

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AGROINDUSTRIAL**



Dissertação

**OCORRÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA E AVALIAÇÃO DO PERFIL
DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM *Listeria spp.* ISOLADAS EM
LATICÍNIOS PROCESSADORES DE QUEIJOS NO SUL DO RIO GRANDE DO
SUL**

DENISE DA FONTOURA PRATES

Pelotas, 2010.

DENISE DA FONTOURA PRATES

Ocorrência, caracterização sorológica e avaliação do perfil de resistência a antibióticos em *Listeria* spp. isoladas em laticínios processadores de queijos no sul do Rio Grande do Sul

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” da UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva (DCTA-UFPeI)

PELOTAS

2010

Banca examinadora:

PROF. Dr. WLADIMIR PADILHA DA SILVA (DCTA/UFPel) – ORIENTADOR

PESQUISADORA. DR^a. ÉLEN SILVEIRA NALÉRIO (EMBRAPA) – EXAMINADORA

PROF^a. DR^a. MÁRCIA MONKS JANTZEN (DCA/UFPel) – EXAMINADORA

Às pessoas que mais amo e admiro meus pais Graciliano M. P. Neto e Ana Clara da Fontoura Prates, minhas irmãs Ana Lídia, Simone e Aline e meus sobrinhos Aninha e Rafael pelos laços fortes e valores familiares, sólida cumplicidade, incentivo e amizade, dedico esse trabalho.

Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades e devemos nos lembrar de que as grandes conquistas do homem surgiram do que parecia impossível aos olhos dos acomodados

Denise Prates

AGRADECIMENTOS

À Deus e “minha” Sta Rita, pela fé e por tudo.

À minha adorável família, meu porto seguro que são as pessoas mais importantes da minha vida, moramos longe, mas carrego todos vocês com imenso amor e orgulho no meu coração. Ao meu pai Graciliano Machado Prates Neto e minha mãe Ana Clara da Fontoura Prates, serei eternamente grata, por todo amor, valores, educação, dedicação, amizade, companheirismo, pois sei que nunca mediram esforços, abdicando muitas vezes de coisas pra si, para me oferecer o melhor, investir e incentivar a minha educação e torcida descomunal pela minha felicidade.

Às minhas amadas irmãs e amigas, Ana Lidia, Simone, Aline, pela cumplicidade, união, palavras sábias em horas oportunas, incentivo, alegria de viver.

À minha sobrinha Ana Clara e ao meu sobrinho Rafael, verdadeiros presentes que Deus trouxe para nossa família, sempre carinhosos, me surpreendendo a cada dia, enchendo meu coração de alegria.

Aos meus cunhados, pela amizade e incentivo, em especial ao Nilton meu irmão de coração e pelas caronas pra casa.

À querida Carmem Barcellos, por todo apoio, convivência, ombro amigo, carinho e paciência, por poder contar com ela em momentos difíceis e de comemorações.

Ao Prof. Wladimir Silva, por toda oportunidade e ensinamentos.

Ao meu colega e amigo Valmor, pela parceria no trabalho, tanto nas coletas como no laboratório, muito obrigada.

À Natália que iniciou essa caminhada comigo, mas que por motivos profissionais se distanciou, mas a amizade permanece e a cada momento difícil descubro que posso contar sempre com ela.

Aos queridos colegas do laboratório de microbiologia de alimentos: Marcia Matta, Carol, Rodrigo, Janaína, Karla, Marcelo, Kátia, Andréia e em especial a Milena, Greici, Tati e Júlia pela amizade, ajuda, incentivos, trocas de conhecimentos e momentos de descontração.

À Simone Rauber, pela ajuda nas coletas e pela amizade.

Às pessoas responsáveis e os funcionários das indústrias onde foram realizadas as coletas, em especial a Leyre e Lucas.

Ao Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), em especial ao Dr. Ernesto Hofer, do Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Bacteriologia, pela sorotipagem das cepas.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia por proporcionarem a realização do curso.

Aos professores pelo meu crescimento profissional e funcionários, em especial ao Marcos pelo seu profissionalismo, dedicação e agilidade, inclusive na entrega de autorizações para eu ir aos finais de semana para o Campus.

À CAPES (Coordenação de Apoio a Pesquisa em Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

PRATES, Denise da Fontoura. **Ocorrência, caracterização sorológica e avaliação do perfil de resistência a antibióticos em *Listeria* spp. isoladas em laticínios processadores de queijos no sul do Rio Grande do Sul.** 2010. 97f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva de natureza ubíqua, psicrotrófica, que coloniza superfícies de equipamentos e utensílios dentro de indústrias processadoras de alimentos. Leites e derivados lácteos, em especial queijos com média e alta umidade, têm sido incriminados em casos e surtos de listeriose, por serem alimentos que favorecem o desenvolvimento microbiano, além de serem prontos para o consumo. A contaminação microbiana pode ter origem na matéria-prima, ou ser incorporada durante as etapas de elaboração do produto, associada a práticas inadequadas de higiene. O objetivo geral neste trabalho foi avaliar a ocorrência de *Listeria* spp., em especial de *L. monocytogenes*, ao longo da linha de processamento de queijos de média e alta umidade, em três laticínios, localizados na região sul do Rio Grande do Sul, submetidos a diferentes níveis de inspeção sanitária. Das 208 amostras avaliadas 7,69% apresentaram *Listeria* spp., sendo isoladas, 43,75%, 25%, 31,25%, respectivamente, nos laticínios A, B e C. Destes isolados, 25% foram encontrados no leite cru, 18,75% em superfícies de contato com o produto, 50% em superfícies sem contato com o produto e 6,25% no produto final. *L. innocua* e *L. monocytogenes* foram as únicas espécies identificadas entre os isolados, sendo *L. innocua* a espécie prevalente (68,7%). Entre os sorotipos de *L. innocua*, o prevalente foi 6a (72,7%) e entre *L. monocytogenes* o sorotipo prevalente foi 4b (55,6%). Todas as cepas de *Listeria* isoladas da matéria-prima e do produto final apresentaram multirresistência a cinco (penicilina, amoxicilina, cloranfenicol, cefaclor e clindamicina) dos 15 antibióticos testados. Dentre as amostras de matéria-prima avaliadas microbiologicamente, as de leite cru, foram as que apresentaram os maiores níveis de contaminação, sendo que, os níveis mais elevados encontrados entre as amostras de leite cru foram: $>1,1 \times 10^6$ NMP.mL⁻¹ para coliformes totais, $1,1 \times 10^5$ NMP.mL⁻¹ para coliformes termotolerantes, 4×10^5 UFC.mL⁻¹ para estafilococos coagulase positiva (ECP) e a presença de *Salmonella* spp. em uma das amostras avaliadas. Entre as seis amostras de produto final, apenas uma apresentou-se em desacordo com o padrão regulamentar vigente, excedendo o limite permitido para ECP. *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* foram isoladas ao longo das linhas de processamentos nos três laticínios, independente do porte da indústria, evidenciando risco de contaminação durante a fabricação dos dois tipos de queijo, os quais são produtos prontos para o consumo. Dessa forma, torna-se necessária a implantação de medidas eficazes para redução dessas contaminações, ou melhorias nas práticas já adotadas pelas indústrias, em virtude dos riscos à saúde pública.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*. *Listeria* spp.. queijos. laticínios. antimicrobianos.

ABSTRACT

PRATES, Denise da Fontoura. **Occurrence, characterization and serological evaluation of the profile of antibiotic resistance in *Listeria spp.* isolated in cheese dairy processors in southern Brazil**. 2010. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Listeria monocytogenes is a Gram-positive of ubiquitous natural, psychrotropic pathogen which colonizes the surfaces of equipment and utensils in food processing industries. Milk and dairy products, especially cheeses with medium and high humidity have been implicated in listeriosis cases and outbreaks. Microbial contamination could be originated in raw material or be incorporated during the development stages of the product, coupled with inadequate hygiene practices. The general aim of this study was to evaluate the occurrence of *Listeria spp.* along the processing line of cheese with middle and high humidity, in three dairy subjected to different levels of sanitary survey located in Southern Brazil. From 208 samples tested *Listeria spp.* were isolated 7.69%, being isolated 43.75%, 25%, 31.25%, respectively, in dairy products A, B and C. From these isolates, 25% were found in raw milk, 18.75% in contact surfaces with the product, 50% in areas without contact with the product and 6.25% in the final product. *L. innocua* and *L. monocytogenes* were the only species identified between the isolates being *L. innocua* the prevalent species (68.7%). Among the serotypes of *L. innocua*, the serotype 6a was prevalent (72.7%) and between *L. monocytogenes* serotype 4b was prevalent (55.6%). All *Listeria* strains isolated from raw material and final product showed multiresistance to five antibiotics (penicillin, amoxicillin, chloramphenicol, cefaclor and clindamycin) of the fifteen antibiotics tested. Among the samples of raw material assessed microbiologically, the raw milk showed the highest levels of contamination and the highest levels found between them were $> 1.1 \times 10^6$ MPN/mL for fecal Overall, 1.1×10^5 MPN/mL for fecal coliform, 4×10^5 CFU/ml for coagulase-positive staphylococci and *Salmonella spp.* in one of the samples. Among six samples of the final product, only one showed himself at odds with the existing regulatory standard, exceeding the allowed limit for ECP. *Listeria spp.* and *L. monocytogenes* were present along the lines of the three dairy processing plants, regardless of the size of the industry, highlighting the risk of contamination during food manufacturing. Therefore, it becomes necessary to introduce effective measures to reduce such contamination or improvements in the practices already adopted by the industry, because of the risks to public health.

Keywords: *Listeria monocytogenes*. *Listeria spp.*. cheeses. processing plants. antimicrobial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- <i>Listeria monocytogenes</i> , bacilo Gram-positivo.....	19
Figura 2- Fluxograma de produção do queijo coalho e pontos de amostragem no laticínio A.....	43
Figura 3- Fluxograma de produção do queijo Prato/Lanche e pontos de amostragem no laticínio B.....	44
Figura 4- Fluxograma de produção do queijo Prato/Lanche e pontos de amostragem no laticínio C.....	45
Figura 5- Chave dicotômica para identificação de espécies de <i>Listeria</i> spp.....	49
Figura 6- Percentual de <i>Listeria</i> spp. isoladas nos laticínios A, B e C.....	55
Figura 7- Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> e <i>L. innocua</i> em superfícies com e sem contato com o produto em três linhas de processamento de queijos de média e alta umidade localizadas no sul do Rio Grande do Sul.....	63
Figura 8- Percentual de cada sorotipo de <i>L. innocua</i> e <i>L. monocytogenes</i> isoladas nos três laticínios da região sul do Rio Grande do Sul.....	67
Figura 9- Perfil de resistência dos isolados de <i>Listeria</i> spp. oriundos da matéria prima e do produto final frente a 15 antimicrobianos.....	70
Figura 10. Perfil de resistência dos isolados de <i>Listeria</i> spp. oriundos de superfícies de equipamentos e de ambiente de processamento frente a 15 antimicrobianos.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características bioquímicas das bactérias do gênero <i>Listeria</i>	20
Tabela 2 - Sorotipos de algumas das espécies de <i>Listeria</i> spp.	22
Tabela 3- Padrões microbiológicos para queijos de média e alta umidade, segundo a RDC nº12/2001, da ANVISA.....	54
Tabela 4- Ocorrência de <i>Listeria</i> spp. em amostras de matéria-prima para produção de queijos de média e alta umidade coletadas em três laticínios do sul do Rio Grande do Sul.....	57
Tabela 5- Pontos de amostragem em três laticínios localizados no sul do Rio Grande do Sul, e respectivos pontos de isolamento de <i>Listeria</i> spp.....	59
Tabela 6- Pontos de amostragem contaminados por <i>L. innocua</i> e <i>L. monocytogenes</i> em três laticínios produtores de queijo de média e alta umidade, localizados no sul do Rio Grande do Sul.....	63
Tabela 7- Sorotipos e origem dos isolados de <i>Listeria</i> spp. provenientes de três laticínios da região sul do Rio Grande do Sul.....	66
Tabela 8- Isolados de <i>Listeria</i> spp. com seus respectivos sorotipos e pontos de isolamento.....	69
Tabela 9- Perfil de resistência a antimicrobiano de <i>Listeria</i> spp. isoladas de leite cru e de queijo Coalho em três laticínios da região sul do Rio Grande do Sul.....	71
Tabela 10- Enumeração de coliformes totais e coliformes termotolerantes em amostras de superfícies de mãos dos manipuladores e matéria-prima utilizada na elaboração de queijos fabricados em três laticínios (A, B e C) localizados no sul do Rio Grande do Sul.....	74
Tabela 11- Presença de <i>Salmonella</i> spp. em amostras de superfícies de mãos de manipuladores e matéria prima utilizada na elaboração de queijos fabricados em três laticínios (A, B e C) localizados no sul do Rio Grande do Sul.....	75
Tabela 12- Contagem de estafilococos coagulase positiva em amostras de superfícies de mãos de manipuladores e matéria prima utilizada na elaboração de queijos fabricados em três laticínios (A, B e C) localizados no sul do Rio Grande do Sul.....	76

Tabela 13- Avaliação microbiológica de queijos Coalho e Prato/Lanche produzidos em laticínios (A, B e C) localizados no sul do Rio Grande do Sul.....78

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 REVISÃO	18
3.1 <i>Listeria</i> spp. – breve histórico.....	18
3.2 Características do gênero <i>Listeria</i> e o patógeno <i>L. monocytogenes</i>	18
3.3 Sorotipos.....	21
3.4 Listeriose.....	23
3.5 Fatores de Virulência.....	24
3.5.1 Internalinas (InIA, InIB e InIC).....	25
3.5.2 Proteína p60.....	25
3.5.3 Hemolisina.....	25
3.5.4 Fosfolipases.....	25
3.5.5 Proteína ActA.....	26
3.5.6 Superóxido Dismutase e Catalase.....	26
3.6 Queijos versus <i>Listeria monocytogenes</i>	26
3.7 Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> em queijos e indústrias de laticínios....	29
3.8 Surtos e casos de listeriose associados ao consumo de queijos e outros produtos lácteos.....	30
3.9 Susceptibilidade a antimicrobianos.....	32
3.10. Coliformes totais e coliformes termotolerantes (a 45°C).....	34
3.11 <i>Salmonella</i> spp.....	36
3.12 Estafilococos coagulase positiva.....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Características dos laticínios pesquisados.....	40
4.1.1 Laticínio A.....	40
4.1.2 Laticínio B.....	40
4.1.3 Laticínio C.....	41
4.2 Coleta das amostras.....	41

4.2.1 Leite.....	41
4.2.2 Mãos dos manipuladores.....	42
4.2.3 Produto final.....	42
4.2.4 Amostras de superfícies do ambiente de processamento, equipamentos e utensílios.....	42
4.3 Preparo das amostras.....	46
4.3.1 Leite cru, leite pasteurizado e mãos de manipuladores.....	46
4.3.2 Amostras de superfícies ambientais, equipamentos e utensílios.....	47
4.3.3 Produto final.....	47
4.4 Isolamento e Identificação de espécies de <i>Listeria</i>	47
4.4.1 Isolamento de colônias presuntivas de <i>Listeria</i> spp. em meio seletivo primário.....	48
4.4.1.1 Enriquecimento seletivo primário.....	48
4.4.1.2 Enriquecimento seletivo diferencial.....	48
4.4.1.3 Isolamento.....	48
4.4.1.4 Subcultivo das colônias.....	48
4.4.2 Confirmação e identificação de <i>Listeria</i> em nível de espécie.....	49
4.5 Sorologia dos isolados de <i>Listeria</i> spp.....	51
4.6 Determinação de <i>Salmonella</i> spp.....	51
4.7 Determinação de coliformes totais (Ct) e coliformes termotolerantes (CT).....	52
4.8 Determinação de estafilococos coagulase positiva.....	52
4.9 Avaliação da resistência de <i>Listeria</i> spp. a antimicrobianos.....	53
4.10 Avaliação da eficácia da pasteurização.....	53
4.11 Avaliação microbiológica quanto aos padrões legais da RDC nº12/ANVISA (2001).....	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1 Isolamento de <i>Listeria</i> spp. em plantas de processamento de queijos de média e alta umidade.....	55
5.1.1 Matéria-prima.....	55
5.1.2 Manipuladores.....	57
5.1.3 Amostras de superfícies ambientais, equipamentos e utensílios.....	58
5.1.4 Produto final.....	64
5.2 Sorologia dos isolados de <i>Listeria</i> spp.....	66

5.3 Perfil antimicrobiano.....	68
5.4 Caracterização microbiológica da matéria-prima e de mãos dos manipuladores.....	73
5.4.1 Coliformes totais e coliformes termotolerantes.....	73
5.4.2 <i>Salmonella</i> spp.....	75
5.4.3 Estafilococos coagulase positiva (ECP).....	76
5.5 Caracterização microbiológica do produto final e conformidade com os padrões legais.....	78
6 CONCLUSÃO.....	81
7 REFERÊNCIAS.....	82

1 INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva em forma de coco-bacilos, anaeróbia facultativa e não esporulada. Possui caráter ubiquitário, é um microrganismo capaz de se multiplicar em temperatura de refrigeração, e de formar biofilmes podendo se tornar endêmica em plantas de processamento, propiciando contaminações cruzadas (FRANCO, LANDGRAF, 2002; SAUDERS, WIEDMANN, 2007).

O patógeno emergiu na década de 80, como um agente causador de doenças veiculadas por alimentos, tornando-se alvo de crescentes estudos da comunidade científica e de preocupação por autoridades governamentais sanitárias (GOMBAS et al., 2003). Ao contrário de outros agentes de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) que afetam apenas o sistema gastroentérico, *L. monocytogenes* pode levar a quadros severos de listeriose, uma enfermidade bacteriana invasiva de caráter oportunista, que possui alta taxa de letalidade, caracterizada principalmente por septicemia, meningite e meningoencefalite (MANTILLA et al., 2007).

Apesar das bactérias do gênero *Listeria* serem normalmente susceptíveis frente aos antimicrobianos utilizados contra bactérias Gram-positivas, atualmente tem-se isolado cepas resistentes a antibióticos comumente empregados no tratamento de listeriose, tornando-se um risco para a saúde pública, pois as bactérias resistentes não são inibidas durante o tratamento com antibióticos (CASTRO, 1989; ZHANG et al., 2007; CONTER et al., 2009).

Estima-se que todos os anos milhares de pessoas adoecem através do consumo de alimentos contaminados, estando os produtos lácteos entre os principais envolvidos. Dentre esses, o queijo, devido a sua rica composição nutricional, é considerado um potencial veículo de patógenos de origem alimentar e está envolvido mundialmente em severos casos e surtos de listeriose (BILLE et al., 2006; MANTILLA et al., 2007).

Os queijos apresentam características propícias à contaminação por *Listeria*, destacando-se os queijos com média e alta umidade, os quais não sofrem maturação ou cujo tempo desse processo não é prolongado (DE BUYSER et al., 2001). Os queijos são, muitas vezes, elaborados a partir de leite cru, associado a práticas

insatisfatórias de higiene durante a ordenha, estocagem, transporte, processamento ou a uma contaminação pós-pasteurização. A contaminação microbiana desses produtos assume destacada relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública. No anseio de não agravar estas perdas, salienta-se a importância de conduzir todas as etapas de industrialização do queijo sob um rigoroso controle de qualidade sanitário, desde a obtenção da matéria-prima (SWAMINATHAN et al., 2001; REIJ et al., 2004).

Apesar da ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijos já ter sido relatada nesta região, a disseminação desse microrganismo no ambiente de processamento de queijos em indústria sem inspeção e sob diferentes níveis de inspeção sanitárias, ainda é pouco esclarecida. Dessa forma, torna-se relevante avaliar a presença dessa bactéria, tanto nas etapas de processamento, como na matéria-prima e no produto final e caracterizar o perfil deste patógeno frente a antimicrobianos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Pesquisar a ocorrência de *Listeria* spp., em particular de *Listeria monocytogenes* e seu perfil de resistência a antibióticos, em três laticínios processadores de queijos de média e alta umidade, situados na região sul do Rio Grande do Sul, que possuem diferentes níveis de Inspeção Sanitária.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar as possíveis fontes de contaminação de queijo Coalho e Prato/Lanche, por *Listeria* spp. e por *Listeria monocytogenes* durante o processamento;
- caracterizar sorologicamente os isolados;
- determinar o perfil de resistência dos isolados de *Listeria* spp., frente a 15 diferentes antimicrobianos;
- avaliar microbiologicamente, através das análises de coliformes totais (Ct), coliformes termotolerantes (CT), estafilococos coagulase positiva e *Salmonella* spp., as amostras de matéria-prima e de mãos dos manipuladores;
- avaliar a eficácia da pasteurização através testes enzimáticos;
- avaliar a adequação das amostras de queijo Coalho e queijo Prato/Lanche aos padrões microbiológicos da RDC 12/2001, da ANVISA.

