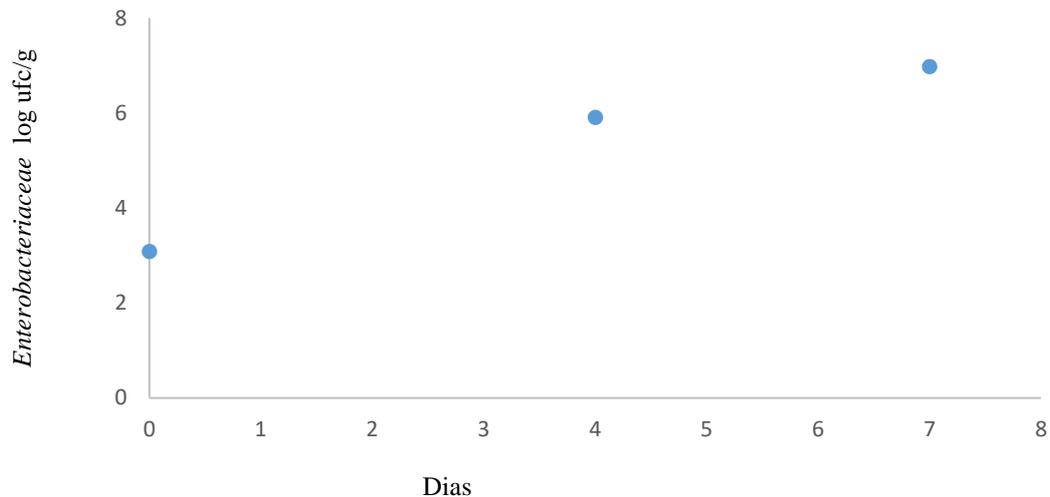


No dia 0, em ambos os tipos de amostra (controlo branco e inoculadas), as contagens de AT a 30°C rondaram os 6 log ufc/g, o que é expectável considerando o tipo de alimento em análise. A “Salada com frango” apresenta como ingredientes vegetais frescos (alface e cenoura) e queijo curado feito a partir de leite cru, o que justifica estas elevadas contagens iniciais. A evolução da microbiota de um queijo ao longo do processo de cura é muito complexa, sucedendo-se dinamicamente diversas sobreposições de espécies de microrganismos capazes de se adaptarem às condições físicas e químicas que se vão sucedendo no processo de cura (Campagnollo *et al.*, 2018). A evolução das contagens de AT a 30°C ao longo da vida útil da “Salada de frango” em estudo encontram-se dentro dos valores expectáveis, de acordo com a publicação “Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods” que refere 8 log cfu/g como limite máximo em saladas cruas, como é o caso do alimento em estudo (HPA, 2009). A contagem de AT a 30°C constitui um indicador de qualidade e não de segurança dos alimentos e o seu uso é particularmente importante quando são conduzidos estudos de vida útil.

#### 4.4. Contagem de *Enterobacteriaceae*

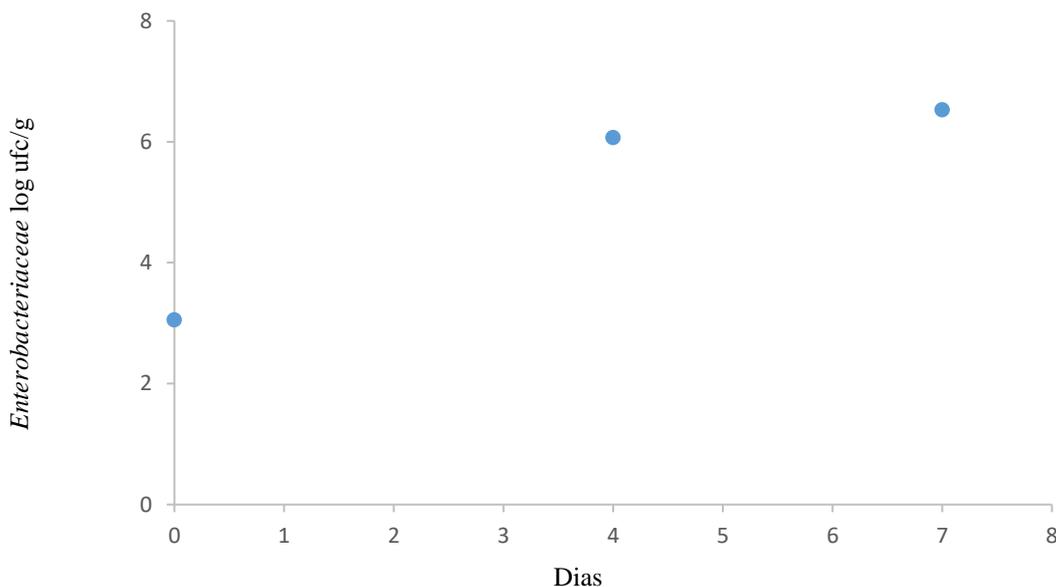
A evolução das médias das três repetições de contagens de *Enterobacteriaceae* nas amostras correspondentes ao controlo branco é apresentada na Figura 11.