3 REVISÃO

3.1 *Listeria* spp. – breve histórico

Em 1926, Murray et al. fizeram a descrição de um bastonete Gram-positivo, o qual foi determinado de *Bacterium monocytogenes*, em virtude da infecção causada por esse microrganismo ser caracterizada por uma monocitose (SALAMANO et al., 2005). No ano seguinte, na África do Sul, Pirie (1927) estudando uma epizootia em roedores, isolou do fígado uma bactéria que, denominou de *Listerella hepatolytica*, em homenagem ao cientista e cirurgião britânico Joseph Lister (1827-1912), pioneiro no estudo de bacteriologia. Devido, as cepas isoladas por Murray (1926) e Pierie (1927) reunirem muitas semelhanças, a bactéria foi renomeada para *Listerella monocytogenes*, contudo, *Listerella* já contemplava um gênero protozoário (LOGUERCIO et al., 2001; AUTIO, 2003). Finalmente, em 1940, o microrganismo foi nomeado de forma definitiva como *Listeria monocytogenes*. Por muitos anos, o gênero *Listeria* foi considerado monoespecífico, apenas representado por *L. monocytogenes*, entretanto, com auxílio de estudos filogenéticos e desenvolvimento da biologia molecular, posteriormente foram incluídas as outras espécies (GRAY, KILLINGER, 1966; HOFER, REIS, 2005; BUCHRIESER, 2007; LECLERCQ et al., 2009).

3.2 Características do gênero *Listeria* e o patógeno *L. monocytogenes*

Ao considerar o gênero *Listeria*, seis espécies eram amplamente conhecidas: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. weishimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi* (BUCHRIESER, 2007; LECLERCQ et al., 2009). Contudo, estudos recentes apontaram a existência de duas novas espécies, *L. rocourtiae* e *L. marthii* (LECLERCQ et al., 2009; GRAVES et al., 2010). Dentre essas espécies, somente *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são patogênicas, sendo a primeira patogênica para humanos e animais e, a segunda, somente para animais (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Os membros do gênero *Listeria* são bastonetes Gram-positivos. Células jovens, quando observadas ao microscópio, apresentam-se na forma de bacilos lisos e curtos com extremidades arredondadas, assemelhando-se a pequenos difteróides, mediando de 1,0 a 2,0 μ m por 0,5 μ m. No entanto, após três a cinco dias de incubação, apresentam-se como bacilos longos, medindo de 6 a 20 μ m (FRANCO; LANDGRAF, 2002). Possuem baixa proporção de C-G no seu genoma, em torno de 37%, característica cuja classificação aproxima o gênero *Listeria* aos gêneros *Clostridium*, da mesma forma que *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Bronchothrix* (JAY, 2005).

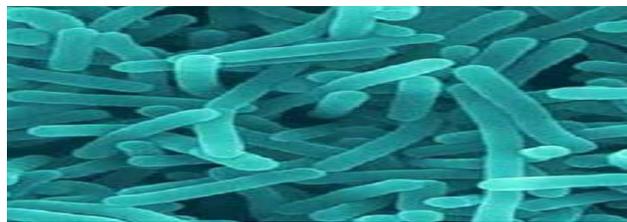


Figura 1- *Listeria monocytogenes*, bacilo Gram-positivo.
Fonte: Frilabo, 2010, Portugal.

As bactérias do gênero *Listeria*, são microrganismos desprovidos de cápsula, não formadores de esporos, catalase positiva e não produtores de H₂S. Multiplicam-se tanto em aerobiose como em anaerobiose, mas tem preferência por condições de microaerofilia. Desenvolvem-se em ampla faixa de temperatura (-0,4 a 45°C), sendo consideradas psicotróficas, por serem capazes de se multiplicar em temperaturas de refrigeração, embora apresentem como temperatura ótima, a faixa dos 30-37°C (ALLERBERGER, 2003; BELL; KYRIAKIDES, 2005).

Listeria spp. apresentam flagelos peritríquios, com motilidade característica de tombamento em temperatura ambiente, mas são imóveis a 37°C. Quando *Listeria* spp. é inoculada por picada em ágar semi-sólido e incubada à temperatura de 20-25°C, desenvolve uma migração típica, espalhando-se na parte superior do meio, 3 a 5mm abaixo da superfície, mantendo-se restrita à picada no fundo do tubo. Este tipo de migração produz um crescimento, lembrando um guarda-chuva, o qual é característico deste gênero (SILVA et al., 2003).

Podem se desenvolver em pH variando entre 4,3 a 9,8 e atividade de água (A_w) mínima de 0,9, podendo tolerar altas concentrações de cloreto de sódio, sobrevivendo a 20% de NaCl (LADO; YOUSEF, 2007).

As características bioquímicas utilizadas para identificação das bactérias do gênero *Listeria* são: motilidade em forma de guarda-chuva (25°C), produção de catalase, não produção de oxidase, fermentação de glucose com produção de ácido sem produção de gás, capacidade de hidrolisar a esculina. A discriminação entre as espécies se faz, por meio de fermentação de carboidratos (dextrose, manitol, ramnose e xilose), produção de hemólise em ágar sangue de cavalo (β -hemolisina), incluindo o teste CAMP e das provas de redução de nitrato (RYSER; DONNELLY, 2001). Outras características que também podem ser utilizadas na caracterização bioquímica do gênero *Listeria*: provas de Voges Proskauer positiva, incapacidade de utilizar a uréia, não utilização do citrato exógeno e não produção de indol (SEELIGER; JONES, 1986; RYSER; DONNELLY, 2001).

Algumas das características bioquímicas entre as espécies do gênero *Listeria* são apresentadas na tab. 1, a qual foi adaptada de Holt et al. (1994).

Tabela 1- Características bioquímicas de bactérias do gênero *Listeria*

Características	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i>
Coloração de Gram	+	+	+	+	+	+
Motilidade tipo guarda-chuva	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-
CAMP-Test						
<i>S. aureus</i>	+	-	-	-	-	-
<i>R. equi</i>	-	-	+	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-
Crescimento em TSI	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
H ₂ S (TSI)	-	-	-	-	-	-
Teste Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+
Nitrato	-	-	-	-	-	-
β -hemólise	+	-	+	+	-	-
Carboidratos						
Manitol	-	-	-	-	-	+
Xilose	-	-	+	+	-	-
Ramnose	+	V	-	-	V	-
Dextrose	+	+	+	+	+	+

A: reação em TSI (ágar tríplice ferro); rampa/fundo: A=ácido, K=alcalino

V: variável

Fonte: adaptado de Holt et al, 1994.

L. monocytogenes, assim como as demais espécies do gênero, são de natureza ubíqua, sendo comumente encontradas em águas residuárias, rios, solos, plantas, particularmente em material vegetal em decomposição e ambiente tanto úmido como seco (FRANCO; LANDGRAF, 2002; SAUDERS, WIEDMANN, 2007). Essa espécie foi reconhecida como um patógeno humano desde antes dos anos 70, mas somente nas quatro últimas décadas foi associado com alimentos e classificado como patógeno de origem alimentar (GOMBAS et al., 2003).

Devido a gravidade da enfermidade causada por *L. monocytogenes* e o envolvimento de alimento como veículo de contaminação, as indústrias processadoras de alimentos, foram alertadas para a importância da ocorrência desse microrganismo em seus produtos. Por isso, cuidados devem ser tomados para evitar a contaminação do produto durante o processamento, como também evitar a recontaminação do produto final (REIJ et al., 2004).

Essa bactéria tem a habilidade de crescer e suportar condições adversas de pH, baixas temperaturas, altas concentrações de sal, barreiras que são comumente utilizadas nas indústrias alimentícias, para dificultar o crescimento de microrganismos patogênicos (GANDHI; CHIKINDAS, 2007).

Além disso, possui habilidade de colonizar superfícies e formar biofilmes em superfícies de equipamentos da indústria de alimentos e ali permanecer por longos períodos de tempo, havendo relatos de sobrevivência superior a 10 anos (TOMPKIN, 2002; SWAMINATHAN, GERNER-SMIDT, 2007). Os biofilmes são complexos ecossistemas microbiológicos, embebidos por uma matriz de polímeros orgânicos, aderidos a uma superfície. A formação de biofilmes aumenta a resistência a antimicrobianos, como sanitizantes e desinfetantes, desta forma, sendo uma preocupação para a indústria, pois se trata de uma possível fonte de contaminação cruzada (ROBBINS et. al., 2005).

3.3 Sorotipos

As bactérias do gênero *Listeria* podem ser submetidas à sorologia, possibilitando a divisão em sorogrupos com base nos antígenos somáticos (O) e flagelares (H), o que pode ser utilizado como uma ferramenta clássica para os estudos epidemiológicos, bem como auxiliar o rastreamento de contaminações alimentares e ambientais (ROCOURT; BUCHRIESER, 2007).

Cepas de *L. monocytogenes* possuem diferentes determinantes antigênicos expressos na superfície celular, incluindo ácidos lipoprotéicos, proteínas de membrana e estruturas extracelulares (como flagelos e fímbrias). Essas diferenças influenciam na tipificação sorológica. As cepas de *L. monocytogenes*, são divididas em 13 sorotipos, baseado nos antígenos somático (O) e flagelar (H): 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e e 7 (tab. 2) (ROCOURT, 1994).

Tabela 2- Sorotipos de algumas das espécies de *Listeria*

Espécies	Sorotipos
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e e 7
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. innocua</i>	6a, 6b, 4ab, não tipável
<i>L. welshimeri</i>	6a, 6b
<i>L. seeligeri</i>	1:2b, 4c, 4d, 6b, não tipável

Fonte: Lovett, 1980.

A sorologia aplicada como teste individual, sem caracterização bioquímica, não se torna adequada para confirmar *L. monocytogenes*, uma vez que todas as espécies não patogênicas de *Listeria*, com exceção de *L. welshimeri*, compartilham um ou mais antígenos somáticos com *L. monocytogenes* (RYSER; DONELLY, 2001). Por essa razão, os métodos de sorotipagem têm sido sobrepostos com procedimentos moleculares, que intrinsecamente são mais específicos e sensíveis para identificação e diferenciação de espécies de *Listeria* (LIU, 2006).

De modo geral, qualquer cepa de *L. monocytogenes* pode ser considerada potencialmente patogênica para os humanos. Entretanto, como alguns sorotipos são mais comumente identificados em casos ou surtos de listeriose, especula-se que *L. monocytogenes* apresente virulência heterogênea (JACQUET et al., 2002).

Os principais sorotipos identificados em listeriose humana são 1/2a, 1/2b e 4b, os quais são relatados em mais de 90% dos casos de listeriose no mundo (DOUMITH et al., 2004; GOULET, et al., 2008). Em geral, linhagens 4b são mais frequentemente associadas com surtos, surgindo que este sorotipo, possa ter um maior grau de virulência, porém esta correlação não está devidamente esclarecida, uma vez que linhagens 1/2 são mais relacionadas com produtos alimentícios (LUNDÉN et al., 2004; JAY, 2005).

3.4. Listeriose

L. monocytogenes, é reconhecida como a única espécie do gênero *Listeria* que é patogênica para seres humanos, enquanto *L. ivanovii*, é patogênica para animais, causando abortos em ruminantes (WESLEY, 2007). Entretanto, dois casos de doença em humanos, envolvendo outras espécies de *Listeria* constam na literatura. Na França, há o relato de bacteremia seguida de morte causada por *L. innocua* sorotipo 6a, em uma idosa (PERRIN et al, 2003); em Israel, foi notificado um caso de listeriose, provocado por *L. ivanovii* (SNAPIR et. al., 2006).

A listeriose é uma enfermidade causada principalmente pela ingestão de alimentos contaminados por *L. monocytogenes*. A manifestação clínica da doença é descrita de duas formas, a listeriose invasiva e a listeriose gastrointestinal (não-invasiva). A incidência da listeriose invasiva humana, que atinge normalmente pessoas imunocomprometidas (idosos, mulheres grávidas, neonatos, indivíduos HIV soro positivos), é considerada baixa, variando entre 0,1 a 11,3 casos anuais por milhão de habitantes na Europa e nos EUA (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007). Contudo, é uma enfermidade importante para a saúde pública devido à sua alta taxa de letalidade, que varia de 20-30% dos casos (MANTILLA et al., 2007).

A listeriose não-invasiva caracteriza-se por infecções brandas, semelhantes a uma gripe, ou mesmo surtos de gastroenterite em indivíduos saudáveis, não chegando a evoluir para óbito. Os sintomas mais comuns da doença incluem mal-estar, fadiga, febre, podendo haver ou não presença de náusea, vômito, dores abdominais e diarreia (GAHAN; HILL, 2005). Em casos mais graves (listeriose invasiva), em indivíduos imunocomprometidos, ocorre meningite, meningoencefalite, encefalite, septicemia, podendo causar aborto em mulheres grávidas e até mesmo levar o indivíduo a óbito (MAKINO et al., 2005).

Apesar de *L. monocytogenes* ser frequentemente encontrada em alimentos crus de origem vegetal e animal, ela também é isolada de alimentos cozidos devido às contaminações cruzadas durante o processo industrial. Mesmo quando o patógeno está presente em pequenas quantidades no alimento inicialmente contaminado, sua capacidade de crescer durante a estocagem sob refrigeração permite que o número de bactérias atinja doses infectantes. Embora seja desconhecida, suspeita-se que, a dose infectante capaz de causar listeriose em indivíduos susceptíveis, seja da ordem de 10^2 - 10^3 células do patógeno e, em

indivíduos saudáveis, seja necessário uma dose maior, acima de 10^8 UFC. Entretanto, tais condições, podem variar, em virtude da virulência da cepa, dos diferentes tipos de alimento, além das condições imunológicas de cada indivíduo (DREVETS; BRONZE, 2008).

Dentre os principais alimentos frequentemente associados a listeriose de origem alimentar estão leite cru ou pasteurizado, queijos, sorvetes, vegetais crus, carnes e derivados, aves, peixes e frutos do mar (GOULET et al., 2008).

3.5 Fatores de Virulência

L. monocytogenes é um patógeno intracelular, com habilidade para penetrar, multiplicar-se dentro do citoplasma da célula do hospedeiro (macrófagos, fibroblasto) e invadir células adjacentes, além de se proteger do sistema imunológico do hospedeiro (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001). O processo infeccioso inicia com uma associação da bactéria com a membrana plasmática das células epiteliais das microvilosidades do trato intestinal do hospedeiro. Então, a célula bacteriana é internalizada pela célula hospedeira através de fagocitose, permanece no vacúolo por curto período de tempo e quando realiza a lise da membrana fagossomal é liberada no citoplasma da célula do hospedeiro, onde se multiplica rapidamente e induz a polimerização de filamentos de actina da célula do hospedeiro, formando longas caudas em uma das extremidades da célula bacteriana. Os filamentos de actina favorecem o deslocamento da bactéria no citoplasma, permitindo a invasão das células adjacentes dando início a um novo ciclo da infecção (SWAMINATHAN, 2001; VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001; SCHMIDT; HENSEL, 2004).

Este processo infeccioso requer a produção e ação de várias proteínas da bactéria sobre os componentes da célula hospedeira, para realizar seu ciclo de vida intracelular. As proteínas envolvidas em cada etapa da fisiologia celular da infecção são codificadas por genes de virulência específicos. A maioria dos genes conhecidos no ciclo de multiplicação de *L. monocytogenes* agrupa-se em um locus cromossomal de 9Kb, onde estão contidos seus genes de grande importância para o parasitismo intracelular: *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* e *plcB*, e mais três estruturas denominadas de x, y e z de função ainda desconhecida e localizadas numa das extremidades, após o gene *plcB* (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

3.5.1 Internalinas (InIA, InIB e InIC)

As internalinas são proteínas ácidas, expressas na superfície celular bacteriana, compostas de 800 aminoácidos, que têm a função de mediar a entrada da bactéria em células epiteliais (como as do epitélio intestinal), facilitando o contato entre parasita e hospedeiro (ROCHA, 2004).

3.5.2 Proteína p60

É uma proteína extracelular de *L. monocytogenes* e tem aproximadamente 60 KDa. A proteína está associada à adesão de bactérias em células eucarióticas, e é essencial para hidrólise da mureína, necessária para divisão celular bacteriana. A proteína p60 é codificada pelo gene *iap* (*invasion-associated protein*) e está presente em todas as espécies de *Listeria* (RODRIGUES-LAZARO, 2004).

3.5.3 Hemolisina

A hemolisina é considerada como o mais importante fator de virulência de *Listeria monocytogenes*, cuja secreção é essencial para a promoção de sua multiplicação intracelular, promovendo a lise da membrana fagossômica dentro dos macrófagos, permitindo o acesso da bactéria ao citoplasma do hospedeiro, onde a sua multiplicação ocorrerá. Esta proteína, também denominada Listeriolisina O (LLO), é classificada como uma citolisina porogênica sulfidrilo-ativada que promove a formação de grandes poros transmembrana responsáveis pela característica citolítica da proteína (FARBER; PERTERKIN, 1991).

3.5.4 Fosfolipases

Semelhantemente a hemolisina, a fosfatidilinositol fosfolipase C e a fosfatidilcolina são responsáveis pelo escape bacteriano dos vacúolos das células hospedeiras (ROCHA, 2004).

3.5.5 Proteína ActA

Proteína de superfície composta de 610 aminoácidos responsável pela polimerização da actina, promovendo a formação de uma espécie de cauda propulsora que é responsável pela movimentação intracelular da bactéria, levando-a a borda da célula para a infecção da célula vizinha (ROCHA, 2004).

3.5.6 Superóxido Dismutase e Catalase

Ambas as enzimas, também produzidas e secretadas pela bactéria, atuam na detoxificação dos radicais superóxidos gerados pela combustão oxidativa dentro da célula fagocítica e dentro do fagolisossoma da célula epitelial. Tais superóxidos, que são responsáveis pela destruição das bactérias dentro dos fagossomos, são convertidos em peróxido de hidrogênio pela ação do superóxido dismutase, o qual será clivado pela catalase em água e oxigênio, neutralizando o mecanismo de eliminação bacteriana realizado pelas células de defesa do hospedeiro (ROCHA, 2004).

3.6 Queijos versus *Listeria monocytogenes*

Conforme o artigo número 589 do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de leites e derivados, queijo é definido como, o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica de ácidos orgânicos isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL, 1997).

Atualmente os processos de fabricação são bastante difundidos e conhecidos, e a diversidade de queijos chega a mais de mil tipos diferentes, podendo variar o tipo de leite utilizado, o tipo de coagulação, o teor de umidade e consistência da pasta, o teor de gordura, o tempo de cura entre outros (PERRY, 2004). Porém as etapas de processamento de queijos passam basicamente pelas mesmas etapas,

salvo algumas peculiaridades entre eles, as etapas principais de processamento são: recepção da matéria-prima (leite); tratamento térmico ou não; adição do cultivo iniciador; formação da coalhada; corte da coalhada; agitação; dessoramento; moldagem; prensagem; salga, maturação ou não.

Queijos e outros derivados lácteos são alimentos que podem veicular listeriose, embora, até pouco tempo atrás, os casos de enfermidade provocados por esses produtos tenham sido reportados esporadicamente, acometendo poucos indivíduos. Entretanto, após o aumento da notificação de surtos de listeriose, associado ao consumo de leites e derivados lácteos, *L. monocytogenes* tornou-se um microrganismo de relevante importância na indústria leiteira, devido a alta taxa de mortalidade. A retirada do mercado, de produtos lácteos, geralmente queijos que não sofram tempo prolongado de maturação, queijos com média e alta taxa de umidade, contaminados pelo patógeno, atualmente tem sido mais freqüente (ARQUÉZ et al., 2005).

Os queijos são produtos alimentícios muito consumidos em todo o mundo, inclusive no Brasil. Os tipos de queijos mais consumidos no Brasil de modo geral são os de média e alta umidade, como o Prato/Lanche que sozinho, representa aproximadamente 40% da produção total de queijo no país, o Mussarela, Minas Frescal, Parmesão e Ricota (GOROSTIZA et al., 2004). Entretanto, o consumo e o tipo de queijo podem variar conforme os estados brasileiros; um exemplo disso é o queijo Coalho, muito produzido e consumido na região nordeste do país, que atualmente vem ganhando mercado nos demais estados brasileiros (CAVALCANTE; ANDRADE; SILVA, 2004).

Os queijos são alimentos derivados do leite, ricos em proteínas, carboidratos, cálcio, fósforo, zinco, iodo, selênio e vitaminas, sendo um alimento de alto valor biológico (NASSU et al., 2001).

Os queijos, em virtude de serem bastante nutritivos, tornam-se também uma fonte potencial para microrganismos deteriorantes e patogênicos, e veículos de DTA, uma vez que são muito consumidos e apreciados por uma ampla variedade de indivíduos, incluindo crianças, mulheres grávidas e pessoas idosas (NASSU et al., 2001).

Na indústria de laticínios, as principais vias de acesso de *L. monocytogenes* até o produto são: matéria-prima, utensílios e os equipamentos contaminados, o solo carregado pelos sapatos e roupas dos trabalhadores, mas pode ocorrer através do ar

ou do sistema de ventilação, da água empoçada e/ou condensada e dos carros de transporte, além da possibilidade desta ser carregada por operários ou visitantes doentes (SWAMINATHAN, 2001; REIJ et al., 2004).

Uma das fontes de contaminação de queijos por *Listeria spp.* pode ser o leite utilizado na sua elaboração. Atualmente, sabe-se que uma das vias, de contaminação do leite cru são: a mastite bovina e o ambiente de ordenha associado por práticas inadequadas de higiene, e que o processo de pasteurização adequado garante a destruição de *L. monocytogenes* no leite. Esta bactéria é encontrada em queijos, principalmente nos elaborados com leite sem pasteurização. Porém, em queijos elaborados com leite pasteurizado, este agente também já foi isolado. Os trabalhos realizados nas indústrias revelaram que a contaminação cruzada após a pasteurização do leite seria a fonte de contaminação dos queijos (REIJ et al., 2004).

Estudos sobre a ocorrência de *L. monocytogenes* relatam que sua presença tem sido constatada na linha de produção, no ambiente de processamento e no produto acabado, em vários estabelecimentos processadores de produtos lácteos. Convém ressaltar que, algumas cepas de *L. monocytogenes* podem estabelecer-se no ambiente de processamento e então permanecerem como microbiota residente durante meses ou até anos (GUERRA; BERNARDO, 1999).

Considerando a importância de *L. monocytogenes* em produtos lácteos, a legislação brasileira estabelece ausência deste patógeno em 25g de amostra, para queijos com média, alta e muito alta umidade, uma vez que estes produtos são prontos para o consumo e que permitem a multiplicação de *L. monocytogenes*, tornando-se um risco para determinados grupos da população (ANVISA, 2001).

A contaminação microbiológica de queijos por *L. monocytogenes*, bem como por outros patógenos, assume destacada relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos (DTA), e por isso a investigação desses patógenos no queijo e na linha de produção de indústrias tem despertado o interesse de pesquisadores e fiscais sanitários.

3.7 Ocorrência de *L. monocytogenes* em queijos e indústrias de laticínios

A ocorrência de *L. monocytogenes* em leite e produtos lácteos tem sido relatada em muitos estudos, especialmente em queijos (WHER, 1987; AYGUN, PEHLIVANLAR, 2006; MANTILLA et al., 2007).

Pritchard et al. (1995) avaliaram indústrias processadoras de produtos lácteos, constatando a presença de *L. monocytogenes* em equipamentos como: tanque de armazenamento do leite, superfícies de mesa, transportadora, equipamento de filagem, envasadora de leite e máquina pré-filtradora de salmoura.

Outro estudo, conduzido no Egito por El Shenawy (1998) também demonstrou a presença do patógeno em manipuladores de unidade produtora de leite fluido. Esses mesmo autores isolaram *Listeria* spp. do piso, dreno e equipamentos de unidades produtoras de queijo.

Gabis et al. (1989) estudaram 18 estabelecimentos processadores de produtos lácteos desidratados e encontraram *L. monocytogenes* somente no dreno da área de recebimento de leite cru.

Em 2001, Corbia et al., investigaram *L. monocytogenes* em 58 amostras de queijos Minas Frescal, o patógeno esteve ausente em todas as amostras. Vieira et al. (2001) avaliaram a contaminação de *L. monocytogenes*, em 50 amostras de queijo Minas Frescal, em Araguaína, Tocantins, a presença do patógeno foi constatada em 8% das amostras.

No Ceará, a maior ocorrência de *L. monocytogenes* (19%) entre as amostras de queijo testados, foi constatada em queijo Coalho industrializado, armazenado sob refrigeração (BRANCO et al., 2003). Já, em queijo artesanal elaborado a partir de leite cru a prevalência desta bactéria foi baixa (zero a 2,3%) (BORGES et al., 2003; BRANCO et al., 2003).

Na Bahia, Silva et al. (2003) observaram a ocorrência de *L. monocytogenes* em 1% (2/218) das amostras avaliadas em duas indústrias processadoras de queijo tipo Minas frescal. A bactéria foi detectada no leite cru e no piso da sala de estocagem de leite em apenas uma das indústrias envolvidas no estudo.

Em outro estudo, Kabuki et al. (2004) realizaram um diagnóstico da contaminação por *L. monocytogenes* em três indústrias processadoras de queijos frescos tipo Hispânico, nos Estados Unidos, e constataram a presença desta bactéria em 6,3% dos queijos e 11% das amostras ambientais, tais como superfícies

de mesas, tubos de conexões de plástico, caixas vazadas, embalagem do leite, drenos e pisos.

No Japão, Makino et al. (2005) verificaram a presença de cepas de *L. monocytogenes* sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b em várias amostras do ambiente de processamento, em uma unidade produtora de queijos. A bactéria foi isolada no tanque de resfriamento do leite, na sala de produção e cura, em dreno e em fezes de trabalhadores.

Arslan e Özdemir (2008) observaram 33,1% de prevalência de *Listeria* spp. em 142 amostras de queijo branco, provenientes do comércio de Bolu/Turquia, sendo que 9,2% correspondia a *L. monocytogenes*, 9,2% a *L. innocua*, 5,6% a *L. seeligeri*, 4,9% a *L. grayi*, 2,1 % a *L. ivanovii* e 2,1% a *L. welshimeri*.

3.8 Surtos e casos de listeriose associados ao consumo de queijos e outros produtos lácteos

Por serem alimentos ricos nutricionalmente, leites e derivados, particularmente os queijos, constituem ambiente propício para multiplicação microbiana inclusive do patógeno *L. monocytogenes* que está envolvido em muitos casos e surtos de infecção humana associado ao consumo de alimentos (DE BUYSER et al., 2001).

Os queijos, especialmente do tipo mole, devem receber especial atenção, pois foram veículos de transmissão de listeriose em vários casos esporádicos e surtos (BEMRAH et al., 1998; DE BUYSER et al., 2001).

Em 1983, um surto associado ao consumo de leite pasteurizado integral e leite pasteurizado com 3% de gordura, que haviam sido submetidos a tratamento térmico inadequado, ocorreu em Massachusetts, EUA. Na investigação vários sorotipos de *L. monocytogenes* foram isolados de amostras de leite cru, e casos de listeriose também foram observados nas vacas produtoras do leite (FLEMING et al., 1985). Entre 1983 e 1987, no Cantão de Vaud, Suíça, 122 casos de listeriose foram tratados num hospital, envolvendo 58 adultos e 64 pares mãe e filho. A taxa de mortalidade foi de 28%, com 34 óbitos. Dos 120 isolados clínicos investigados no período epidêmico, 111 (93%) foram do sorotipo 4b, e destes, 98 (85%) foram isoladas de queijo Vacherin Mont D'Or. As pesquisas revelaram que as cepas isoladas do tipo "Vacharin Mont D'Or" eram do mesmo sorotipo e fagotipo da maioria das culturas humanas no período (BILLE, 1990).

Em Illinois nos Estados Unidos da América, no mês de julho de 1994, ocorreu um surto de listeriose caracterizado por sintomas de gastroenterite e febre após o consumo de leite achocolatado em um piquenique. Os isolados de *L. monocytogenes* das amostras de fezes dos doentes, do leite achocolatado e de amostras ambientais da indústria processadora eram do mesmo sorotipo, 1/2b, apresentavam perfil eletroforético enzimático e ribotipo semelhantes. Os exames revelaram que o surto ocorreu, provavelmente, devido a contaminação do produto durante seu processamento (após a etapa de pasteurização), e a manutenção do produto a uma temperatura que possibilitou o crescimento da bactéria durante o piquenique (DALTON et al., 1997).

Na Finlândia, entre janeiro de 1998 a abril de 1999, ocorreu um surto por *L. monocytogenes* sorotipo 3a, cujo produto atribuído como veículo foi manteiga pasteurizada. Os isolados das amostras de manteiga, dos pacientes, dos equipamentos e do ambiente (dreno) da indústria apresentaram o mesmo perfil eletroforético, sugerindo contaminação de origem ambiental durante o processamento, após a etapa de pasteurização (LYYTIKAINEN et al., 2000).

No período de 1989 a 1990, foram diagnosticados um surto e 69 casos de listeriose, na Dinamarca. Na investigação epidemiológica, o surto foi associado a queijo duro ou queijo de mofo azul (LUNDÉN; AUTIO; KORKEALA, 2004).

Em 2001, houve um surto na Suécia, no qual 48 pessoas apresentaram gastroenterite após consumir produtos lácteos produzidos em uma fazenda. As investigações epidemiológicas constataram que queijo fresco elaborado a partir de leite cru, contaminado por *L. monocytogenes*, foi o agente causador do surto. A genotipagem revelou que as cepas isoladas dos pacientes e dos produtos lácteos eram idênticas (CARRIQUE-MAS et al., 2003).

No Japão, em 2001, ocorreu um surto de listeriose não-invasiva, acometendo 84 pessoas. *L. monocytogenes* sorotipo 1/2b foi isolada de amostras de queijo, do ambiente de processamento e de fezes dos pacientes. As investigações epidemiológicas e a genotipagem das cepas evidenciaram que o surto foi causado realmente pelo consumo de queijo (MAKINO et al., 2005).

Em 2002, ocorreu um surto de listeriose no Canadá, no qual foram envolvidas 17 pessoas. As investigações epidemiológicas atribuíram o surto ao consumo de queijo maturado por 60 dias, produzido a partir de leite submetido a tratamento térmico insuficiente (GAULIN et al., 2003).

No ano de 2007, em Massachusetts, foi relatado um surto de listeriose, envolvendo cinco pessoas, com óbito de três idosos, associado ao consumo de leite pasteurizado, adquirido de um laticínio local (CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION, 2008).

No Brasil, surtos e casos esporádicos de listeriose causados por produtos alimentícios ainda não foram documentados, embora a ocorrência do patógeno tenha sido relatada em várias pesquisas (LIMA, 2004; BORGES, 2006; MANTILLA, 2007, NALÉRIO et al., 2009).

3.9 Susceptibilidade a antimicrobianos

Bactérias do gênero *Listeria* são normalmente susceptíveis aos antibióticos utilizados contra bactérias Gram-positivas (CASTRO, 1989), mas desde o primeiro relato de isolamento de uma cepa multirresistente (resistente a dois ou mais antibióticos), na França em 1988 (POYART-SALMERON et al., 1990), outras cepas resistentes a um ou mais antibióticos têm sido recuperadas a partir de alimentos, meio ambiente e casos esporádicos de listeriose humana. Dessa forma, tornam-se um risco para saúde pública, pois essas bactérias não são inibidas durante o tratamento com antibióticos de primeira escolha (SAFDAR, ARMSTRONG, 2003; ZHANG et al., 2007).

A resistência bacteriana pode ser natural ou adquirida. A natural corresponde a uma característica da espécie bacteriana, e a adquirida, à característica de uma ou mais amostras da espécie (TRABULSI, 2008).

O uso desregrado de antimicrobianos em animais e em seres humanos pode selecionar populações bacterianas resistentes. Na alimentação animal, antibióticos são utilizados para o controle e tratamento de doenças infecciosas bacterianas, bem como para promoção de crescimento (PHILLIPS et al., 2004). Além disso, mutações cromossômicas e falta de pressão seletiva podem ter contribuído para a propagação de bactérias resistentes em alimentos (CONTER et al., 2009).

Listeria spp. podem adquirir genes de resistência a antibióticos através de plasmídeos e transposons de outras espécies bacterianas (incluindo *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp.) quer *in vitro* ou *in vivo* (POURSHABAN et al., 2002).

A existência de plasmídeos R ou fatores R, que possuem como principal característica a presença de genes de resistência para antimicrobianos, é

considerada por muitos como a principal causa de resistência bacteriana (GOMES et al., 1989). Por sua vez, os transposons constituem pequenas moléculas de DNA que podem se inserir nos cromossomos ou plasmídeos trocando de posição e codificando a síntese de enzimas de resistência a antimicrobianos (TRABULSI, 2008).

De modo geral, o tratamento de primeira escolha para a listeriose é o uso de antibióticos β -lactâmicos (por exemplo, penicilina, ampicilina, oxacilina), isoladamente, ou em combinação com um aminoglicosídeo (gentamicina) em casos de pacientes imunocomprometidos (HOF, 2003). Porém, pode ser escolhido como tratamento de segunda escolha, o uso de sulfonamida associado com trimetoprim (exemplo sulfametoxazole), especialmente para pacientes alérgicos a β -lactâmicos (CHARPENTIER et al., 1995). Utiliza-se a vancomicina para o tratamento de listeriose que curse com bacteremia e a eritromicina em mulheres grávidas, (WHITE et al., 2002).

Hansen et al. (2005), pesquisaram a susceptibilidade aos antimicrobianos de cepas de *L. monocytogenes* isoladas de pacientes na Dinamarca, verificando que as cepas foram sensíveis aos antimicrobianos testados, incluindo penicilina, ampicilina e sulfametaxazole. A exceção foi a ciprofloxacina, à qual as cepas apresentaram sensibilidade moderada.

Em um estudo realizado na Itália, avaliando cepas isoladas em produtos lácteos e produtos cárneos, nenhuma *L. innocua* e nem *L. monocytogenes* foram resistentes ao cloranfenicol e apenas quatro cepas de *L. monocytogenes* e quinze de *L. innocua*, foram resistentes a um ou mais agentes antimicrobianos, incluindo eritromicina, canamicina, gentamicina, rifampicina, tetraciclina e sulfametazol/trimetoprim (FACINELLI et al., 1991).

No Brasil, treze amostras de *L. monocytogenes* isoladas de doze casos clínicos de listeriose, ocorridos no período janeiro de 1995 a maio de 2005, na região sudeste de São Paulo, foram submetidas a testes de sensibilidade em relação aos seguintes antimicrobianos: vancomicina, ampicilina, gentamicina, trimetoprim e sulfametoxazol. Nenhum dos isolados clínicos mostrou-se resistente, exceto sete cepas que tiveram sensibilidade reduzida a sulfametoxazol (LEMES-MARQUES, et al., 2007).

Yucel et al. (2005) isolaram *Listeria* spp. (79) em carne bovina e produtos cárneos, e *L. innocua* e *L. monocytogenes* foram altamente sensíveis a cloranfenicol (88-100%), mas foram resistentes a ampicilina (66-100%).

Arslan e Özdemir (2008) avaliaram o perfil antimicrobiano de *Listeria* spp. isoladas de queijos, e verificaram que resistência a penicilina (12,8%) foi a mais comum entre os isolados, porém, todos isolados foram sensíveis ou apresentaram sensibilidade intermediária à amoxicilina/cluvulanato, vancomicina, ciproxaxin, rifampicina, gentamicina, trimetoprim/sulfametaxazol.

Em estudo recente, *L. monocytogenes* isoladas de produtos lácteos, apresentaram alta sensibilidade à gentamicina, à eritromicina e à vancomicina (HARAKEN et al, 2009).

O estudo da susceptibilidade a antimicrobianos é importante, porque proporciona a identificação da emergência de linhagens resistentes e fornece informações úteis para o desenvolvimento de políticas de saúde pública na utilização de antibióticos, além de poderem ser empregados como marcadores epidemiológicos fenotípicos (VAZ, 2007).

3.10. Coliformes totais e coliformes termotolerantes (a 45°C)

As bactérias do grupo coliforme, são bastonetes curtos, Gram-negativas, pertencentes a família *Enterobacteriaceae* e não esporogênicos, aeróbios e anaeróbios facultativos, catalase positiva e oxidase negativa que fermentam a lactose com produção de gás (ICMSF, 1998; HOLT et al., 2000).

Fazem parte do grupo dos coliformes totais, as enterobactérias capazes de fermentar a lactose com produção de ácido e gás, em 24-48h a 35°C. Mais de vinte espécies se encaixam nesta definição, entre estas, bactérias originárias do trato gastrointestinal de animais de sangue quente, da mesma forma que bactérias não entéricas, como exemplo, *Serratia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, etc. (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

Pertencem às bactérias do grupo dos coliformes termotolerantes, um número restrito dos membros dos coliformes totais, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24h a 44,5-45,5°C (FRANCO; LANDGRAF, 2002). Este grupo é composto principalmente por *Escherichia coli*, cujo habitat primário é o intestino de humanos e animais, e por isso sua presença em alimentos, constitui um indicador de

contaminação fecal (FRANCO; LANDGRAF, 2002). Ainda fazem parte deste grupo algumas espécies de *Enterobacter* e *Klebsiella*, também termotolerantes que produzem ácidos e gás a partir da lactose, mas sua origem não faz parte exclusivamente da microbiota normal do intestino de animais de sangue quente, sendo encontrados também em outros ambientes, como solo e vegetais, onde persistem por íterim superior ao das bactérias patogênicas de origem intestinal (ICMSF, 1998; HOLT et al., 2000).

Bactérias do grupo dos coliformes são facilmente inativados pelos sanitizantes ou pelo tratamento térmico, quando aplicados adequadamente. Por este fato, quando encontrados em níveis consideráveis em alimentos processados, a presença de coliformes indica processamento inadequado e/ou recontaminação pós-processamento, podendo ser oriunda da matéria-prima, da manipulação sem cuidados de higiene, ou de superfícies sujas de equipamentos contaminados ou ambiente. Além disso, indica proliferação microbiana que poderia permitir a multiplicação de microrganismos patogênicos e toxigênicos (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

Segundo Fox et al. (2000), a contagem elevada de coliformes em queijos, promove o estufamento precoce nestes produtos, caracterizado pela produção de gás em 1 a 2 dias após a sua fabricação.

A ocorrência de coliformes termotolerantes e *E. coli* em queijos elaborados a partir de leite pasteurizado ou não, tem sido relatada em muitos países. *E. coli* foi o agente etiológico em 11 surtos atribuídos ao consumo de leite e queijos, ocorridos na França e outros países industrializados, no período de 1988 a 1997 (DE BUYSER et al., 2001). Neste mesmo período, os autores também verificaram que o leite e produtos lácteos foram implicados em 5% (3.839) dos surtos de origem bacteriana

Leite et al. (2000) evidenciaram que 35% (7/20) das amostras de leite tipo C, comercializadas em Salvador – BA, apresentavam contaminação por coliformes à 45°C em níveis superiores aos limites preconizados pela legislação.

Em queijo Coalho, a ocorrência de coliformes fecais em níveis superiores aos fixados pela legislação também tem sido relatada em vários estudos. No Ceará, Borges et al. (2003) avaliaram 43 amostras de queijo Coalho, produzidos em 11 municípios pertencentes a cinco microrregiões produtoras de leite e verificaram que 74% das amostras estavam contaminadas por coliformes fecais e *E. coli* em níveis superiores ao estabelecido na legislação. Carvalho (2003) também constatou

contagens de coliformes fecais acima do limite permitido pela legislação em 34,4% (93) das amostras de queijo Minas frescal analisadas.

3.11 *Salmonella* spp.

Salmonella spp. é um grupo bacteriano amplamente difundido na natureza, podendo estar presente no solo, no ar, nas águas residuais, nos equipamentos, mas seu habitat natural é o trato intestinal dos seres humanos e dos animais, principalmente aves (OKURA, 2002). As bactérias pertencentes a este gênero são bacilos retos, Gram-negativos, móveis quando apresentam flagelos peritríquios, inclusos na família *Enterobacteriaceae*. São mesófilos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, crescem em ampla faixa de pH (4,5 a 8,0), com ótimo entre 6,0 a 7,5, e a atividade de água para crescimento varia de 0,93 a 0,96. São fermentadores de glicose, mas não de lactose e sacarose, geralmente produzindo gás e H₂S; são oxidase negativa e catalase positiva (ICMSF, 1998).