Figura 11 – Evolução das médias das contagens *Enterobacteriaceae* nas amostras correspondentes ao controlo branco de “Salada com Frango”, ao longo do tempo de estudo.



A evolução das médias das três repetições de contagens de *Enterobacteriaceae* nas amostras inoculadas com *L. monocytogenes* apresentam um desenvolvimento semelhante às amostras correspondentes ao controlo branco entre os dias 0 e 7 dos ensaios, como é possível ver na Figura 12. As diferenças detetadas nas contagens de *Enterobacteriaceae* nos dois tipos de amostra não foram estatisticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

Figura 12 – Evolução das médias das contagens de *Enterobacteriaceae* nas amostras de “Salada com Frango” inoculadas com *L. monocytogenes*, ao longo do tempo de estudo.



Em ambas as amostras (controlo branco e inoculada com *L. monocytogenes*) no dia 0, os valores médios das contagens de *Enterobacteriaceae* rondaram 3 log ufc/g, atingindo 6 log ufc/g no último dia de vida útil (dia 7). A família *Enterobacteriaceae* é usada em microbiologia alimentar como indicador de higiene. Nesta família taxonómica incluem-se espécies originárias do trato intestinal de animais e humanos, bem como plantas e do meio ambiente. Todas as *Enterobacteriaceae* são eliminadas pelo processamento térmico utilizado na produção de alimentos e são também facilmente removidas das instalações, equipamentos e superfícies por procedimentos de higienização adequados (Kotzekidou, 2013). A presença em alimentos tratados pelo calor, portanto, significa que o tratamento térmico foi inadequado ou ocorreu contaminação pós-processamento. No entanto, o alimento em estudo, além de ser um produto pronto a consumir, tem na sua constituição, em grande maioria, vegetais frescos. Uma vez que existem múltiplas espécies bacterianas da família das *Enterobacteriaceae* que não são de origem fecal (como os pertencentes aos géneros *Hafnia*, *Providencia*, *Serratia*, *Butiaunella*, *Lecherchiella*) e que são colonizadores naturais das folhas dos vegetais frescos é possível encontrar números elevados de *Enterobacteriaceae* nesses alimentos, sem que tal indique condições inadequadas de higiene (Bernardo, 2016).

#### 4.5. Pesquisa de *L. monocytogenes*

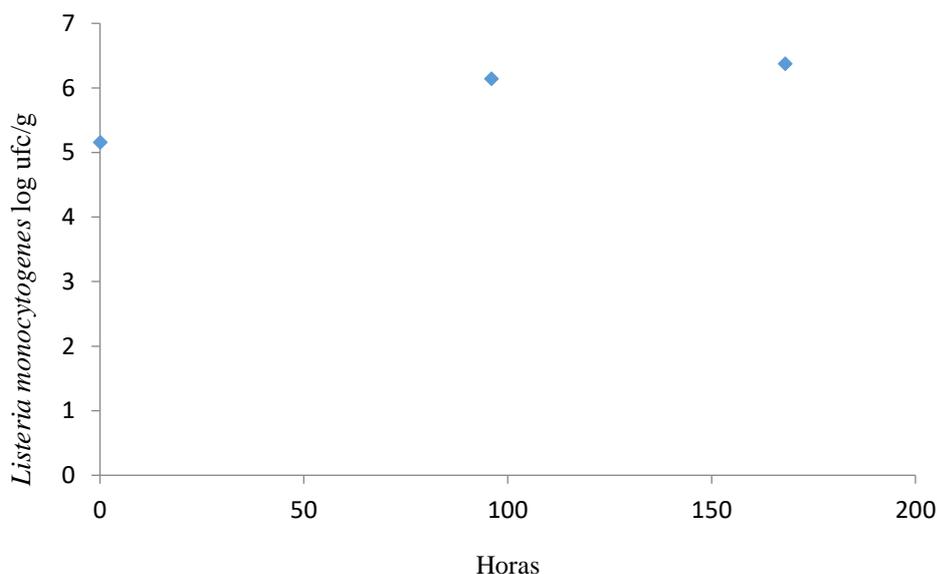
Não foi possível evidenciar a presença de *L. monocytogenes* em 25 gramas nas amostras correspondentes aos controlos brancos.