As enfermidades causadas por *Salmonella* spp. abrangem, de modo geral, três grupos: febre tifóide (causadas por *Salmonella* Typhi), febre entérica (causada por *Salmonella* Paratyphi) e as enterocolites ou salmoneloses, causadas pelas demais salmonelas (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

O mecanismo de patogenicidade se desenvolve pela penetração e passagem da *Salmonella* do lúmen intestinal para dentro do epitélio que reveste a parede intestinal, onde ocorre a inflamação. O período de incubação é de 6-72 horas, seguido pelo início dos sintomas agudos, com diarreia, náusea, vômito, cãimbra abdominal, podendo haver febre e dores de cabeça. Algumas consequências crônicas, como sintomas de artrite, podem persistir por 3-4 semanas após o início dos sintomas agudos (ICMSF, 1998).

A dose infectante oscila entre $2,0 \times 10^1$ a $1,0 \times 10^6$ células por grama de alimento ingerido. Os sintomas e a severidade de uma salmonelose podem variar de branda a severa, dependendo do sorotipo de *Salmonella* spp. envolvido, da idade e saúde do indivíduo, sendo que crianças com até cinco anos e pessoas com sistema imunológico comprometido são mais susceptíveis (WERBER et al., 2005).

As salmoneloses constituem um dos problemas mais significantes de saúde pública no mundo, representando custos econômicos significativos para a sociedade, em muitos países. A ocorrência de *Salmonella* spp. em alimentos tem

sido registrada em todo o mundo, sendo um dos principais agentes microbianos envolvidos em surtos de DTA (DALTON et al., 2004; CDC, 2005), com grande parte dos surtos associada ao consumo de produtos de origem animal, como, aves, ovos, carnes, leite e produtos lácteos. Em relação aos laticínios, a contaminação é quase sempre causada, por leite cru ou inadequadamente pasteurizado (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

Surtos de salmonelose atribuídos ao consumo de leite e produtos lácteos têm sido relatados em diversos estudos (OLSEN et al., 2000; HERVEY et al., 2003). Leite e queijos têm merecido destaque como veículo de *Salmonella* spp. Na Itália, Busani et al. (2005) pesquisaram a prevalência desse microrganismo em diversos tipos de alimentos de origem animal e constataram sua presença em 2,2% das amostras (1.576/71.643), sendo detectado em 1,1% das amostras de queijos.

Salmonella spp. pode se multiplicar durante a fabricação e sobreviver em vários queijos por mais de 60 dias (ICMSF, 1998), o que ressalta a importância do controle da qualidade microbiológica do produto, devido a sérias enfermidades que essa bactéria pode causar, além de prejuízos econômicos. Ressalta-se que a legislação brasileira estabelece ausência em 25g desta bactéria em alguns alimentos, inclusive em queijos (BRASIL, 2001).

3.12 Estafilococos coagulase positiva

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae*, sendo composto por bactérias Gram-positivas, mesófilas, que se apresentam na forma esférica, de 0,5 a 1,5µm de diâmetro, tendendo a formar agrupamentos semelhantes a cachos de uva (GARRITY; HOLT, 2001). Estafilococos são anaeróbios facultativos, não esporogênicos, imóveis, catalase positiva e oxidase negativa. Geralmente toleram até 10% de sal a 37°C e podem crescer em valores de atividade de água inferiores aos considerados como mínimo para bactérias não halofílicas (HOLT, 2000; FRANCO; LANDGRAF, 2002).

Fazem parte do gênero, atualmente, 41 espécies, sendo *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), considerada a mais virulenta, e um patógeno de grande impacto econômico, causando um amplo espectro de infecções em humanos e animais. (COUZINET et al., 2005; DEURENBERG ; STBBERNINGH, 2008).

S. aureus, em humanos, é um patógeno oportunista que causa um amplo espectro de enfermidades que incluem: infecções cutâneas, intoxicação alimentar, endocardites, pneumonia, osteomielite e artrite séptica (SANCHES et al., 2002; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). Já em animais, este patógeno é um importante agente etiológico de mastite em vacas, cabras e ovelhas, causando uma infecção crônica e profunda na glândula mamária de fêmeas lactantes. A mastite causa sérias perdas econômicas para a produção leiteira e representa risco para a saúde pública (AIRES-DE-SOUSA et al., 2007).

Staphylococcus são de natureza ubíqua, tendo a pele e membranas mucosas, especialmente a região naso-faríngea de mamíferos e aves, como seu reservatório primário. Estima-se que 25 a 40% da população humana carregam *S. aureus*, o que torna essa espécie, um importante indicador de higiene pessoal e de qualidade de alimentos (BANNERMAN, 2003; LUONG et al., 2006).

A intoxicação estafilocócica é causada pela ingestão de alimentos contendo enterotoxinas pré-formadas, produzidas por estafilococos enterotoxigênicos, como *S. aureus* (com maior prevalência), *S. hyicus*, *S. intermedius*, entre outras espécies. Esta intoxicação é um dos tipos mais comuns de DTA (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). Para a formação de enterotoxinas em quantidade suficiente para provocar intoxicação, autores citam que, sejam necessárias 10^5 a 10^6 células de *Staphylococcus* enterotoxigênicos por grama de alimento (FRANCO; LANDGRAF, 2002). A presença dessas proteínas tóxicas extracelulares em alimentos é preocupante, pois são termoresistentes e também resistentes a proteases gastrointestinais (JABLONSKI; BOHACH, 2001).

Condições diversificadas são atribuídas ao crescimento e produção de estafilococos e suas enterotoxinas em alimentos, como matéria-prima contaminada (leite de vacas com mastite, por exemplo), preparo de alimentos por tempo prolongado, refrigeração inadequada, permitindo a multiplicação do patógeno, higiene pessoal deficiente, aquecimento e cozimento inadequados (SORIANO et al. 2002).

Vários alimentos são incriminados em casos e surtos de intoxicação estafilocócica, mas especialmente, aqueles que envolvem uma grande manipulação, sendo os derivados de leite, os mais frequentemente envolvidos (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003; LAMAITA et al., 2005; PELLEES, et al., 2007)

Cunha Neto et al. (2002) isolaram estafilococos enterotoxigênicos de diversos alimentos, incluindo queijo tipo coalho e leite em pó integral, comercializados em Recife/PE. As contagens de estafilococos coagulase positiva variaram de 10^2 a $1,5 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ para estes dois alimentos e 100% das cepas isoladas de queijo de coalho foram positivas para enterotoxinas estafilocócicas clássicas.

Normanno et al. (2005), no período de 2000 a 2002, na Itália, pesquisaram estafilococos coagulase positiva e *S. aureus* em 9.869 amostras de vários produtos de origem animal, sendo 3.097 de leite (leite cru e leite pasteurizado) e derivados (queijo, coalhada, ricota, sorvetes e outros produtos lácteos). A presença desses microrganismos foi constatada em 21% (641) das amostras. Dentre os 364 isolados obtidos, 362 foram identificados como *S. aureus* e, destes, 217 (59,9%) eram enterotoxigênicos.

Até pouco tempo atrás, a produção de enterotoxinas era atribuída exclusivamente a *S. aureus*, espécie coagulase positiva (BENNET, 1996). Em 2001, a legislação brasileira de padrões microbiológicos para alimentos alterou a determinação de se avaliar *S. aureus* para enumeração de “estafilococos coagulase positiva”, devido à correlação entre a produção de coagulase e a capacidade enterotoxigênica (BRASIL, 2001). No entanto, algumas espécies de estafilococos coagulase negativa, têm sido apontadas como capazes de produzir enterotoxinas, como *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. xylosum*, *S. haemolyticus* (PEREIRA; PEREIRA, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Características dos laticínios pesquisados

Foram avaliados três laticínios, denominados A, B e C, sendo um dos laticínios sem inspeção sanitária e os outros dois sob diferentes níveis de inspeção, localizados em três cidades da região sul do Rio Grande do Sul. Foram realizadas duas coletas em cada um dos três laticínios.

4.1.1 Laticínio A

A primeira indústria avaliada neste estudo, denominada Laticínio A, localiza-se no Balneário Cassino - Distrito de Rio Grande/RS. Trata-se de um estabelecimento de pequeno porte, sem controle oficial sanitário durante o período de estudo. Essa indústria processa, aproximadamente, 200 litros de leite de búfalas diariamente, proveniente de seu próprio rebanho, que rende cerca de 40Kg de queijos por dia. A produção é realizada de acordo com pedidos de clientes e a distribuição dos produtos é realizada na cidade de Rio Grande e Pelotas.

A indústria conta com dois funcionários trabalhando no setor de queijaria.

4.1.2 Laticínio B

A segunda indústria avaliada neste estudo, denominada Laticínio B, localiza-se na cidade de São Lourenço/RS. Trata-se de uma indústria de pequeno porte, que destina cerca de 600 litros de leite por dia para a produção de queijo, com quatro funcionários, inspecionada por Veterinários da Coordenadoria de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal (CISPOA), Secretaria da Agricultura, Pecuária, Pesca e Agronegócio (SEAPPA) do Estado do Rio Grande do Sul. Processa aproximadamente 2100 litros de leite ao dia, provenientes de produtores da região. Comercializam seus produtos na cidade de São Lourenço e pequena região.

4.1.3 Laticínio C

A terceira indústria avaliada neste estudo, denominada Laticínio C, localiza-se na cidade de Pelotas/RS, é inspecionada pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), captando aproximadamente 400 mil litros de leite por dia, proveniente de vários produtores da região, sendo que a produção destinada para a queijaria é de 67 - 100 mil litros de leite por semana. Seus produtos são comercializados de modo geral em todo estado do Rio Grande do Sul.

O quadro de funcionários da queijaria é formado por treze pessoas.

4.2 Coleta das amostras

As amostras foram coletadas entre outubro de 2008 e março de 2010, sendo realizadas duas coletas em cada um dos três laticínios, totalizando seis coletas. Avaliou-se a linha de processamento de queijos de média e alta umidade, sendo avaliada no laticínio A, a linha de processamento do queijo Coalho e nos laticínios B e C as linhas de processamento do queijo Tipo Prato/Lanche. As amostras incluíam leite cru, leite pasteurizado, superfícies de mãos de manipuladores, além de amostras de superfícies ambientais, de equipamentos e utensílios ao longo das linhas de processamento dos queijos, bem como do produto final, totalizando 208 amostras. A amostragem seguiu metodologia preconizada pela APHA (2001).

Após cada coleta, as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas, contendo gelo, e transportadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA), da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), na Universidade Federal de Pelotas (UFPel), onde foram analisadas.

4.2.1 Leite

Coletou-se, em frascos estéreis, aproximadamente 300mL de leite *in natura*, no início do processo e logo após a etapa de pasteurização. Analisaram-se doze amostras de leite, sendo seis de leite cru e seis de leite pasteurizado em cada um dos três laticínios.

4.2.2 Mãos dos manipuladores

As seis amostras das superfícies das mãos dos manipuladores foram coletadas conforme Lima (2004). Realizou-se a lavagem das mãos dos manipuladores que atuavam durante o processo, dentro de sacos de amostragem individuais, contendo 100mL de solução salina a 0,85% esterilizada. No momento da análise, essas amostras provenientes das mãos dos manipuladores de cada laticínio foram misturadas, de forma a obter-se uma única amostra representativa dos manipuladores por laticínio. As amostragens nos laticínios A e B foram feitas com dois manipuladores, e a amostragem no laticínio C com quatro manipuladores. Seis amostras compreenderam o número total de amostras analisadas representando as superfícies das mãos dos manipuladores

4.2.3 Produto final

Os queijos de cada indústria foram coletados no dia seguinte, já na embalagem de comercialização. Foram coletados dois queijos Tipo Coalho provenientes das duas coletas realizadas no laticínio A, e quatro queijos Tipo Prato/Lanche, dois oriundos do laticínio B, e dois provenientes do laticínio C, totalizando seis amostras de produto final coletadas.

4.2.4 Amostras de superfícies do ambiente de processamento, equipamentos e utensílios

As superfícies das instalações, equipamentos e utensílios das linhas de processamento foram amostradas instantes antes do início da produção e os locais relativos à coleta de amostras estão discriminados nas Fig. 2, 3 e 4 para os laticínios A, B e C, respectivamente.

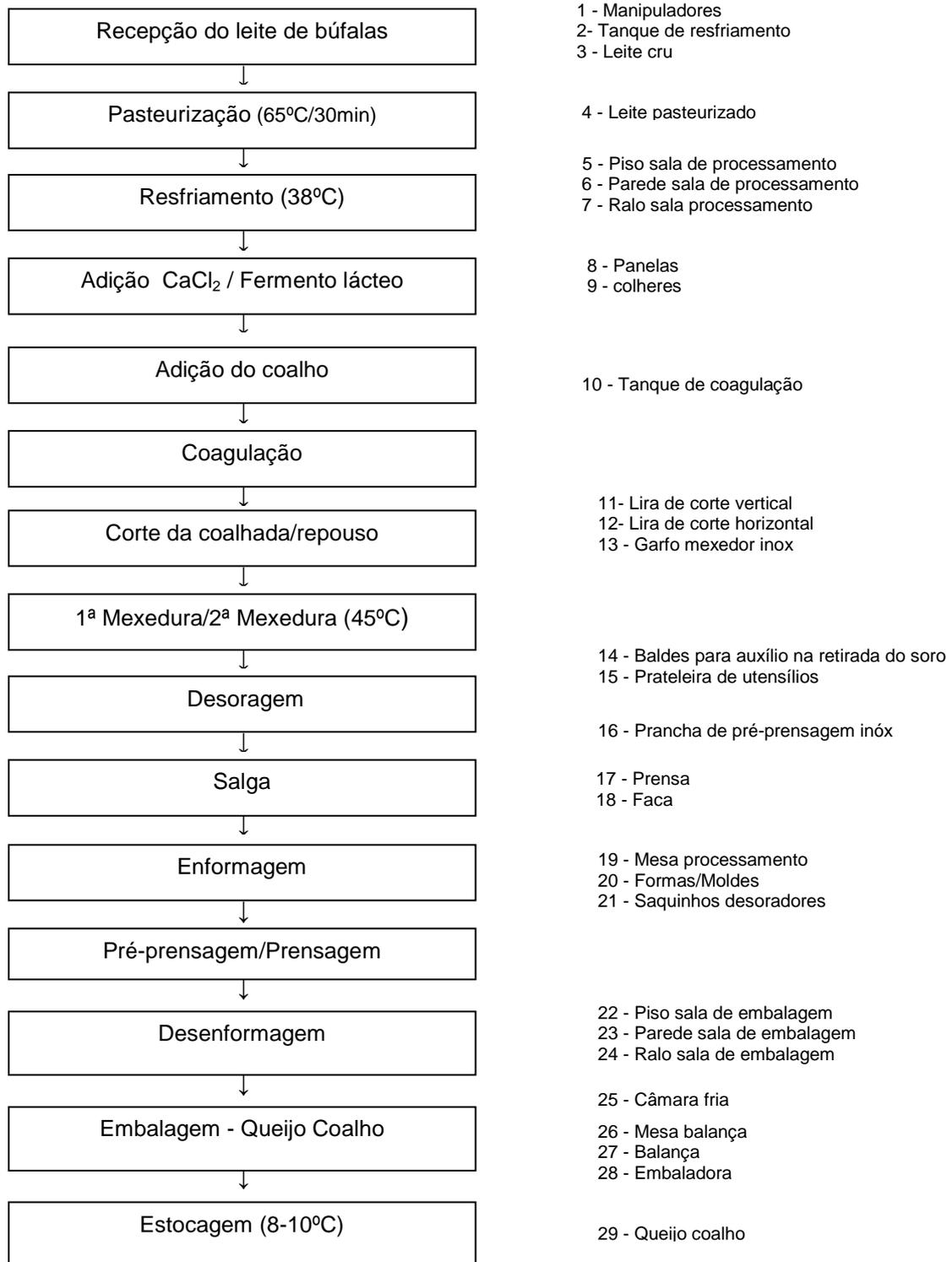


Figura 2 - Fluxograma de produção do queijo Coalho e pontos de amostragem no laticínio A.

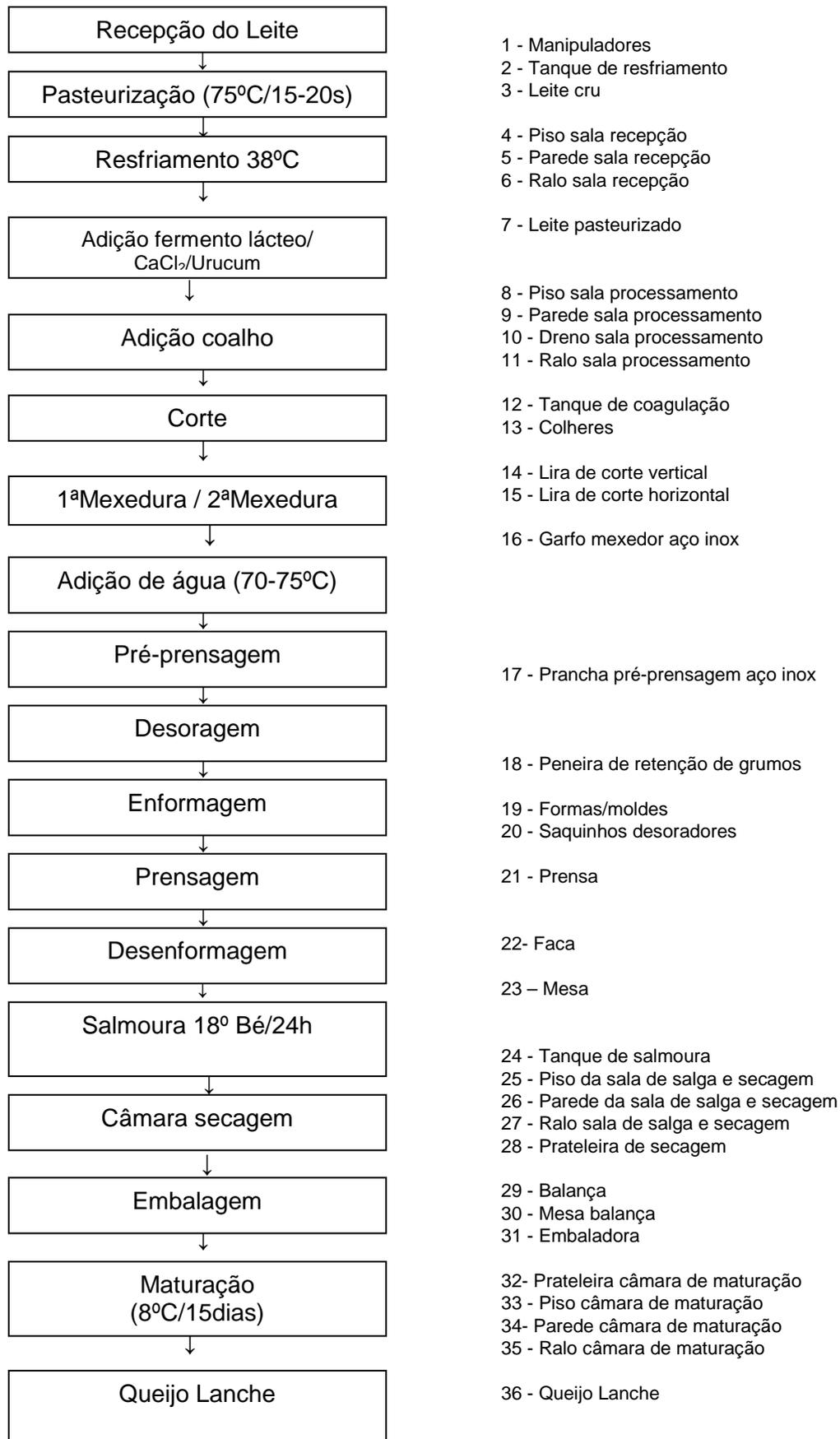


Figura 3 - Fluxograma de produção de queijo Prato/Lanche e pontos de amostragem no laticínio B.

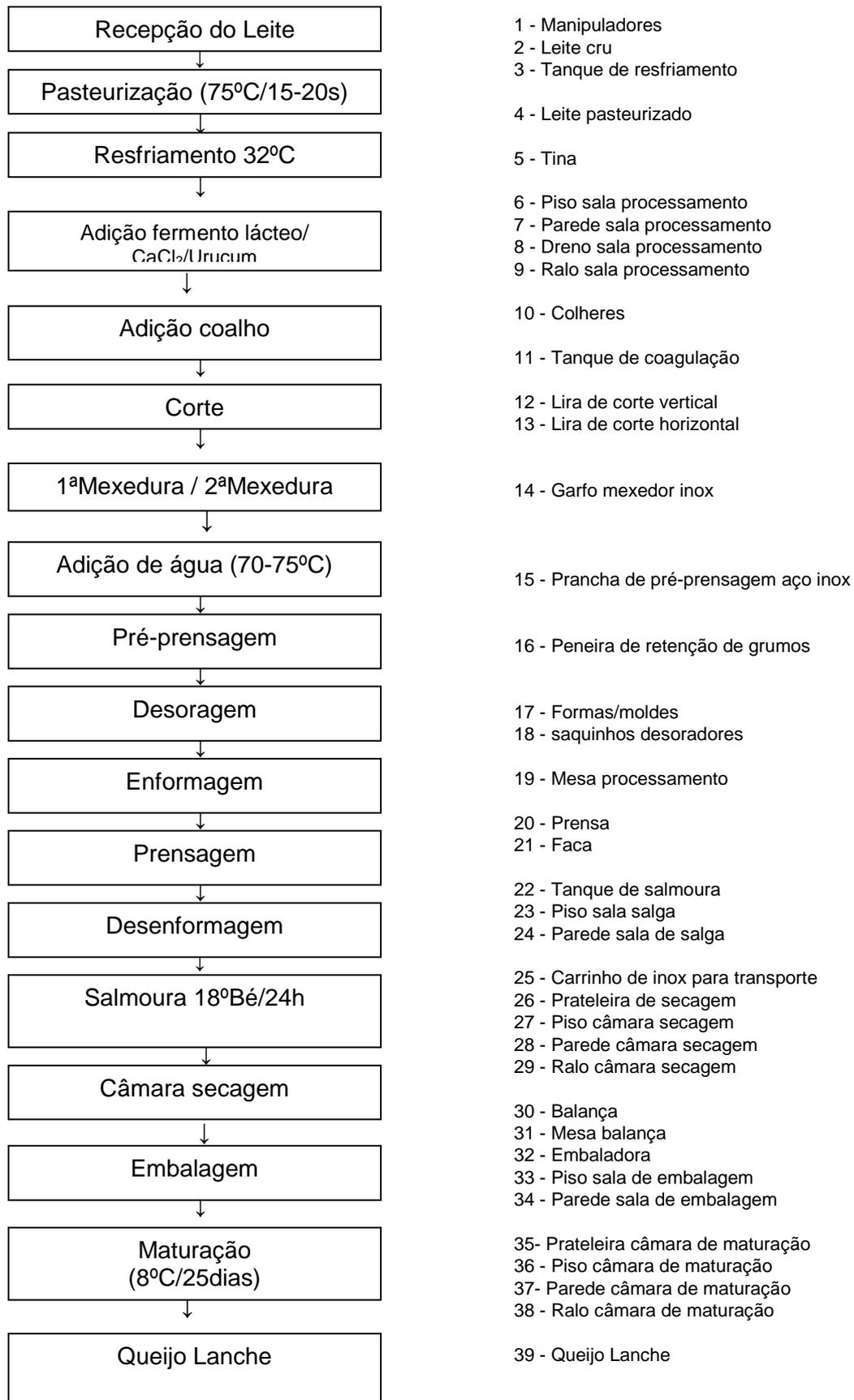


Figura 4 - Fluxograma de produção de queijo Prato/Lanche e pontos de amostragem no laticínio C.

O procedimento para amostragem procedeu-se com auxílio de *swabs* de algodão, estéreis, umedecidos com solução salina 0,85%. A técnica foi realizada com pressão e movimentos da esquerda para a direita e depois de baixo para cima, girando o *swab* continuamente para que toda superfície do algodão tivesse contato com a superfície a ser amostrada.

A área amostrada por ponto de coleta foi padronizada em 75cm², sendo amostrada por cada *swab* uma área de 25cm² delimitadas por moldes estéreis de aço inoxidável, em três áreas diferentes por pontos de amostragem, formando uma amostra composta de três *swabs*. No entanto, a área amostrada para pisos, paredes e câmara fria foi de 100cm², e a amostra composta foi de quatro *swabs*. Já a área amostrada para cada ralo foi de 25cm². Depois de cada ponto coletado, os *swabs* da amostra composta foram inoculados em um mesmo tubo de ensaio contendo 10mL de caldo de Enriquecimento para *Listeria* (LEB UVM-1 Oxoid[®]) adicionado de suplemento SR141E (Oxoid[®]).

Cada tipo de utensílio (faca, colher, molde/forma, etc), foi agrupado e amostrado em conjunto, onde cada tipo de utensílio, constava de três unidades amostrais, formando um ponto de amostragem. Posteriormente, os três *swabs* que compunham um ponto foram inoculados da mesma maneira que descrito anteriormente.

4.3 Preparo das amostras

O preparo de amostras seguiu os métodos preconizados pela American Public Health Association - APHA (2001). As amostras foram homogeneizadas e as alíquotas foram pesadas ou medidas volumetricamente no interior de uma capela de fluxo laminar.

4.3.1 Leite cru, leite pasteurizado e mãos de manipuladores

Três unidades analíticas de 25mL foram retiradas de cada amostra para frascos estéreis, com auxílio de provetas estéreis. Uma unidade analítica de cada amostra foi homogeneizada com 225mL de água peptonada 0,1% (Acumedia[®]), sendo realizadas as diluições decimais subsequentes na mesma solução, para

análise de Coliformes totais (Ct), Coliformes Termotolerantes (CT) e estafilococos coagulase positiva (ECP).

Uma unidade analítica de 25mL foi homogeneizada com água peptonada tamponada (Oxoid[®]) para análise de *Salmonella* spp. Outra unidade analítica de 25mL foi homogeneizada com 225mL de caldo de Enriquecimento para *Listeria* (LEB UVM-1Oxoid[®]) adicionado de suplemento SR141E (Oxoid[®]) para pesquisa de *Listeria* spp.

4.3.2 Amostras de superfícies ambientais, equipamentos e utensílios

Os tubos de ensaio contendo as amostras que foram coletadas com *swabs* e que já haviam sido inoculadas em 10mL de LEB no momento da coleta, foram homogeneizadas em agitador tipo *vortex* durante um minuto, e incubados ao chegar ao laboratório por 24 horas a 30°C, prosseguindo as etapas envolvidas na pesquisa de *Listeria* spp.

4.3.3 Produto final

Antes de abrir as embalagens, a área externa foi desinfetada com álcool 70%. A embalagem foi cortada com auxílio de uma tesoura previamente mergulhada em álcool 98,2°GL e flambada. De acordo com o *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (DUNCAN; YAUN; SUMNER, 2004), todo o conteúdo da unidade de amostra de queijo foi macerado com uma espátula estéril e foram retiradas três unidades analíticas de 25g de cada amostra, as quais foram acondicionadas em saquetas estéreis, homogeneizadas em *stomacher* com seus respectivos caldos de enriquecimento de acordo com a análise microbiológica referentes a bactéria a ser pesquisada, como descrito no item 4.3.1.

4.4 Isolamento e Identificação de espécies de *Listeria*

A verificação da presença de *Listeria* spp. e diferenciação entre as espécies foi realizada segundo metodologia preconizada por Farber et al. (1994).

4.4.1 Isolamento de colônias presuntivas de *Listeria* spp.

A metodologia de análise empregada para isolamento de colônias presuntivas de *Listeria* spp. constou de quatro etapas.

4.4.1.1 Enriquecimento seletivo primário

A partir das amostras preparadas, utilizou-se um enriquecimento seletivo primário em caldo de Enriquecimento para *Listeria* (LEB UVM-1 Oxoid[®]) adicionado de suplemento SR141E (Oxoid[®]) e posterior incubação a 30°C por 24 horas.

4.4.1.2 Enriquecimento seletivo diferencial

Após o período de incubação de 24 horas do enriquecimento primário, realizou-se um segundo enriquecimento, onde uma alíquota de 0,1mL de cada amostra retirada do LEB, foi inoculado em tubo com 10mL de caldo Fraser (Oxoid[®]) adicionado do suplemento SR156 (Oxoid[®]), incubando-se a 35°C por 48 horas.

4.4.1.3 Isolamento

As culturas que produziram escurecimento do caldo Fraser (devido à hidrólise da esculina, componente diferencial do meio), foram semeadas nos ágares Oxford (Oxoid[®]) adicionado de suplemento SR140 (Oxoid[®]) e Palcam (Oxoid[®]) adicionado do suplemento SR150E (Oxoid[®]), com auxílio de alça de platina, a fim de obter o isolamento de colônias típicas, sendo incubadas durante 48 horas a 35°C.

4.4.1.4 Subcultivo das colônias

Foram selecionadas de 3 a 5 colônias características de *Listeria* spp. de cada Placa de Petri (colônias com coloração cinza esverdeada com centro côncavo e halo negro em ágar Palcam e com coloração negra com centro côncavo e halo negro no ágar Oxford), as quais foram repicadas com o auxílio de uma agulha de inoculação para tubos de ensaio contendo ágar Triptona de Soja (Oxoid[®]) com 0,6% de Extrato de Levedura (Oxoid[®]) – TSA-YE, os quais foram incubados a 35°C por 24 horas.

Após, todos os isolados foram submetidos aos testes fenotípicos necessários à confirmação e identificação em nível de espécie.

4.4.2 Confirmação e identificação de *Listeria* em nível de espécie

Para o diagnóstico presuntivo do gênero *Listeria* foram realizados os seguintes testes: coloração pelo método de Gram para verificação das características morfotinturiais das bactérias (bastonetes curtos Gram +), produção de catalase e avaliação de motilidade a 25°C. Os isolados com características fenotípicas de *Listeria* spp. foram submetidos às provas bioquímicas, para a identificação em nível de espécie, a saber: produção de beta-hemólise em ágar Sangue de Cavalo (ágar Triptose de Soja com 5% de sangue desfibrinado de cavalo) e fermentação de carboidratos (dextrose, ramnose, xilose e manitol) e CAMP-test, se necessário.

A interpretação foi realizada conforme descrito na Fig. 5.

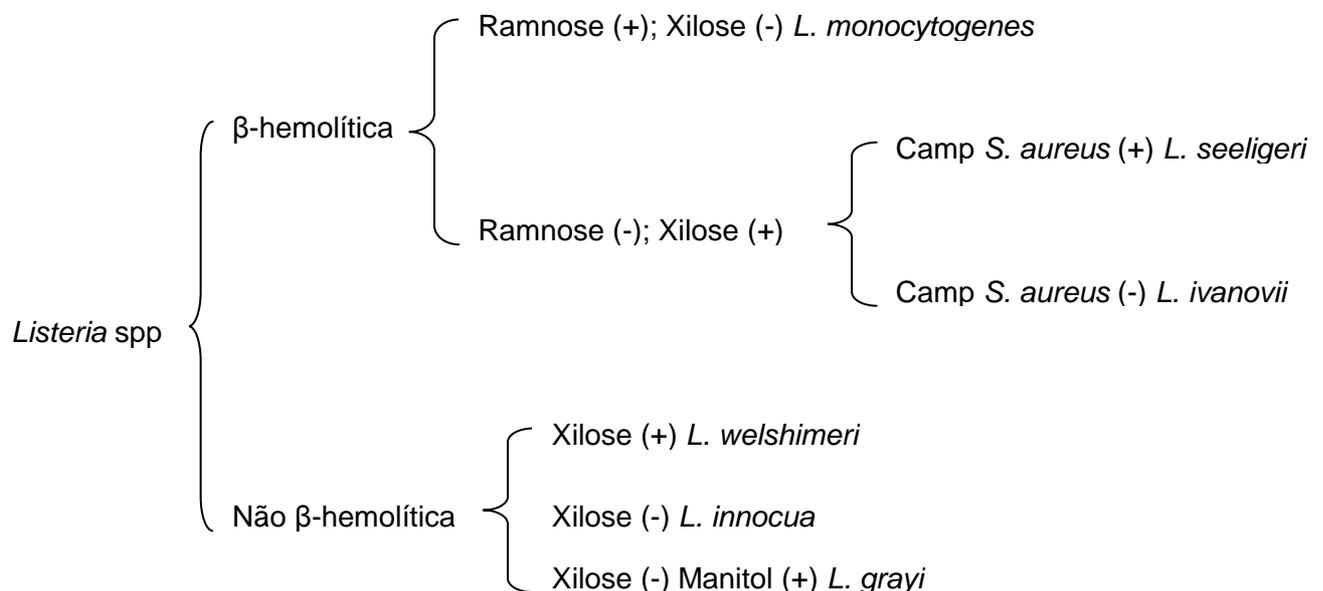


Figura 5- Chave dicotômica para identificação de espécies de *Listeria*.

Utilizou-se sempre cultivo de 24 horas para testar os isolados.

Os isolados a serem testados para motilidade, foram inoculados em tubos de ensaio contendo 4mL de Motility Test Medium (Difco), com auxílio de uma agulha de

inoculação, picando-se o ágar até o terço inferior à sua profundidade. Foi feita a incubação a 25°C, temperatura onde a motilidade característica de *Listeria* spp. é manifestada, observando-se por um período de até 7 dias. Foram efetuadas observações diárias, a fim de se constatar a presença da motilidade característica do gênero, ou seja, motilidade com aspecto de guarda-chuva no terço superior do ágar, indicando, também, a característica de microaerofilia apresentada por esses microrganismos.

Para o teste de produção de catalase, foi preparada uma suspensão bacteriana, a partir de cultivo recente em TSA-YE a ser testado, e de uma alçada de solução salina a 0,85% esterilizada, na superfície de uma lâmina de microscopia, previamente desengordurada com álcool etílico 98,2°GL. A essa suspensão, adicionou-se uma gota de água oxigenada a 3%, verificando-se o surgimento ou não de bolhas de oxigênio, por até 2 minutos, como consequência da presença ou não da enzima.

O teste de produção de β -hemólise foi executado em ágar Sangue de Cavalo (TSA-Sangue), sendo cada Placa de Petri demarcada em sua porção inferior de modo a identificar 10 espaços, onde cada espaço recebeu uma picada do respectivo isolado a ser testado. Após a inoculação, as placas foram invertidas e incubadas a 35°C por 24 horas. Decorrido esse intervalo, foram examinadas sob luz clara, de forma a identificar possíveis zonas de clareamento ao redor do crescimento bacteriano (hemólise), provocadas pela produção de β -hemolisina. O resultado para cada isolado foi registrado como não hemolítico (sem alteração no meio ao redor do crescimento bacteriano) ou β -hemolítico (com uma zona de clareamento total ao redor do inoculo).

No teste de fermentação de carboidratos, cada placa de ágar púrpura de Bromocresol, acrescida do respectivo açúcar (dextrose, ramnose, xilose ou manitol) a ser testado, foi demarcada, em sua porção inferior, identificando 10 espaços. Em cada espaço foi inoculada, por picada, uma das culturas. Após a inoculação, as placas foram incubadas, invertidas, por 24 horas a 35°C. O resultado positivo foi indicado pelo surgimento de um halo amarelo ao redor da picada, devido à produção de ácido pelo microrganismo, com mudança do indicador de pH do meio. Os resultados foram registrados como positivos ou negativos para cada carboidrato.

4.5 Sorologia dos isolados de *Listeria* spp.

Os isolados confirmados como *Listeria* spp. foram cultivados em tubos contendo TSA-YE, incubados a 30°C por 24 horas, e enviados ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), no Rio de Janeiro, onde realizou-se o processo de caracterização antigênica.

4.6 Determinação de *Salmonella* spp.

A determinação de *Salmonella* spp. foi baseada em protocolo estabelecido pela APHA (ANDREWES et al., 2001) com adaptações. Cada unidade de 25g ou mL de amostra foi homogeneizada com 225mL de água peptonada tamponada (APT - Acumedia[®]), durante 2 minutos. Após incubação por 24h a 35°C, 0,1mL da APT foi transferida para 10mL de Caldo Rappaport-Vassiliadis (RV-Oxoid[®]), o qual foi, incubado a 42°C por 24h em banho-maria, e 1,0mL transferido para 10mL de Caldo Tetrionato (TT-Oxoid[®]), o qual foi incubado a 37°C por 24h em estufa BOD com circulação de ar. Uma alçada destes caldos foi estriada em ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD-Oxoid[®]) e em ágar Hektoen Enteric (HE-Oxoid[®]), incubando-se a 35°C por 24h.

De duas a cinco colônias típicas de cada placa de XLD (colônias róseo escuro, com ou sem centro negro) e de HE (colônias verde azuladas, com ou sem centro negro) foram transferidas individualmente para tubos contendo ágar TSA (Oxoid[®]) inclinado, e incubadas por 24 horas a 35°C. Após, os isolados foram submetidos a provas bioquímicas para caracterização de *Salmonella* em ágar Triplece Açúcar Ferro - TSI (Acumedia[®]), ágar Uréia (Acumedia[®]) e ágar Lisina Ferro - LIA (Acumedia[®]), os quais foram incubados a 35°C por 24 horas.

Os isolados com reações características de *Salmonella* spp. em TSI (rampa alcalina e fundo ácido e em LIA (rampa e fundo alcalinos) e urease negativa, foram submetidos ao teste de aglutinação com antisoros polivalentes *Salmonella* somático e flagelar (Probac[®]). Os resultados foram expressos como presença ou ausência de *Salmonella* spp. em 25g ou mL.

4.7 Determinação de coliformes totais (Ct) e coliformes termotolerantes (CT)

A contagem foi realizada utilizando-se a Técnica do Número Mais Provável (NMP), empregando-se séries de 3 tubos, de acordo com recomendações da American Public Health Association - APHA (KORNAVACKI; JOHNSON, 2001). Alíquotas de 1mL das diluições das amostras foram transferidas para tubos contendo Lauril Sulfato Triptose - LST (Oxoid®) e incubadas a 35°C/24-48 horas. Foram considerados positivos aqueles tubos que apresentavam turvação e produção de gás visualizado em tubo de Durhan. Alíquotas provenientes dos tubos positivos foram transferidas para novos tubos contendo caldo Bile Verde Brilhante - VB (Oxoid®) e incubadas a 35°C/24-48 horas, e para tubos contendo caldo Escherichia coli - EC (Oxoid®) e incubadas a 45°C/24-48 horas em banho-maria para confirmação de coliformes termotolerantes

Para as amostras de leite, desprezou-se a etapa de incubação em LST, sendo as alíquotas diretamente transferidas para caldo VB e caldo EC, nas mesmas condições de procedimento e incubação citadas acima.

4.8 Determinação de estafilococos coagulase positiva

A determinação foi realizada de acordo com o método recomendado pela APHA (BENNET; LANCETTE, 2001). As diluições das amostras foram semeadas na superfície de ágar Baird Parker – BP (Acumedia®) suplementado com solução aquosa de telurito de potássio 1% e com 3% de emulsão de gema de ovo: salina (1:1) e as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. Após esse período, procedeu-se uma contagem presuntiva das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

Cinco colônias suspeitas (colônias circulares, pretas brilhantes, convexas, rodeadas por uma zona opaca e frequentemente com halo claro que se estende além da zona opaca), foram selecionadas e transferidas para caldo Infusão de Cérebro e Coração - BHI (Difco®), seguido de incubação a 35°C por 24 horas para confirmação, através da caracterização morfológica por coloração de Gram e dos testes bioquímicos de catalase e coagulase.

O resultado da enumeração de estafilococos coagulase positiva (UFC mL⁻¹ ou g⁻¹) foi corrigido de acordo com a diluição e quantidade de inóculo utilizados,

considerando-se o número de colônias típicas e atípicas contadas e a porcentagem de colônias coagulase positivas confirmadas (SILVA et al., 1997).

4.9 Avaliação da resistência de *Listeria* spp. a antimicrobianos

O perfil de resistência dos isolados de *Listeria* spp. foi avaliado frente a 15 antibióticos, pela técnica de disco-difusão em ágar, seguindo metodologia recomendada pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), 2005.