As amostras inoculadas também foram analisadas e foi evidenciada a presença de *L. monocytogenes* em todas elas e em todos os momentos de análise.

#### 4.6. Quantificação de *L. monocytogenes*

Na Figura 13 é possível ver a evolução da média das três repetições de contagens de *Listeria monocytogenes* nas amostras inoculadas.

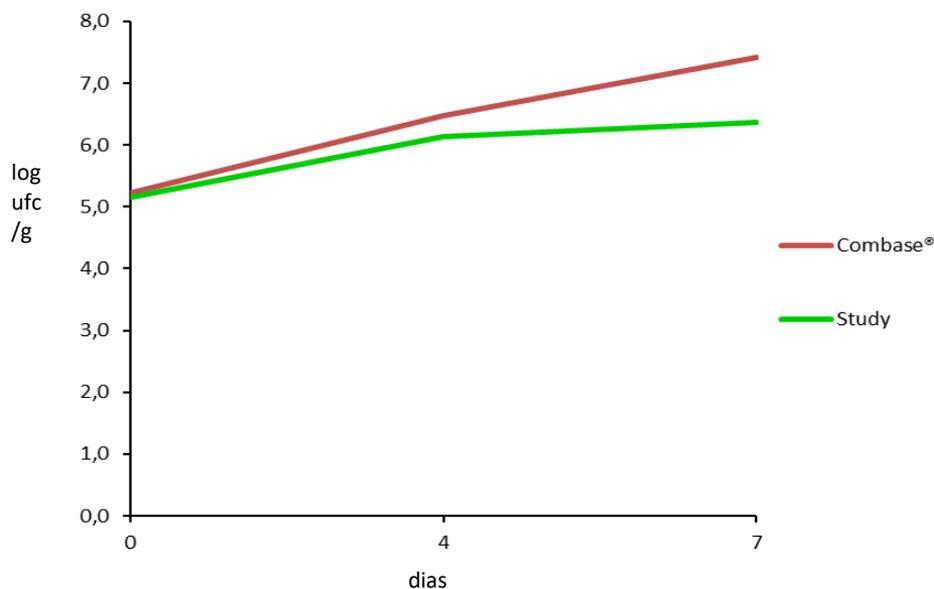
Figura 13 – Evolução das médias das contagens de *L. monocytogenes* nas amostras de “Salada com frango” inoculadas, ao longo do tempo de estudo.



A evolução das contagens de *L. monocytogenes* nas amostras inoculadas e conservadas a 5°C não registou diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0.05$ ) durante os 7 dias estudados.

Comparando os resultados obtidos na quantificação de *L. monocytogenes* no estudo de inoculação ao longo dos 7 dias de vida útil com a curva de crescimento obtida utilizando um modelo preditivo com o auxílio do software ComBase, verificou-se que a curva de crescimento obtida no presente trabalho apresentava valores inferiores aos do modelo preditivo (Figura 14).

Figura 14 – Comparação da curva de crescimento de *L. monocytogenes* obtida no presente trabalho com a curva de crescimento do modelo preditivo gerada no *software* ComBase.



Tal resultado pode dever-se ao facto de o modelo preditivo utilizar os parâmetros de pH e  $a_w$  relativos ao dia da inoculação (dia 0), mas sobretudo ao facto dos modelos preditivos do *software* ComBase Predictor se basearem apenas em resultados de ensaios laboratoriais efetuados em meios de cultura, o que não reflete exatamente o que ocorre na matriz alimentar. Ainda assim, os modelos preditivos são um importante auxiliar para os estudos de vida útil de géneros alimentícios.