Os isolados, a serem testados, foram semeados em TSA-YE e incubados por 24 horas a 30°C. Após esse período, os subcultivos foram homogeneizados em solução salina estéril a 0,85%, padronizando-se a suspensão para uma turvação igual ao padrão número 0,5 da escala de Mac Farland. Placas de Petri contendo ágar Müller Hinton (Acumedia[®]) foram repicadas utilizando-se um *swab* esterilizado embebido com o inóculo, para o espalhamento homogêneo na superfície do meio. Após a absorção do inóculo, colocaram-se os discos dos diferentes antibióticos com auxílio de uma pinça previamente flambada e resfriada, incubando-se posteriormente a 30°C por 18-24 horas.

O diâmetro do halo de inibição ao redor de cada disco foi mensurado com régua em mm, e os valores foram comparados com os valores apresentados na tabela de interpretação do Clinical and Laboratory Standards Institute para bactérias Gram-positivas (CLSI, 2005), do NCLSI, e as cepas foram classificadas como resistentes, intermediárias ou sensíveis ao antibiótico analisado.

Neste estudo foram utilizados os seguintes antimicrobianos: Penicilina G (10U), Oxacilina (1µg), Vancomicina (30µg), Eritromicina (15µg), Clindamicina, (30µg), Ampicilina (10µg), Gentamicina (10µg), Tetraciclina (30µg), Cefaclor (30µg), Cloranfenicol (30µg), Rifampicina (5µg), Claritromicina (15µg), Ciprofloxacina (5µg), Sulfazotrim (25µg) e Amoxicilina/ácido clavulônico (30µg).

4.10 Avaliação da eficácia da pasteurização

As amostras de leite submetidas a pasteurização foram analisadas quanto à eficácia do processo, através da avaliação da atividade das enzimas fosfatase e peroxidase, de acordo com os métodos analíticos oficiais para controle de produtos

de origem animal e seus ingredientes II – Métodos físicos e químicos (BRASIL, 1981).

4.11 Avaliação microbiológica quanto aos padrões legais da RDC nº12 ANVISA (2001)

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Prato/Lanche e Coalho (SECRETARIA de DEFESA AGROPECUÁRIA, 1997 e 2001), estes queijos são classificados como queijos de média e alta umidade, respectivamente, cujos critérios microbiológicos, preconizados pela RDC 12/2001, da ANVISA são descritos na tab 3.

Tabela 3 - Padrões microbiológicos para queijos de média e alta umidade segundo a Resolução RDC nº12/2001, da ANVISA

Parâmetros	Critérios para amostra indicativa	
	Alta umidade (46%-54%)	Média umidade (36%-45%)
<i>L. monocytogenes</i>	Ausência em 25g	Ausência em 25g
<i>Salmonella</i> spp.	Ausência em 25g	Ausência em 25g
<i>Coliformes</i> a 45°C	5×10^3	10^3
Estafilococos coagulase positiva	10^3	10^3

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento de *Listeria* spp. em plantas de processamento de queijos de média e alta umidade

Neste trabalho foram avaliadas 29, 36 e 39 amostras por coleta, provenientes dos laticínios A, B e C respectivamente, a partir de duas coletas em cada laticínio. De um total de 208 amostras analisadas neste experimento, 16 (7,69%) apresentavam *Listeria* spp. Destas, sete (43,75%) foram isoladas no laticínio A, quatro (25%) no laticínio B e cinco (31,25%) no laticínio C (Fig. 6).

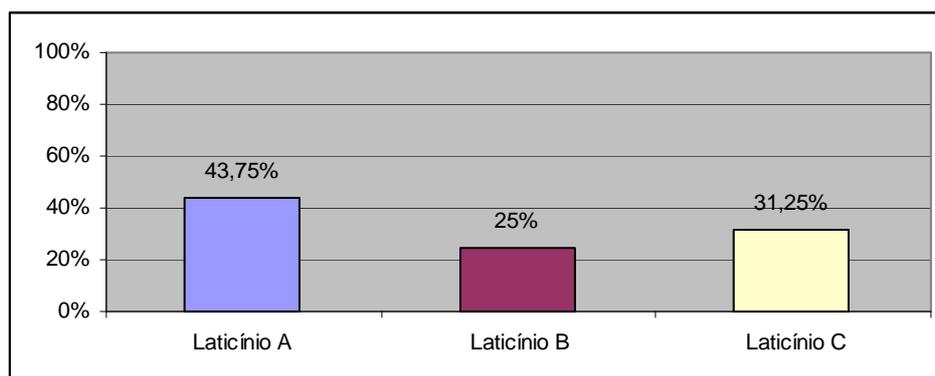


Figura 6 - Percentual de *Listeria* spp. isoladas nos laticínios A, B e C.

5.1.1 Matéria prima

Foram avaliadas seis amostras de leite cru, utilizadas como matéria prima para elaboração dos queijos nos três laticínios, sendo duas amostras provenientes de cada laticínio. Verificou-se a presença de *Listeria* spp. em 66,66% (4/6) das amostras, não sendo isolada a bactéria no laticínio A, ou seja, foi encontrada em 100% nas amostras provenientes dos laticínios B e C.

Entre as espécies de *Listeria* isoladas no leite cru, *L. monocytogenes* foi identificada em 50% (2/4) e *L. innocua* em 75% (3/4). É importante ressaltar que em uma amostra, proveniente da primeira coleta realizada no laticínio B, isolou-se ambas as espécies de *Listeria*.

Esse resultado é relevante, uma vez que outros autores no Brasil não têm isolado *Listeria* spp. em amostras de leite *in natura*. Mattos (2010) avaliou leite cru proveniente de 53 propriedades rurais do agreste pernambucano, não isolando essa bactéria. Da mesma forma, Nero et al. (2004) avaliaram 210 amostras de leite cru, provenientes de pequenas e médias propriedades localizadas em quatro importantes estados produtores de leite no Brasil (Paraná, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e São Paulo), não isolando *L. monocytogenes*.

Nesta pesquisa, evidenciou-se que o binômio tempo/temperatura durante a pasteurização do leite foi aplicado adequadamente em todos os laticínios, o que foi verificado pelos testes de fosfatase e peroxidase, que apresentaram resultado negativo e positivo, respectivamente, em 100% das amostras. Em função disso, nenhuma (0/6) das amostras de leite pasteurizado apresentou *Listeria* spp. Esse resultado corrobora a importância da pasteurização do leite, tendo em vista que o tratamento térmico adequado elimina as células viáveis de *Listeria* spp. e de outros patógenos, assim como da grande maioria das bactérias deteriorantes, que possam estar presentes na matéria prima utilizada na elaboração de produtos lácteos.

Já Catão e Ceballos (2001) investigaram a qualidade microbiológica de 45 amostras de leite *in natura* e na linha de produção (15 amostras de leite recém-pasteurizado e 15 de leite envasado), de uma usina de beneficiamento de leite em Campina Grande - PB, Brasil, sem, entretanto, avaliar o processo de pasteurização. Os autores verificaram que 33 amostras (73,3%) de leite cru e 9 (30%) das de leite pasteurizado estavam contaminadas com *Listeria* spp., sendo *L. monocytogenes* isolada em 17 (1,5%) amostras de leite cru e em 9 (100%) de leite beneficiado (4 recém-pasteurizadas e 5 envasadas).

Na tab. 4 é apresentada a ocorrência de *Listeria* spp. nas amostras de leite cru e de leite pasteurizado, utilizadas como matéria-prima na elaboração dos queijos de média e alta umidade, nos laticínios A, B e C.

Tabela 4 - Ocorrência de *Listeria* spp. em amostras de matéria prima para produção de queijos de média e alta umidade coletadas em três laticínios do sul/RS

Local de coleta	Matéria prima	Nº de amostras avaliadas	Nº de isolados	Espécies de <i>Listeria</i>	
				<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>
Laticínio	LC	2	0	*	*
A	LP	2	0	*	*
Laticínio	LC	2	2	2	1
B	LP	2	0	*	*
Laticínio	LC	2	2	0	2
C	LP	2	0	*	*

LC: leite cru; LP:leite pasteurizado; *: não isolada

A presença de 50% de *L. monocytogenes* entre as espécies de *Listeria* isoladas no leite cru, alerta para o risco deste patógeno na matéria-prima, já que diversos casos de listeriose no mundo tiveram como suas fontes, queijos elaborados a partir de leite cru contaminado por *L. monocytogenes* ou cujo tratamento térmico tenha sido ineficiente. Além disso, a presença desse patógeno na matéria-prima serve como porta de entrada para a bactéria na indústria, a qual pode formar biofilmes e tornar-se persistente na planta de processamento.

Segundo Brant (2007), queijos fabricados a partir de leite que não tenha sido submetido a tratamento térmico, apresenta maior risco de veicular microrganismos patogênicos, constituindo-se em questão importante para a saúde pública. Alguns surtos de listeriose têm sido relacionados ao consumo de derivados lácteos produzidos com leite não pasteurizado, bem como ao consumo de leite com pasteurização inadequada. Na Carolina do Norte, EUA, entre 2000 e 2001, ocorreu um surto de listeriose causado pelo consumo de queijo tipo mexicano artesanal, produzido a partir de leite cru, contaminado por *L. monocytogenes*, com 13 casos diagnosticados (MACDONALD et al., 2005). Em Massachusetts, também nos EUA, outro surto de listeriose, ocorreu no ano de 2007, envolvendo cinco pessoas, com óbito de três idosos, foi associado ao consumo de leite pasteurizado adquirido de um laticínio local (CDC, 2008).

5.1.2 Manipuladores

Embora muitos estudos descrevam a ocorrência de *Listeria* spp. em mãos e luvas de manipuladores em linhas de processamento de alimentos (SCHITTLER, 2008; VON LAER, 2004), isto não foi observado nesta pesquisa, onde nenhuma das

seis amostras de superfícies das mãos de manipuladores apresentou esses microrganismos.

A ausência de *Listeria* spp. nas mãos dos manipuladores avaliados neste experimento, indica adequados procedimentos de higienização, o que infere uma menor probabilidade de contaminação cruzada pelos manipuladores durante a fabricação dos queijos, fato que frequentemente tem sido descrito na literatura (MILLEZI et al., 2007).

5.1.3 Amostras de superfícies ambientais, equipamentos e utensílios

Das 184 amostras avaliadas, entre superfícies ambientais, de equipamentos e amostras de utensílios, 50 correspondiam a amostragens realizadas no Laticínio A, 64 no Laticínio B e 70 no Laticínio C. *Listeria* spp. foi isolada em 5,97% (11/184) das amostras analisadas, das quais 63,63% (7/11) foram *Listeria innocua*, e 54,54% (6/11) foram *Listeria monocytogenes*. É interessante ressaltar que em duas amostras (2/11) houve a presença de *L. monocytogenes* e *L. innocua* concomitantemente em um mesmo ponto de amostragem.

L. innocua foi a espécie mais isolada neste estudo, seguida por *L. monocytogenes*. Esta prevalência de *L. innocua* frente às outras espécies está em concordância com outras pesquisas citadas na literatura, que da mesma maneira, relatam esta espécie como a mais comumente encontrada, tanto em produtos alimentícios, quanto em amostras ambientais (SCHITTLER, 2008; LIMA, 2004; SILVA et al., 2003).

Rocha (2004) analisou 120 superfícies de equipamentos e ambiente numa linha de processamento de queijo Minas Frescal e encontrou *L. seeligeri* como a espécie prevalente (59,1% do total de isolados), seguida por *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. grayi*. Entretanto, o que chama a atenção nos resultados obtidos no presente trabalho é que, apesar de *L. innocua* ter sido prevalente, os percentuais de isolamento entre essa espécie e *Listeria monocytogenes* foram muito próximos.

Na tab. 5 são demonstrados todos os pontos de amostragem realizados nos três laticínios avaliados neste estudo, bem como os pontos onde *Listeria* spp. foi isolada. Cabe ressaltar que os laticínios A, B e C, apresentavam diferenças nas suas linhas de processamento, por isso, nem todos os pontos de coleta foram amostrados em todos os laticínios.

Tabela 5- Pontos de amostragem em três laticínios localizados no sul do Rio Grande do Sul, e respectivos pontos de isolamento de *Listeria* spp.

Pontos de amostragem	Isolados de <i>Listeria</i> spp.					
	Laticínio A		Laticínio B		Laticínio C	
	1 ^a coleta	2 ^a Coleta	1 ^a coleta	2 ^a coleta	1 ^a coleta	2 ^a coleta
Tanque resfriamento ^{SC}	-	-	-	+ ^{Lm}	-	-
Tina ^{SC}	*	*	*	*	-	-
Piso sala de recepção ^{SS}	*	*	-	-	*	*
Parede sala de recepção ^{SS}	-	-	-	-	*	*
Ralo sala recepção ^{SS}	-	-	-	-	*	*
Piso sala processamento ^{SS}	+ ^{Li}	+ ^{Li}	-	-	-	-
Parede sala processamento ^{SS}	-	-	-	-	-	-
Ralo sala processamento ^{SS}	-	-	-	+ ^{Lm}	+ ^{Lm; Li}	-
Dreno sala processamento ^{SS}	*	*	-	-	-	-
Panelas ^{SC}	-	-	*	*	*	*
Colheres ^{SC}	-	-	-	-	-	-
Tanque de coagulação ^{SC}	-	-	-	-	-	-
Lira de corte vertical ^{SC}	-	-	-	-	-	-
Lira de corte horizontal ^{SC}	-	-	-	-	-	-
Garfo mexedor inox ^{SC}	-	-	-	-	-	-
Baldes ^{SC}	-	-	-	-	-	-
Prancha pré-prensagem ^{SC}	-	-	*	*	*	*
Peneira de retenção grumos ^{SC}	*	*	-	-	-	-
Mesa processamento ^{SC}	-	-	-	-	-	-
Prateleira de utensílios ^{SC}	-	-	*	*	*	*
Formas/Moldes ^{SC}	-	-	-	-	-	-
Saquinhos dessoradores ^{SC}	-	-	-	-	-	-
Prensa ^{SC}	-	-	-	-	-	-
Facas ^{SC}	-	-	-	-	-	-
Tanque de salmoura ^{SC}	*	*	-	-	-	-
Piso sala salmoura ^{SS}	*	*	-	-	+ ^{Lm}	+ ^{Lm}
Parede sala salmoura ^{SS}	*	*	-	-	-	-
Ralo sala salmoura ^{SS}	*	*	-	-	*	*
Carrinho para transporte inox ^{SC}	*	*	*	*	-	-
Prateleira de secagem ^{SC}	*	*	-	-	-	-
Piso câmara secagem ^{SS}	*	*	*	*	-	-
Parede câmara secagem ^{SS}	*	*	*	*	-	-
Ralo câmara secagem ^{SS}	*	*	*	*	-	-
Prateleira câmara fria ^{SC}	-	+ ^{Lm; Li}	-	-	-	-
Piso câmara de maturação ^{SS}	*	*	-	-	-	-
Parede câmara maturação ^{SS}	*	*	-	-	-	-
Ralo câmara de maturação ^{SS}	*	*	-	-	-	-
Balança ^{SC}	-	+ ^{Li}	-	-	-	-
Mesa balança ^{SS}	-	-	-	-	-	-
Embaladora ^{SS}	-	-	-	-	-	-
Piso sala de embalagem ^{SS}	+ ^{Li}	-	*	*	-	-
Parede sala de embalagem ^{SS}	+ ^{Li}	-	*	*	-	-
Ralo sala de embalagem ^{SS}	-	-	*	*	*	*
Total de pontos onde isolou-se <i>Listeria</i> spp.	3/25	3/25	0/32	2/32	2/35	1/35

^{SS} = superfície sem contato com o produto; ^{SC} = superfície com contato com o produto; += presença de *Listeria* spp. (^{Lm} = *Listeria monocytogenes*; ^{Li} = *Listeria innocua*) - = ausência de *Listeria* spp. * não amostrado

Durante a primeira coleta realizada no laticínio A, das 25 amostras avaliadas, três (12%) apresentaram *L. innocua*, sendo todas provenientes de superfície sem contato com o produto (piso da sala de processamento, piso e parede da sala de embalagem).

Na segunda coleta, realizada no mesmo laticínio e nos mesmos 25 pontos, isolou-se *Listeria* spp. em três (12%) destes, tendo sido a espécie *L. innocua* encontrada nesses três pontos, entretanto, em um dos pontos (prateleira da câmara fria), *L. innocua* e *L. monocytogenes* foram isoladas concomitantemente. Destes pontos de amostragem, um (33,33%) correspondia a superfície sem contato com o produto (piso da sala de processamento) e dois (66,67%) correspondiam a superfícies com contato (prateleira da câmara fria e balança). Ressalta-se que a prateleira da câmara fria apresentava-se enferrujada e com ranhuras, indicando má conservação e com restos de matéria orgânica, evidenciando más condições de higiene. Esse dado é importante porque superfícies enferrujadas e com ranhuras, podem favorecer a adesão de *L. monocytogenes* e propiciar a formação de biofilmes, que comprometem a eficiência da sanitização e a consequente eliminação da bactéria (LAWRENCE; GILMOUR, 1994). A presença dessas bactérias na câmara fria é relevante por essa bactéria ser psicrófila, o que favorece sua manutenção e multiplicação nesses nichos. De acordo com Antoniollo (2001), a refrigeração, em decorrência de paralisar o crescimento ou até mesmo destruir determinados microrganismos, pode atuar como forma de pressão seletiva positiva para espécies psicrófilas, como *Listeria* spp., permitindo, desta maneira, o aumento da população deste patógeno.

O isolamento de *Listeria* spp. nas superfícies em contato com o alimento, além de indicar condições inadequadas de higiene, é problema para a saúde pública, por poder contribuir diretamente na disseminação da bactéria para o produto que está sendo processado, o que pode ter ocorrido neste estudo, já que a partir dessa mesma coleta, isolou-se *Listeria innocua* no queijo Coalho.

Convém salientar que em ambas as coletas realizadas no laticínio A, foram observadas irregularidades no piso, o qual se apresentava quebrado em algumas áreas, e com resíduos de matéria orgânica, como leite e grumos de coalhada. Além de problemas estruturais, isso indica falhas nos procedimentos operacionais de higienização, o que pode inferir a persistência de *Listeria* spp. neste ponto, onde *L. innocua* foi isolada em todas as coletas realizadas nesse laticínio.

O laticínio A não possuía fiscalização legal no período das coletas, e seu *layout* era precário e desorganizado. Uma hipótese para justificar o não isolamento de *Listeria* spp. em mais pontos coletados é que, devido a pouca capacidade competitiva desses microrganismos frente a outras bactérias, a microbiota acompanhante pode se sobrepor às células de *Listeria* spp., dificultando sua recuperação. Apesar de não ter sido avaliado, sabe-se que enterococos são bactérias amplamente distribuídas em indústrias lácteas, principalmente quando as condições de higiene são insatisfatórias (FERNANDES, 2010), que tem capacidade de hidrolisar a esculina, que é o principal agente diferencial utilizado nos meios de identificação de *Listeria* spp. Além disso, trabalhos citam que algumas espécies pertencentes a esse grupo, apresentam atividade antagônica a *Listeria monocytogenes* (IZQUIERDO et al., 2009; MIRHOSSEINI et al. 2010).

Em relação ao laticínio B, na primeira coleta não foi isolada *Listeria* spp. nas 32 amostras provenientes da linha de processamento. Entretanto, na segunda coleta, realizada nos mesmos 32 pontos, isolou-se *L. monocytogenes* em dois (6,25%) desses pontos (ralo e tanque de resfriamento).

A presença de *L. monocytogenes* em ralos de indústrias de processamento de alimentos tem sido demonstrada em vários estudos (DIAS, 2008; SCHITTLER, 2008). Esse microrganismo deve ter sido carregado para o ralo através das operações de limpeza, portanto, é provável sua presença em outros pontos de amostragem nessa indústria, o que foi confirmado pelo isolamento dessa bactéria no tanque de resfriamento.

O isolamento de *L. monocytogenes* no tanque de resfriamento é preocupante, pois há contaminação da matéria-prima, tendo em vista que é nesse equipamento que o leite *in natura* fica armazenado antes do processamento térmico. Além disso, a temperatura nesse equipamento (entre 4°C e 8°C) favorece a multiplicação de *L. monocytogenes*, por essa ser uma bactéria psicotrófica, bem como exerce pressão seletiva sobre a microbiota acompanhante, em sua maioria mesófila.

Resultados semelhantes foram obtidos em outra pesquisa realizada no Brasil, por Figueiredo (2000), que avaliou *L. monocytogenes* em uma indústria beneficiadora de leite tipo C, em Fortaleza, Ceará, e isolou o microrganismo no leite fresco e refrigerado, no leite pasteurizado (após 60 horas de estocagem a 4°C), no tanque de recepção do leite cru, nas caixas plásticas de transporte de leite, nos pisos e nos drenos.

Na primeira coleta realizada no laticínio C, isolou-se *Listeria* spp. em duas (5,71%) amostras das 35 avaliadas, sendo *L. monocytogenes* isolada nos dois locais e *L. innocua* em um. Os dois pontos de amostragem foram superfícies sem contato com o produto: o ralo da sala de processamento e o piso da sala de salmoura. No ralo da sala de processamento, foram isoladas as duas espécies de *Listeria* e cabe salientar que nesse local escorrem muitos dos dejetos do processamento, portanto, a presença desses microrganismos nesse local indica contaminação no ambiente da planta de processamento. É de se destacar que a ocorrência das duas espécies de *Listeria* em um mesmo local tem sido relatada por outros autores (LAWRENCE; GILMOUR, 1994; NALÉRIO, 2007), o que se justifica pelo fato desses microrganismos compartilharem os mesmos nichos ecológicos.

Na segunda coleta realizada no laticínio C, dos 35 pontos analisados isolou-se *L. monocytogenes* em uma (2,85%) das amostras (piso da sala de salmoura - superfície sem contato com o produto). Convém ressaltar que a temperatura nessa sala ficava em torno de 10°C e que o piso era áspero e apresentava pequenos desníveis, onde se formavam poças d'água, provavelmente extravasadas dos tanques de salmoura. Esse ambiente úmido e a temperatura baixa podem ter influenciado na multiplicação e persistência de *L. monocytogenes* neste ponto.

L. monocytogenes e *L. innocua* foram as únicas espécies de *Listeria* detectadas nos três laticínios avaliados. Os pontos de contato com o produto que apresentaram contaminação foram o tanque de resfriamento, a prateleira da câmara fria e a balança. Tais superfícies requerem especial atenção quanto ao planejamento de rotinas para limpeza e desinfecção, já que o isolamento de *Listeria* spp. nestas superfícies evidencia o risco potencial de contaminação do produto com o patógeno. Os pontos sem contato com o produto nos quais se isolou *Listeria* spp. foram o piso e ralo da sala de processamento, piso e parede da sala de embalagem e o piso da sala de salmoura. Ter isolado *Listeria* spp. no ambiente de processamento, é relevante, já que pode ser uma importante fonte de recontaminação do produto final. Destaca-se que essa recontaminação pode ser gerada até mesmo durante as etapas de limpeza/desinfecção, quando realizadas de forma inadequada ou ineficiente, através da formação de aerossóis (LAWRENCE; GILMOUR, 1994). Na tab. 6 são apresentados os pontos de coleta onde *L. innocua* e *L. monocytogenes* foram isoladas, nos três laticínios avaliados.

Tabela 6 - Pontos de amostragem contaminados por *L. innocua* e *L. monocytogenes* em três laticínios produtores de queijos de média e alta umidade localizados no sul do Rio Grande do Sul

Espécie isolada	Pontos de amostragem contaminados	
	Superfície sem contato com alimento	Superfície com contato com alimento
<i>L. innocua</i>	Piso sala processamento ^{1A, 2A}	Prateleira câmara fria ^{2A}
	Piso sala de embalagem ^{1A}	Balança ^{2A}
	Parede sala de embalagem ^{1A}	
	Ralo sala processamento ^{1C}	
<i>L. monocytogenes</i>	Ralo sala processamento ^{2B;1C}	Tanque recepção ^{2B}
	Piso sala salmoura ^{1C; 2C}	Prateleira câmara fria ^{2A}

^{1A}: 1ª coleta laticínio A; ^{2A}: 2ª coleta laticínio A; ^{1B}: 1ª coleta laticínio B; ^{2B}: 2ª coleta laticínio B; ^{1C}: 1ª coleta laticínio C; ^{2C}: 2ª coleta laticínio C

Observou-se maior taxa de isolamento de *Listeria* spp. nas superfícies ambientais sem contato com o produto, como pode ser observado na Fig. 7. Entretanto, é digno de nota, que naquelas superfícies que entram em contato com o produto houve prevalência de *L. monocytogenes*, enquanto nas sem contato com o produto, a espécie prevalente foi *L. innocua*.

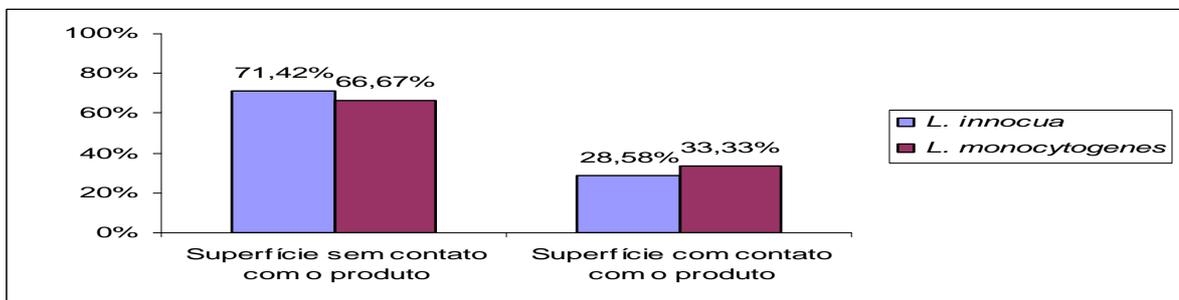


Figura 7 - Ocorrência de *L. monocytogenes* e *L. innocua* em superfícies com e sem contato com o produto em três linhas de processamento de queijos de média e alta umidade localizadas no sul do Rio Grande do Sul.

Nos Estados Unidos, Pritchard et al. (1994) avaliaram 30 indústrias de laticínios e verificaram incidência de *L. monocytogenes* em 9,2% das amostras analisadas. A porcentagem de contaminação das amostras ambientais (49,7%) foi significativamente superior à dos equipamentos (7%). A bactéria foi isolada em equipamentos tais como tanque de armazenamento, superfícies de bancadas, transportadora, pá para filagem da massa, envasadora, máquina para filtragem de salmoura, e em amostras do ambiente de processamento, como salas de resfriamento, congelamento, recebimento e estocagem do leite cru. Em outro

estudo, Kabuki et al. (2004) realizaram um diagnóstico da contaminação por *L. monocytogenes* em três indústrias processadoras de queijos frescos tipo Hispânico, nos Estados Unidos, e constataram a presença desta bactéria em 6,3% dos queijos e 11% das amostras ambientais tais como superfícies de mesas, tubos de conexões de plástico, caixas vazadas, embalagem do leite, drenos e pisos.

Dias (2009), avaliou 178 amostras em matadouro de frangos em São Paulo, isolando *L. monocytogenes* em 28 (15,7%) pontos de amostragem, sendo 43% em superfícies sem contato com o produto (pisos da sala de evisceração, sala de corte e da câmara fria, parede de carrinho da sala de corte, ralo da câmara fria, etc), nove (34%) em superfícies de contato com o produto (caixas brancas, esteira, tesoura, gancho da nória, etc), e sete (25%) nas carcaças de frango resfriadas.

Globalmente, os resultados encontrados nesta pesquisa, demonstram que as indústrias de laticínios, independente do porte, ainda têm dificuldades no controle do patógeno *L. monocytogenes*, sendo necessária a implantação de medidas eficazes para redução da contaminação do produto final e, conseqüentemente, do risco ao consumidor, haja vista que o queijo é um produto pronto para o consumo.

5.1.4 Produto final

Neste experimento, das seis amostras analisadas, duas foram de queijo de alta umidade, oriundas do Laticínio A, e quatro de queijos de média umidade, sendo duas produzidas no Laticínio B e duas no Laticínio C, *L. innocua* foi detectada em queijo de alta umidade produzido no laticínio A.

A taxa de isolamento de *Listeria* spp. e de *L. monocytogenes* em queijos é variável nas diferentes pesquisas realizadas ao redor do mundo. Isso se deve, em parte, ao tipo de queijo avaliado, bem como, as práticas de higiene e sanitização realizadas nos laticínios que os produziram.

Cordano e Rocourt (2001) avaliaram *Listeria* spp. em 256 amostras de queijo macio e em 155 amostras de queijos duros no Chile, encontrando somente duas (0,8%) positivas para o patógeno, sendo essas amostras de queijos macios.

Lübeck et al. (2001) isolaram *Listeria* spp. em todas as cinco amostras de queijo tipo Colonial analisadas após vinte dias de fabricação, provenientes de pequenas usinas de fabricação do sudoeste do estado do Paraná e coletadas em balcões frigoríficos de supermercados.

Vitas, Aguado e Garcia-Jalon (2004), em pesquisa realizada em Navarra (Espanha) encontraram *L. monocytogenes* em 1%, *L. innocua* em 6,1% e *L. grayi* em 1,0 % de 99 amostras de queijos macios avaliadas. Já Colak et al. (2007), encontraram 6 amostras positivas para *L. monocytogenes*, em um universo de 250 amostras de queijo Tulum, o qual é produzido a partir de leite cru e é considerado um dos mais populares queijos semiduros na Turquia.

No trabalho realizado por Abranhão (2008), no Paraná, *Listeria* spp. foi isolada em 12% das 90 amostras de diferentes tipos de queijos, sendo 6% o percentual de cada uma das espécies encontradas, *L. monocytogenes* e *L. innocua*. O autor relata que os queijos com muito alta umidade foram os que apresentaram maior contaminação com *Listeria* spp. (29,2%), seguidos pelos queijos com média umidade que representaram 12,2% e o percentual foi de 5% para os queijos de alta umidade.

A presença de *L. innocua* no queijo observada neste estudo pode ser considerada como indicativa de falhas nos procedimentos de higienização e/ou de processamento térmico inadequado. Entretanto, como foram realizados os testes de fosfatase e peroxidase e os resultados dos testes demonstraram que o binômio tempo/temperatura foi adequado, bem como não foi identificada *Listeria* spp. no leite após a pasteurização, infere-se que a bactéria contaminou o produto final após o tratamento térmico. Esse resultado é relevante porque demonstra a contaminação cruzada naquele laticínio e destaca-se que, apesar de *L. innocua* ter sido a única espécie identificada, não exclui completamente o risco para a saúde pública, haja vista que muitos autores citam que a presença dessa bactéria é indicativa da presença de *L. monocytogenes*, devido às suas similares condições de crescimento (AZEVEDO et. al, 2005; LIU; PURI; DEMIRCI, 2009).

Outro fator importante a ser considerado é que, embora *Listeria* spp. possa ser incorporada aos queijos na linha de produção através de contaminações cruzadas, estas bactérias podem tornar-se injuriadas devido à exposição a condições adversas, sejam elas térmicas, osmóticas, químicas ou por competição pela microbiota acompanhante, o que pode explicar a baixa ocorrência dessas bactérias no produto final, embora tenham sido isoladas em vários pontos de amostragem do ambiente e das superfícies coletadas nas plantas de processamento. A combinação desses obstáculos poderia dificultar a sua recuperação, pois células injuriadas apresentam maior sensibilidade aos

componentes seletivos dos meios, devido a um dano maior em sua membrana e modificação de sua permeabilidade, diminuindo, dessa forma, sua multiplicação, principalmente em meios altamente seletivos (BESSE, 2002; JANTZEN et al., 2006).

Neste mesmo sentido, outro aspecto relevante é que as bactérias ácido lácticas (BAL) naturalmente presentes na microbiota de queijos, também podem ter contribuído para a inibição de *Listeria* spp., haja vista que as BAL podem inibir esses microrganismos, seja pela competição por nutrientes, produção de bacteriocinas, ou produção de ácidos orgânicos que interferem no pH do meio (CASTELLANO et al., 2001; MATARAGAS et al., 2003; SAMELIS et al., 2010).

5.2 Sorologia dos isolados de *Listeria* spp.

Após a etapa de isolamento, os isolados de *Listeria* spp. foram identificados e sorotipados (tab. 7).

Tabela 7 - Sorotipos e origens dos isolados de *Listeria* spp. provenientes de três laticínios da região sul do Rio Grande do Sul

<i>Local da coleta</i>	<i>Ponto</i>	<i>Espécie Listeria</i>	<i>Sorotipo</i>
Laticínio A (1ª coleta)	Piso sala processamento	<i>L. innocua</i>	6a
	Piso sala de pesagem	<i>L. innocua</i>	6a
	Parede sala de pesagem	<i>L. innocua</i>	6a
Laticínio A (2ª coleta)	Piso sala processamento	<i>L. innocua</i>	6a
	Prateleira câmara fria	<i>L. innocua</i>	6a
	Prateleira câmara fria	<i>L. monocytogenes</i>	4b
	Balança	<i>L. innocua</i>	6a
	Queijo Coalho	<i>L. innocua</i>	6a
Laticínio B (1ª coleta)	Leite cru	<i>L. monocytogenes</i>	4b
	Leite cru	<i>L. innocua</i>	6a
	Leite cru	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a
Laticínio B (2ª coleta)	Leite cru	<i>L. monocytogenes</i>	4b
	Tanque de recepção	<i>L. monocytogenes</i>	4b
	Ralo sala processamento	<i>L. monocytogenes</i>	4b
Laticínio C (1ª coleta)	Leite cru	<i>L. innocua</i>	6b
	Ralo sala processamento	<i>L. innocua</i>	6b
	Ralo sala processamento	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a
	Piso sala salmoura	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a
Laticínio C (2ª coleta)	Leite cru	<i>L. innocua</i>	6b
	Piso sala salmoura	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a

Dos onze isolados de *L. innocua*, oito (72,7%) pertenciam ao sorotipo 6a e três (27,3%) ao sorotipo 6b e dos nove isolados de *L. monocytogenes*, cinco (55,6%) pertenciam ao sorotipo 4b e quatro (44,4%) ao sorotipo 1/2a. Na Fig. 8 são apresentados os percentuais de cada sorotipo identificado entre os isolados de *L. innocua* e *L. monocytogenes* provenientes dos três laticínios avaliados.

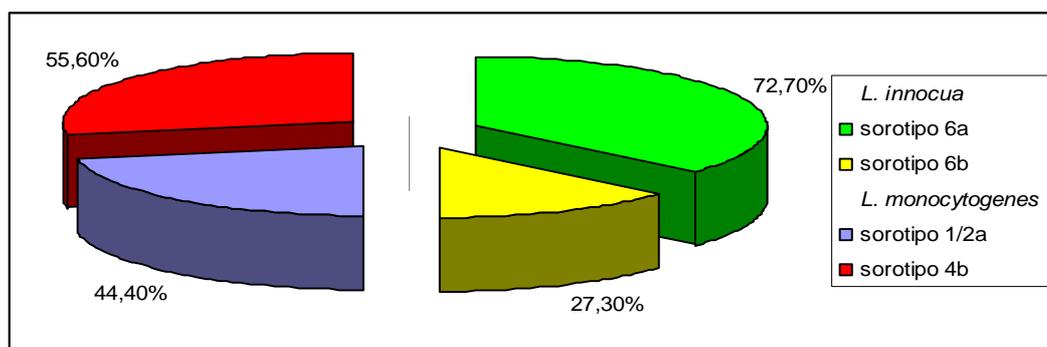


Figura 8 - Percentual de cada sorotipo de *L. innocua* e de *L. monocytogenes* isoladas em três laticínios da região sul do Rio Grande do Sul.

Neste estudo, o sorotipo 6a foi o prevalente entre os isolados de *L. innocua*, enquanto 4b foi prevalente entre os isolados de *L. monocytogenes*. Da mesma forma, Chambel et al. (2007), ao avaliarem a disseminação de *Listeria* spp. no ambiente de oito laticínios em duas regiões geográficas distantes em Portugal, verificaram que entre os isolados de *L. monocytogenes*, o sorotipo prevalente foi 4b (52%), seguido pelo sorotipo 1/2b e 3b (23%) e 1/2a e 3a (9%).

Nesta pesquisa, a única espécie de *Listeria* isolada do produto final, foi *L. innocua* 6a. É importante destacar que embora *L. monocytogenes* seja reconhecida como a única espécie patogênica para humanos, *L. innocua* 6a foi descrita em um caso fatal de listeriose que ocorreu na França, envolvendo uma mulher de 62 anos (PERRIN et al., 2003)

Abranhão (2008) verificou a ocorrência de *Listeria* spp. em 90 queijos comercializados no Estado do Paraná, verificando que 100% dos isolados de *L. innocua* pertenciam ao sorotipo 6a, enquanto que *L. monocytogenes* 1/2a foi o sorotipo prevalente. Já Pintado et al. (2005), avaliaram queijo e leite cru, em Portugal, verificaram que dos 24 isolados de *L. monocytogenes* 20 pertenciam a sorotipo 4b, três ao sorotipo 1/2b e um ao sorotipo 1/2a.

Na primeira coleta realizada no laticínio A todos os isolados de *L. innocua* pertenciam ao sorotipo 6a, enquanto na segunda coleta, 75% dos isolados foram desse sorotipo, o que demonstra sua disseminação nesse laticínio.

No laticínio B, identificaram-se três sorotipos diferentes (*L. monocytogenes* 1/2a e 4b, e *L. innocua* 6a) no leite *in natura*. Essa diversidade de sorotipos encontrados na matéria-prima é preocupante do ponto de vista de segurança de alimentos, haja vista que dois destes sorotipos (1/2a e 4b) estão entre os mais envolvidos em casos e surtos de listeriose humana no mundo inteiro (JACQUET et al., 2002).

É interessante frisar que na segunda coleta realizada no laticínio B, *L. monocytogenes* sorotipo 4b foi isolada em todos os três pontos de amostragem (leite cru, tanque de recepção e ralo de processamento). Embora não se tenha utilizado técnicas de biologia molecular capazes de tipificar e rastrear os isolados, pode-se inferir que a contaminação proveniente da matéria-prima é bastante importante na introdução do patógeno nessa planta de processamento.

Esses resultados são relevantes, pois os maiores surtos registrados na Nova Escócia (salada de repolho cru), na Califórnia (queijo Jalisco), e numerosos outros surtos na América do Norte e na Europa, envolveram cepas do sorotipo 4b (SCHUCHAT et al., 1991; KATHARIOU, 2000). Na Suíça, entre 1983 e 1987, queijo macio Vacherin Mont-d'Or, produzido a partir de leite cru, causou surtos de listeriose, e o microrganismo isolado foi *L. monocytogenes* sorotipo 4b (BILLE, 1990).

No laticínio C, dos seis isolados obtidos, três foram *L. innocua* 6b e três *L. monocytogenes* 1/2a. Ressalta-se que esse último sorotipo tem sido comumente envolvido em casos de listeriose.

BILLE et al. (2006) descreveram um surto de listeriose ocorrido na Suíça, onde o alimento envolvido foi um queijo macio, denominado "Tomme", e o sorotipo de *L. monocytogenes* isolado dos pacientes e do alimento, foi 1/2a.

5. 3 Perfil antimicrobiano

Vinte isolados provenientes das duas coletas realizadas em cada um dos três laticínios, tiveram seu perfil de resistência avaliados, frente a quinze antimicrobianos, de uso clínico.

Entre os isolados de *Listeria* spp. testados encontram-se: seis isolados da matéria-prima (leite cru (LC)), quatro provenientes de equipamentos (EQ), nove oriundos do ambiente de processamento (AM) dos laticínios e um isolado do produto

final (queijo Coalho (QC)). Na tab. 8 são apresentados os isolados testados de *Listeria* spp. com seus respectivos sorotipos e pontos de isolamento.