Considerando os teores de *L. monocytogenes* obtidos no *challenge test*, estimou-se uma taxa de crescimento exponencial de  $\mu_{\max}$ : 0,007 log.ufc/g/h. Este resultado indica um crescimento médio aproximado de 1.22 log ufc/g em 7 dias a 5°C. Considerando este valor e a imposição legal de, no máximo, 2 log ufc/g durante a vida útil dos géneros alimentícios colocados no mercado, seria possível que existissem 0.78 log ufc/g, o equivalente a aproximadamente 6 ufc/g, de *L. monocytogenes* no alimento no dia 0. Frequentemente, os alimentos são analisados no dia de produção, ou enquanto ainda estão na posse do produtor, e demonstram ausência de *L. monocytogenes* em 25g, mas durante a sua vida comercial e sem que a embalagem tenha sido violada, é possível que se obtenham valores superiores a 2 log ufc/g de *L. monocytogenes*. Uma provável explicação reside no facto de *L. monocytogenes* se encontrar no estado *viable but non culturable* (VBNC) devido a *stress* e pela mudança de ambiente (por exemplo, das superfícies de preparação de alimentos para o alimento) quando a colheita e análise laboratorial ocorrem, vindo a recuperar mais tarde durante a vida útil do género alimentício (Auvolat & Besse, 2016).

O cálculo de log ufc/g/h para *L. monocytogenes* permite simular vários cenários de contaminação inicial e prever o crescimento ao longo do tempo de vida útil dos géneros alimentícios. Na tabela 6 exibe-se uma simulação baseada na taxa de crescimento gerada pelo  $D_{mf}$  de 0.007 log ufc/g/h, considerando uma contaminação inicial de 1 log ufc/g, à temperatura de 5°C. Obtém-se um crescimento de 0.017 log ufc/g/dia a 5°C de temperatura e portanto mesmo que o alimento saísse das instalações do produtor com 1 log ufc/g, não iria ultrapassar o limite legal dentro do período de vida útil.

Tabela 6 – Evolução estimada do desenvolvimento de *L. monocytogenes* considerando  $\mu_{max}$ : 0.017 log ufc/g/dia.

Tempo (horas)	Concentração de <i>L. monocytogenes</i> (log ufc/g/dia)
0	1
24	1.17
48	1.34
72	1.51
96	1.68
120	1.85
144	2.02

Neste estudo, procurou utilizar-se um conjunto de condições que representavam o “pior cenário”, nomeadamente, a escolha de uma estirpe de *L. monocytogenes* CECT 4031, pertencente ao serótipo 1/2a, aquele que é mais comumente isolado dos alimentos e que está muito associado a listeriose humana; a adaptação dessa estirpe ao frio comercial, através do choque e desenvolvimento a temperatura de 5°C durante 12 dias, para recrear uma possível adaptação ao ambiente industrial, que é geralmente refrigerado para a preparação de saladas prontas a consumir, e minimizar o efeito do frio durante a vida útil da “Salada com frango”; e a escolha de um *challenge test*, de acordo com o preconizado pelo laboratório europeu de referência para *L. monocytogenes* (EURL Lm, 2014). Ainda assim, apesar da adaptação ao frio, a estirpe de *L. monocytogenes* CECT 4031 demonstrou um desenvolvimento inferior ao esperado, considerando um modelo preditivo e não atingiria um teor além do limite máximo legal durante a vida útil da “Salada com frango”.



## 5. Conclusão

O facto de *Listeria monocytogenes* ser uma bactéria ubíqua e estar largamente distribuída no meio ambiente faz com que seja irrealista pensar que a sua entrada na indústria alimentar e nas respetivas instalações não ocorrerá. Posteriormente existem outros fatores como fluxos, trabalhadores e más práticas de higiene que contribuem para a distribuição de *L. monocytogenes* dentro da unidade industrial e, conseqüentemente, nos alimentos. A presença desta bactéria patogénica é relevante em alimentos prontos a consumir, sobretudo nos que possuem uma longa vida útil em refrigeração.

Com base nos valores obtidos de pH e  $a_w$ , confirmou-se que o alimento em estudo – salada com frango – é suscetível de permitir o desenvolvimento de *L. monocytogenes*. No presente estudo, utilizou-se um *challenge test* para avaliar o desenvolvimento de *L. monocytogenes* CECT 4031 numa salada com frango pronta a consumir, após a estirpe ter sido submetida a um choque e posterior adaptação à temperatura de 5°C durante 12 dias, para simular as condições térmicas encontradas nas salas de preparação industrial daquele tipo de alimentos.

A taxa de crescimento de *L. monocytogenes* foi de 0.007 log ufc/g/h a 5°C. Ainda assim, o crescimento observado foi inferior ao esperado utilizando uma curva de crescimento de referência no programa Combase.

Quando inoculada em “Salada de frango” pronta a consumir com uma vida útil refrigerada de sete dias, *L. monocytogenes* multiplicar-se-á aproximadamente 1.22 log ufc/g, o que significa que, se este alimento sair das instalações do produtor com uma concentração de *L. monocytogenes* igual ou inferior a 1 log ufc/g, esta bactéria patogénica não irá ultrapassar o limite legal de 2 log ufc/g até ao final da vida útil.



## 6. Referências bibliográficas

- Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food (ACMSF) (2009). *Ad hoc* group on vulnerable groups. Report on the increased incidence of listeriosis in the UK. London, United Kingdom: Food Standards Agency.
- Allen, K. J., Wałęcka-Zacharska, E., Chen, J. C., Katarzyna, K-P., Devlieghere, F., Van Meervenue, E., Osek, J., Wiczorek, K., & Bania, J. (2016). *Listeria monocytogenes* – An examination of food chain factors potentially contributing to antimicrobial resistance. *Food Microbiology*, 54, 178-189.
- Alvarez-Ordóñez, A., Leong, D., Hickey, B., Beaufort, A. & Jordan, K. (2015). The challenge of challenge testing to monitor *Listeria monocytogenes* growth on ready-to-eat foods in Europe by following the European Commission 2014 Technical Guidance document. *Food Research International*, 75, 233–243.
- Andersen, J. K., Nørrung, B. (2011). The challenge of setting risk-based microbiological criteria for *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 22, 1495-1497.
- Arunakul, N. R. (2003). Dr. Joseph Lister:: the founder of antiseptic surgery. *Primary Care Update for OB/GYNS*, 10(2), 71-72.
- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) (2011). Riscos e Alimentos. Acedido em Junho, 7, 2017, disponível em:  
<http://www.asae.gov.pt/?cn=63837156AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA>
- Auvolat, A., Besse, N. G. (2016). The challenge of enumerating *Listeria monocytogenes* in food. *Food Microbiology*, 53, Part B, 135-149.
- Azevedo, I., Regalo, M., Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T., Gibbs, P.A. (2005). Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal. *Food Control*, 16, 121-124.
- Baranyi, J. & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23 (3–4), 277-294.
- Bavishi, C., DuPont, H. L. (2011). Systematic review: the use of proton pump inhibitors and increased susceptibility to enteric infection. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 34, 1269-1281.
- Begot, C., Lebert, I., Lebert, A. (1997). Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. *Food Microbiology*, 14, 403-412.
- Bouwknegt, M., Wilfrid, P., Kubbinga, M., Weda, M., Havelaar, A. (2014). Potential association between the recent increase in campylobacteriosis incidence in the Netherlands and proton-pump inhibitor use - an ecological study. *Eurosurveillance*, 19, 21-26.
- Cabanes, D., Sousa, S. & Cossart, P. (2011). *Listeria* genomics. In: Wiedmann, M., Zhang, W. (Eds.), *Genomics of foodborne bacterial pathogens*. (pp. 141-165). Berlin, Germany: Springer.

- Cabrita, P., Correia, S., Dias, F. D., Brito, L. (2004). Genetic Characterization of *Listeria monocytogenes* Food Isolates and Pathogenic Potential within Serovars 1/2a and 1/2b. System. Appl. Microbiol. 27, 454–461.
- Campagnollo, F. B., Margalho, L. P., Kamimura, B. A., Feliciano, M. D., Freire, L., Lopes, L. S., Alvarenga, V. O., Cadavez, V. A. P., Gonzales-Barron, U., Schaffner, D. W., Sant’Ana, A.S. (2018). Selection of indigenous lactic acid bacteria presenting anti-listerial activity, and their role in reducing the maturation period and assuring the safety of traditional Brazilian cheeses. Food Microbiology, 73, 288-297.
- Carpentier, B., Cerf, O. (2011). Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. International Journal of Food Microbiology, 145, 1-8.
- Chan, Y. C., Boor, K. J., Wiedmann, M. (2007). Sigma B-dependent and Sigma B-independent mechanisms contribute to transcription of *Listeria monocytogenes* cold stress genes during cold shock and cold growth. Applied and environmental microbiology, Vol. 73, No. 19, p. 6019–6029.
- Chen, J. Q., Regan, P., Laksanalamai, P., Healey, S., Hu, Z. (2017). Prevalence and methodologies for detection, characterization and subtyping of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii* in foods and environmental sources. Food Science and Human Wellness, 6, 97–120.
- Ciolacu, L. P., Nicolau, A. L., Wagner, M., Rychli, K. (2013). The effect of milk components and storage conditions on the virulence of *Listeria monocytogenes* as determined by a Caco-2 cell assay. International Journal of Food Microbiology, 166, 59–64
- Codex Alimentarius Commission (1999). Code of hygienic practice for refrigerated packaged foods with extended shelf life. CAC/ RCP 46.
- Comissão Europeia (2010). Decisão da Comissão, de 5 de novembro, relativa a uma participação financeira da União num programa coordenado de vigilância da prevalência de *Listeria monocytogenes* em determinados alimentos prontos para consumo, a executar pelos Estados-Membros (notificada com o número C (2010). Jornal Oficial da União Europeia L 292/40, 10.11.2010, 40-52.
- Comissão Europeia (2005). Regulamento Europeu (EC) N.º. 2073/2005 de 15 novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. L 338, 22.12.2005, 1-37.
- Corradini, M. G., Peleg, M. (2007). Shelf-life estimation from accelerated storage data. Trends in Food Science & Technology, 18, 37 – 47.
- Crandall, P. G., O’Bryan, C. A., Martin, E. M., Kuefner, H. M., Pendleton, S., Shannon, E. M., Marcy, J. A., Ricke, S. C. (2012). Efficacy of cleaning and sanitizing agents against attached *Listeria monocytogenes* on meat slicer components. Food Protection Trends, 32 (2), 68-72.
- Despacho n.º 5681-A de 29 de abril de 2014. Diário da República 2.ª série — N.º 82 — Despacho do Director-Geral da Saúde sobre doenças de notificação obrigatória. Ministério da saúde. Lisboa, 11374-(2) – 11374-(20).

- Di Ciccio, P., Meloni, D. & Ianieri, A. (2015). *Listeria monocytogenes*: Growth in biofilms and in the food industry. In: T. Viccario (Ed.), *Listeria monocytogenes*: Incidence, Growth Behavior and Control. New York, USA: Nova Science Publishers, Inc., pp. 37-57.
- Doijad, S. P., Barbuddhe, S. B., Garg, S., Poharkar, K. V., Kalorey, D. R., Kurkure, N. V., Rawool, D. B., Chakraborty, T. (2015). Biofilm-forming abilities of *Listeria monocytogenes* serotypes isolated from different sources. *PLOSOne*, 10 (9), 0137046.
- Donlan, R. M. & Costerton, J. W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15: 167-193.
- Duodu, S., Jensen, A., H., Skjerdal, T., Cappelier, J. M., Pilet, M. F., Loncarevic, S. (2010). Influence of storage temperature on gene expression and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains grown in a salmon matrix, *Food Microbiology* 27, 795-801
- Eskhan, A. O., Abu-Lail, N. I. (2012). Cellular and molecular investigations of the adhesion and mechanics of *Listeria monocytogenes* lineages' I and II environmental and epidemic strains. *Journal of Colloid and Interface Science* 394, 554–563
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Surveillance Atlas of Infectious Diseases: Listeriosis 2015. Acedido em junho de 2017, disponível em: <https://ecdc.europa.eu/en/listeriosis/surveillance-and-disease-data/atlas>
- European Food Safety Authority (EFSA) & ECDC. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2015. 2016. *EFSA Journal* 2016; 14(12):4634.
- EFSA & ECDC. *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. 2018. *EFSA Journal* 2018; 16(1):5134
- European Reference Laboratory on *Listeria monocytogenes* (EURL Lm) (2014). Technical guidance document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Maisons- Alfort, France: ANSES.
- Fan, X., Niemira, B. A., Sokorai, K. J. B. (2003). Use of ionizing radiation to improve sensory and microbial quality of fresh-cut green onion leaves. *Journal of Food Science*, 68, pp. 1478 – 1483.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Technical Report. Switzerland
- Fu, B., Labuza, T. P. (2000). Shelf life testing: procedures and prediction methods for frozen foods, *J. Food Proc. Preserv.* (7), pp. 2- 46.
- Gaulin, C., Le, M-L., Shum, M. & Fong, D. (2011). Disinfectants and sanitizers for use on food contact surfaces-revised. Evidence review. National collaborating centre for environmental health, Vancouver, Canada.
- Health Protection Agency (2009). Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods. London, United Kingdom: HPA.
- Hough, G. (2006). Sensory shelf-life testing. *Food Quality and Preference*, 17, pp. 640-645.

- International Standards Organization (ISO) 4833-2. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the numeration of microorganisms - Part 2: Colony count at 30 degrees C by the surface plating technique.
- ISO 6887-2:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products.
- ISO 11290-1:1996: Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 1: Detection method.
- ISO 11290-2:1996: Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* -Part 2: Enumeration method.
- ISO 21528-2:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony-count method.
- ISO 21807:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Determination of water activity.
- Iranzo, E., Navarro, R., Gascó J., Cartón, F., & Cucart, A. (2015). *Listeria monocytogenes* nas indústrias das carnes. (1ª edição). Gandia, Betelgeux, S.L.
- Jiang, L. L., Olesen, I., Andersen, T., Fang, W. H., Jespersen, L. (2010). Survival of *Listeria monocytogenes* in simulated gastrointestinal system and transcriptional profiling of stress- and adhesion-related genes. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7, 267-274.
- Kocot, A. M., Olszewska, M. A. (2017). Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in a food processing context. *Food Science and Technology*, 1, 10-726.
- Kotzekidou, P. (2013). Microbiological examination of ready-to-eat foods and ready-to-bake frozen pastries from university canteens. *Food Microbiology*, 34, 337–343.
- Labuza, T.P., Fu, B. (1997). *Shelf Life Testing: Procedures and Prediction Methods*. *Frozen Food Quality*, CRC Press, Denver.19, 377-415.
- Lahou, E., Jacxsens, L., Verbunt, E. & Uyttendaele, M. (2015). Evaluation of the food safety management system in a hospital food service operation toward *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 49, 75-84.
- Leong, D., NicAogáin, K., Luque-Sastre, L., McManamon, O., Hunt, K., Alvarez-Ordóñez, A., Scollard, J., Schmalenberger, A., Fanning, S., O'Byrne, C., Jordan, K. (2017). A 3-year multi-food study of the presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in 54 small food businesses in Ireland, *International Journal of Food Microbiology* 249, 18–26
- Li, C. T., Wick, M., Marriott, N.G. (1999). Evaluation of Lipid Oxidation in Animal Fat. *Research and Reviews: Meat*. The Ohio State University Special Circular, pp. 172-199.
- Linke, K., Ruckerl, I., Brugger, K., Karpiskova, R., Walland, J., Muri-Klinger, S., Tichy, A., Wagner, M., Stessl, B. (2014). Reservoirs of *Listeria* species in three environmental ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 5583-5592.

- Lokerse, R. F. A., Maslowska-Corker, K.A., Van de Wardt, L.C., Wijtzes, T. (2016). Growth capacity of *Listeria monocytogenes* in ingredients of ready-to-eat salads. *Food Control*, 60, 338-345.
- Lomonaco, S., Nucera, D., Filipello, V. (2015). The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. *Infection, Genetics and Evolution*, 35, 172-183.
- Mahoney, M., Henriksson, A. (2003). The effect of processed meat and meat starter cultures on gastrointestinal colonization and virulence of *Listeria monocytogenes* in mice. *International Journal of Food Microbiology* 84, 255 – 261
- Mekalanos, J. J. (1992). Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J. Bacteriol.* 174(1): 1–7.
- Nguyen, U. T. & Burrows, L. L. (2014). Dnase and proteinase K impair *Listeria monocytogenes* biofilm formation and induce dispersal of pre-existing biofilms. *International Journal of Food Microbiology*, 187, 26-32.
- NicAogáin, K., O'Byrne, P. (2016). The role of stress and stress adaptations in determining the fate of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* in the food chain. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-16.
- Norma Portuguesa (NP) 3441 (1990). Carnes, derivados e produtos cárneos – Determinação do pH. Método de referência. IPQ, Lisboa.
- Orsi, R. H., den Bakker, H. C. & Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*, 301, 79–96.
- Orsi, R. H., Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100:5273–5287.
- Ortega-Morente, E., Fernández-Fuentes, M. A., Grande Burgos, M. J., Abriouel, H., Pérez-Pulido R. & Gálvez, A. (2013). Biocide tolerance in bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 162, 13–25.
- Ortiz, S., López, V. & Martínez-Suárez, J. V. (2014). Control of *Listeria monocytogenes* contamination in an Iberian pork processing plant and selection of benzalkonium chloride-resistant strains. *Food Microbiology*, 39, 81-88.
- Osaili, T. M., Alaboudi, A. R. & Nesiari, E. A. (2011). Prevalence of *Listeria* spp. and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from raw chicken and ready-to-eat chicken products in Jordan. *Food Control*, 22, 586-590.
- Picoux, J. B. (2008). Ovine listeriosis, *Small Ruminant Research*, 76, 12–20.
- Pricope, C., Nicolau, A., Wagner, M., Rychli, K. (2013). The effect of milk components and storage conditions on the virulence of *Listeria monocytogenes* as determined by a Caco-2 cell assay. *International Journal of Food Microbiology*, 59-64.

- Reis-Teixeira, F. B., Alves, V. F., Martinis, E. P. (2017). Growth, viability and architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48, 587-591.
- Rodgers, S. (2004). Novel approaches in controlling safety of “cook-chill” meals. *Trends in Food Science & Technology*, 15 (2004), 366 – 372.
- Sapuan, S., Kortsalioudaki, C., Anthony, M., Chang, J., Embleton, N. D., Geethanath, R. M., Gray, J., Greenough, A., Lal, M. K., Luck, S., Pattnayak, S., Reynolds, P., Russell, A. B., Scorrer, T., Turner, M., Heath, P. T., Vergnano, S. (2017). Neonatal listeriosis in the UK 2004 – 2014. *Journal of Infection*, 74, 236 – 242.
- Schmitz-Esser, S., Muller, A., Stessl, B., Wagner, M. (2015). Genomes of sequence type 121 *Listeria monocytogenes* strains harbor highly conserved plasmids and prophages. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-10.
- Scott, P. R. (2013). Clinical diagnosis of ovine listeriosis, *Small Ruminant Research*, 110, 138– 141
- Swaminathan, B., Smidt, P. G. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection* 9, 1236-1243
- Todd, E.C.D., Notermans, S. (2010). Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 22, 1484-1490
- United States of America Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2013). National Enteric Disease Surveillance: *Listeria* Annual Summary, 2011. Atlanta, GA, United States of America: Department of Health and Human Services.
- Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Journal of Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 584-640.
- Walecka, E., Molenda, J., Karpíšková, R., Bania, J. (2011). Effect of osmotic stress and culture density on invasiveness of *Listeria monocytogenes* strains *International Journal of Food Microbiology*, 144, 440-445.

**FICHA TÉCNICA DE PRODUTO ACABADO  
“SALADA DE FRANGO”**

FT.10510.04  
Data: 2016/08/01

**Denominação legal:**

Salada com mistura de vegetais, frango, queijo italiano, bacon.

**Lista de ingredientes:**

Ingredientes: Mistura de Vegetais (44,1%) (Alface iceberg, Lollo Rosso, Apollo Green e Cenoura ripada, em proporções variáveis), Peito de Frango (30,2%) (carne de peito de frango, óleo de girassol, fécula de batata, aroma natural, estabilizador (E407a), sal), Queijo Caesar (8,2%) (LEITE) (queijo duro, lisozima de OVO) e Bacon (8,2%) (entremada de porco, água, sal, antioxidante (E301) e conservante (E250)).

PODE CONTER VESTÍGIOS DE CRUSTÁCEOS, PEIXE, AMENDOIM, SOJA, FRUTOS DE CASCA RIJA, AIPO, MOSTARDA, SEMENTES DE SÊSAMO, SULFITOS, TREMOÇO, MOLUSCOS.

**Alergénios:**

Alergénios:	Sim	Não	Pode Conter Vestígios
Glúten	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Crustáceos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Ovo	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Peixe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Amendoim	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Soja	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Leite	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Frutos de casca rija	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Aipo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Mostarda	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Sementes de sésamo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Sulfitos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Tremoço	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Moluscos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

**Prazo de validade:**

Consumir até:  
Dia de produção + 6 dias.

**Lote:**

Lote: aadd.

**Condições de conservação:**

Conservar entre 1°C e 4°C.

**Peso líquido:**

Peso Líquido: 165g 

**Características nutricionais:**

DECLARAÇÃO NUTRICIONAL – valores médios	Por 100g
Energia	552 kJ / 132 kcal
Lípidos	6g
dos quais saturados	3,4g
Hidratos Carbono	2g
dos quais açúcares	0,1g
Fibra	1,2g
Proteínas	16g
Sal	0,6g

**Instruções de utilização:**

Temperar a gosto e esta pronto a consumir.