Tabela 8 – Isolados de *Listeria* spp. com seus respectivos sorotipos e pontos de isolamento

Identificação do isolado	Espécie <i>Listeria</i> - sorotipo	Ponto de isolamento
		Laticínio A (1ª coleta)
AM1A1	<i>L. innocua</i> - 6a	Piso sala processamento
AM2A1	<i>L. innocua</i> - 6a	Piso sala de pesagem
AM3A1	<i>L. innocua</i> - 6a	Parede sala de pesagem
		Laticínio A (2ª coleta)
AM4A2	<i>L. innocua</i> - 6a	Piso sala de processamento
EQ5A2	<i>L. innocua</i> - 6a	Prateleira câmara fria
EQ6A2	<i>L. monocytogenes</i> - 4b	Prateleira câmara fria
EQ7A2	<i>L. innocua</i> - 6a	Balança
QC8A2	<i>L. innocua</i> - 6a	Queijo Coalho
		Laticínio B (1ª coleta)
LC9B1	<i>L. monocytogenes</i> - 4b	Leite cru
LC10B1	<i>L. innocua</i> - 6a	Leite cru
LC11B1	<i>L. monocytogenes</i> - 1/2a	Leite cru
		Laticínio B (2ª coleta)
LC12B2	<i>L. monocytogenes</i> - 4b	Leite cru
EQ13B2	<i>L. monocytogenes</i> - 4b	Tanque recepção
AM14B2	<i>L. monocytogenes</i> - 4b	Ralo sala processamento
		Laticínio C (1ª coleta)
LC15C1	<i>L. innocua</i> - 6b	Leite cru
AM16C1	<i>L. innocua</i> - 6b	Ralo sala de processamento
AM17C1	<i>L. monocytogenes</i> - 1/2a	Ralo sala de processamento
AM18C1	<i>L. monocytogenes</i> - 1/2a	Piso sala salmoura
		Laticínio C (2ª coleta)
LC19C2	<i>L. innocua</i> - 6b	Leite cru
AM20C2	<i>L. monocytogenes</i> - 1/2a	Piso sala salmoura

A Fig. 9 apresenta o perfil de resistência dos isolados de *Listeria* spp. oriundos da matéria prima e do produto final frente a quinze antimicrobianos, enquanto, a Fig. 10 apresenta o perfil de resistência, dos isolados de *Listeria* spp. oriundos de superfícies de equipamentos e do ambiente de processamento.

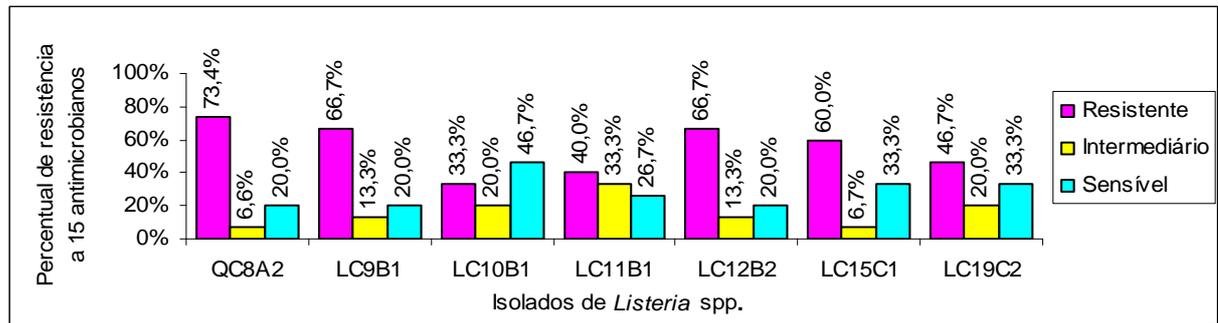


Figura 9 - Perfil de resistência dos isolados de *Listeria* spp. oriundos da matéria prima e do produto final frente a 15 antimicrobianos.

Com base nos resultados plotados nas Fig. 9 e Fig. 10 pode-se observar que nenhum dos isolados de *Listeria* spp. apresentou resistência a todos os antibióticos testados, porém 100% mostraram-se resistentes a pelo menos uma das drogas avaliadas.

Nesta pesquisa, o isolado de *L. innocua*, que apresentou resistência ao maior número de antibióticos foi do sorotipo 6a, proveniente do produto final isolado no laticínio A, com 73,4% de resistência. Já o maior percentual de resistência frente aos quinze antibióticos testados, para os isolados de *L. monocytogenes* sorotipo 4b, não excedeu 66,7% e foi observado entre duas amostras de leite cru, ambas originárias do laticínio B. Em relação aos isolados de *L. monocytogenes* do sorotipo 1/2a, os maiores percentuais de resistência também chegaram a 73,4% e correspondiam a três pontos de amostragem coletados do ambiente de processamento do laticínio C.

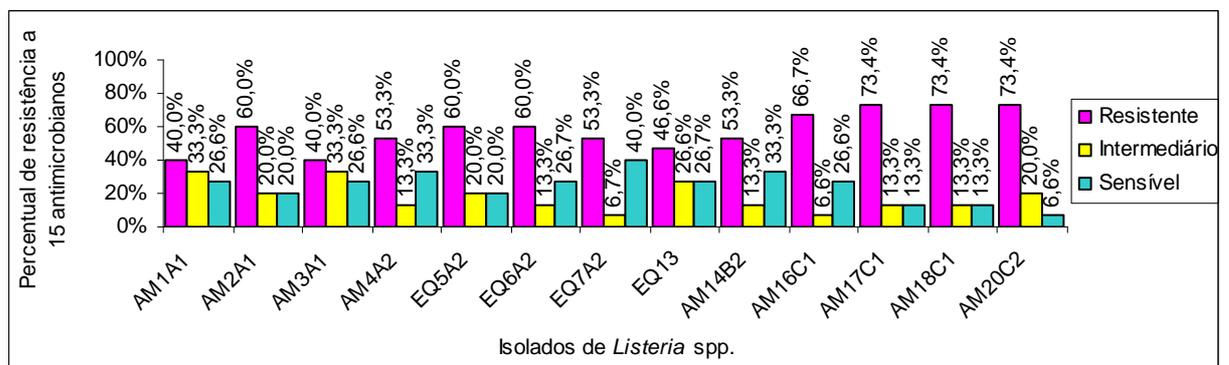


Figura 10 - Perfil de resistência dos isolados de *Listeria* spp. oriundos de superfícies de equipamentos e de ambiente de processamento frente a 15 antimicrobianos.

Os antibióticos, tetraciclina (60%) e eritromicina (45%) foram aqueles aos quais os isolados apresentaram os maiores percentuais de susceptibilidade intermediária, conforme ilustra tab. 9.

Tabela 9 - Perfil de resistência a antibióticos em *Listeria* spp. isoladas de leite cru e de queijo Coalho em três laticínios da região sul do Rio Grande do Sul

Antibiótico	Perfil % (n)		
	Resistência	Intermediário	Sensível
Gentamicina (GEN - 10µg)	45% (9)	25% (5)	30% (6)
Penicilina G (PEN - 10U)	100% (20)	0	0
Oxacilina (OXA - 1µg)	100% (20)	0	0
Ampicilina (AMP - 10µg)	85% (17)	5% (1)	10% (2)
Cefaclor (CFC -30µg)	95% (19)	5% (1)	0
Amoxicilina/Ac. Clavulônico (AMC -30µg)	40% (8)	5% (1)	55% (11)
Ciprofloxacina (CIP - 5µg)	75% (15)	15% (3)	10% (2)
Eritromicina (ERI - 15µg)	55% (11)	45% (9)	0
Claritromicina (CLA - 15µg)	0	15% (3)	85% (17)
Clindamicina (CLI - 2µg)	95% (19)	5% (1)	0
Sulfazotrim (SUT- 25µg)	0	5% (1)	95% (19)
Tetraciclina (TET - 30µg)	30% (6)	60% (12)	10% (2)
Cloranfenicol (CLO - 30µg)	85% (17)	15% (3)	0
Rifampicina (RIF - 5µg)	50% (10)	35% (7)	15% (3)
Vancomicina (VAN - 30µg)	0	15% (3)	85% (17)

n: número de isolados

A alta prevalência de isolados resistentes a penicilina (100%), oxacilina (100%), clindamicina (95%), cefaclor (95%), cloranfenicol (85%), ampicilina (85%) e ciprofloxacina (75%), encontradas neste estudo, está de acordo com um padrão geral observado em estudos referidos mundialmente pela comunidade científica, que evidencia um aumento na resistência de *Listeria* spp. a antibióticos (SAFDAR; ARMSTRONG, 2003 ; ZHANG et. al., 2007; PESAVENTO et al., 2010). Convém salientar, que nesta pesquisa todos os sete isolados de *Listeria* spp., provenientes da matéria prima e do produto final, apresentaram resistência à penicilina, oxacilina, cefaclor, clindamicina e cloranfenicol, bem como foram sensíveis somente a vancomicina.

A geração da resistência em bactérias frente aos antibióticos ocorre por plasmídios e transposons, os quais conferem resistência a esses antimicrobianos e que podem ser transferidos de uma célula para outra (POURSHABAN et al., 2002; TRABULSI, 2008). Esse fato, acrescido do uso indiscriminado de antimicrobianos

como promotores de crescimento em rações para animais e quando empregados no tratamento de animais doentes e/ou como medida profilática, favorecem a presença de resíduos nos alimentos, desencadeando a resistência bacteriana (PHILLIPS et al., 2004).

A resistência a um antibiótico é mais comum do que a múltipla resistência, embora seja relatado o aparecimento de cepas de *Listeria* spp. multirresistentes isoladas a partir de várias fontes (RODAS-SUAREZ et. al, 2006). Neste estudo, todos os isolados avaliados, foram resistentes aos mesmos dois antimicrobianos, o que fornece importantes evidências sobre o perfil de resistência de *Listeria* spp., em especial de *L. monocytogenes*, isoladas em nossa região. É importante destacar que os isolados apresentaram alto percentual de resistência frente aos antimicrobianos usados normalmente como primeira escolha (penicilina, oxacilina) no tratamento de listeriose (HOF, 2003; JAY, 2005). Na região de abrangência deste estudo não há relato a respeito do comportamento desse microrganismo frente aos antimicrobianos utilizados em clínica humana, portanto, esses resultados trazem novas e importantes informações.

A sensibilidade de *Listeria* spp. em especial de *L. monocytogenes* a antimicrobianos tem sido avaliada em diversos estudos ao redor do mundo, com diferentes taxas e perfis distintos de resistência, o que realça a importância de se avaliar esses microrganismos isolados em nossa região.

Conter et al. (2009) testaram 126 isolados provenientes de alimentos e de ambientes de produção, verificaram que a resistência a um antimicrobiano foi mais comum do que a resistência múltipla.

Pesavento et al. (2010) avaliaram 168 *Listeria* spp. frente a doze diferentes antibióticos, verificando que 51 (30,4%) das cepas foram resistentes a três ou mais antibióticos testados, estando entre estes, meticilina, clindamicina, oxacilina.

Stonsaovapak e Boonyaratanakornkit (2010) testaram 64 cepas de *Listeria* spp. frente a oito antimicrobianos, verificando que a resistência a penicilina (6,3%) foi a mais comum, seguida pelo cloranfenicol (3,1%) e tetraciclina (1,6%), e que 100% das cepas, apresentaram-se sensíveis a amoxicilina, ampicilina e a vancomicina.

Haraken et al. (2009) observaram que as cepas de *L. monocytogenes* foram resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados, com elevadas porcentagens de resistência a oxacilina (93,33%), penicilina (90%) e, ampicilina

(60%), sendo que as cepas apresentaram elevada sensibilidade à gentamicina (93,34%).

RAHIMI et al. (2010) avaliaram 54 cepas de *Listeria* spp., observando que 98,2% apresentaram resistência a um ou mais antimicrobianos, sendo a resistência ao ácido nalidíxico, a mais comum (96,4%), seguida pela resistência a penicilina (34,5%) e tetraciclina (27,3%).

Neste estudo observou-se que 95% dos isolados foram sensíveis a vancomicina, resultado similar ao encontrado por Aureli et al. (2003) e por Rahimi et al. (2010). Resultado semelhante foi obtido por Conter et al. (2009), que relatam que apenas 0,8%, de 120 cepas de *L. monocytogenes*, mostraram resistência a esse antibiótico. Por outro lado, Haraken et al. (2009) encontraram 26,6% de *L. monocytogenes* resistentes a vancomicina, resultado preocupante, já que essa droga é considerada uma das últimas opções terapêuticas para o tratamento de infecções humanas.

Com relação a sulfazotrim e claritromicina, observou-se que as cepas testadas revelaram-se sensíveis a estes antibióticos, apresentando percentuais de 95% e 85% respectivamente.

5.4 Caracterização microbiológica da matéria prima e de mãos dos manipuladores

5.4.1 Coliformes totais e coliformes termotolerantes

Foi realizada a enumeração de coliformes totais e coliformes termotolerantes em dezoito amostras, provenientes de duas coletas em cada um dos três laticínios avaliados. Destas, seis correspondiam às superfícies das mãos dos manipuladores, seis de leite cru e seis de leite pasteurizado.

Na tab. 10 são apresentados os resultados obtidos na enumeração de coliformes totais e termotolerantes.

Tabela 10 - Enumeração de coliformes totais e coliformes termotolerantes em amostras de superfícies de mãos de manipuladores e em matéria-prima utilizada na elaboração de queijos fabricados em três laticínios (A, B e C) localizados no sul do Rio Grande do Sul

	Enumeração de coliformes					
	Amostras					
	Manipuladores (NMP.mão ⁻¹)		Leite cru (NMP.mL ⁻¹)		Leite Pasteurizado (NMP.mL ⁻¹)	
	Ct	CT	Ct	CT	Ct	CT
Laticínio. A (1ª coleta)	<0,3	<0,3	1,1x10 ⁵	1,1x10 ⁵	2,3	<0,3
Laticínio. A (2ª coleta)	0,92	0,3	1x1x10 ⁵	1,1x10 ⁵	0,92	<0,3
Laticínio. B (1ª coleta)	0,92	0,36	1,1x10 ⁴	1,1x10 ⁴	0,23	<0,3
Laticínio. B (2ª coleta)	0,15	0,15	1,1x10 ⁴	1,1x10 ⁴	0,92	<0,3
Laticínio. C (1ª coleta)	0,92	0,36	>1,1x10 ⁶	1,1x10 ⁵	0,23	<0,3
Laticínio. C (2ª coleta)	0,36	<0,3	>1,1x10 ⁵	2,8x10 ³	0,23	<0,3

Ct: coliformes totais, CT: coliformes a 45°C ou termotolerantes

Todas as seis amostras de leite cru apresentaram taxas elevadas de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, evidenciando alta contaminação da matéria-prima. As seis amostras apresentavam contagens de coliformes termotolerantes acima de 10³NMP.mL⁻¹, valor considerado por Murphy (1997), como indicativo de higiene deficitária do leite. As bactérias que compõem o grupo dos coliformes termotolerantes habitam o intestino de mamíferos, assumindo-se que há uma correlação entre a sua presença com a de microrganismos patogênicos de origem entérica, sendo frequentemente utilizados como indicadores de contaminação fecal e de potencial risco da presença de patógenos zoonóticos. As elevadas contaminações na matéria-prima por bactérias desse grupo denunciam problemas higiênico-sanitários na obtenção do leite.

No trabalho de Mattos (2010) também foram observadas elevadas contagens de coliformes termotolerantes nas amostras de leite cru, coletadas em 53 propriedades rurais da região do agreste Pernambucano, sendo que 98% (52) obtiveram contagens acima de 10⁶NMP.mL⁻¹. Nero et al. (2004) encontraram contagens de coliformes termotolerantes acima de 10²NMP.mL⁻¹, em 80,4% de 210 amostras de leite.

Um dado importante foi a ausência de coliformes termotolerantes nas amostras de leite pasteurizado, evidenciando a importância do tratamento térmico e que este foi adequado. Em relação a contaminação do leite pasteurizado por coliformes totais, evidenciou-se um pequeno número de células viáveis em cada uma das amostras, nunca excedendo a $2,3\text{NMP.mL}^{-1}$.

Um resultado expressivo foi que, das seis amostras das superfícies das mãos dos manipuladores analisadas, apenas uma (16,7%) não apresentou bactérias do grupo dos coliformes totais. Com relação aos coliformes termotolerantes, em duas amostras não se detectou a presença desses microrganismos. Esse resultado é relevante, porque se não forem aplicadas rigorosas medidas de higiene por parte dos manipuladores, esses podem ser importantes carreadores de microrganismos para o produto final.

5.4.2 *Salmonella* spp.

Foram avaliadas dezoito amostras, com o intuito de avaliar a qualidade da matéria-prima e o risco de contaminação cruzada por parte dos manipuladores quanto à presença de *Salmonella* spp. As amostras e os pontos de amostragem foram os mesmos utilizados para coliformes totais e termotolerantes.

Os resultados obtidos quanto à presença de *Salmonella* spp. estão representados na tab 11.

Tabela 11 - Presença de *Salmonella* spp. em amostras de superfícies de mãos de manipuladores e em matéria-prima utilizada na elaboração de queijos fabricados em três laticínios (A, B e C) localizados no sul do Rio Grande do Sul

Origem da coleta	Nº de amostras avaliadas	Amostras		
		Manipuladores	Leite cru	Leite pasteurizado
		Presença de <i>Salmonella</i> spp. (25mL)		
Laticínio A (1ª coleta)	3	-	-	-
Laticínio A (2ª coleta)	3	-	-	-
Laticínio B (1ª coleta)	3	-	-	-
Laticínio B (2ª coleta)	3	-	+	-
Laticínio C (1ª coleta)	3	-	-	-
Laticínio C (2ª coleta)	3	-	-	-
Total amostras positivas	18	0	1 (16,66%)	0

+ = presença de *Salmonella* spp.- = ausência de *Salmonella* spp.

Isolou-se *Salmonella* spp. em uma (5,55%) das 18 amostras avaliadas, proveniente de uma amostra de leite cru, apesar das altas contagens de coliformes termotolerantes nessas amostras. Algumas outras pesquisas conduzidas no Brasil, avaliando *Salmonella* spp. em leite cru, não isolaram essa bactéria, como por exemplo, os trabalhos de Mattos et al. (2010), na região agreste de Pernambuco, Borges (2006), em Fortaleza, e Nero et al. (2004), nos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo. A ausência de *Salmonella* spp. nas amostras de superfícies das mãos dos manipuladores também foi observada no trabalho de Millezi et al. (2007), que avaliaram 58 unidades amostrais entre manipuladores de dois setores de uma empresa do ramo alimentício, situada em Frederico Westphalen/RS.

5.4.3 Estafilococos coagulase positiva (ECP)

A avaliação da contagem de estafilococos coagulase positiva foi realizada nas mesmas amostras descritas acima e os resultados estão apresentados na tab. 12.

Tabela 12 - Contagem de estafilococos coagulase positiva em amostras de superfícies de mãos de manipuladores e em matéria-prima utilizada na elaboração de queijos fabricados em três laticínios (A, B e C) localizados no sul do Rio Grande do Sul

Origem da coleta	Nº de amostras avaliadas	Estafilococos coagulase positiva		
		Amostras		
		Manipuladores (UFC.mão ⁻¹)	Leite cru (UFC.mL ⁻¹)	Leite pasteurizado (UFC.mL ⁻¹)
Laticínio A (1ª coleta)	3	2,4 x10 ²	-	-
Laticínio A (2ª coleta)	3	-	-	-
Laticínio B (1ª coleta)	3	-	1,5x10 ³	-
Laticínio B (2ª coleta)	3	-	6x10 ⁴	-
Laticínio C (1ª coleta)	3	-	3,4x10 ⁴	-
Laticínio C (2ª coleta)	3	-	4x10 ⁵	-

- = não houve de contagem de ECP

Das 18 amostras avaliadas, cinco (7,7%) apresentaram estafilococos coagulase positiva. Esses microrganismos não foram observados nas seis amostras provenientes de leite pasteurizado, semelhante ao estudo de Borges (2006) que, analisou 25 amostras de leite pasteurizado utilizado como matéria-prima na elaboração de queijo Coalho.

Apenas nas amostras de leite cru provenientes do laticínio A não foi observada a presença de estafilococos coagulase positiva. Isso pode dever-se ao fato do leite coletado por esse laticínio pertencer ao próprio rebanho, o que facilita o controle e a retirada dos animais com mastite da produção de leite. Nos demais laticínios, o leite era proveniente de diversos produtores. As contagens em amostras de leite cru variaram entre $1,5 \times 10^3$ e 4×10^5 UFC mL⁻¹. Borges (2006) observou alta frequência de ECP em amostras de leite cru (25/25 amostras), com contagens entre $8,0 \times 10^3$ e $5,0 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹.

É importante ressaltar que contagens de ECP superiores a 10^5 UFC mL⁻¹ devem ser causas de preocupação para as indústrias de alimentos, entre elas, as queijarias, uma vez que, mesmo que o leite sofra tratamento térmico adequado, eliminam-se as células viáveis de ECP, mas não se elimina o risco de uma intoxicação estafilocócica, já que as enterotoxinas são termorresistentes.

Em relação às superfícies das mãos dos manipuladores, encontrou-se ECP em apenas uma das amostras, sendo esta proveniente da primeira coleta no laticínio A, com contagem de $2,4 \times 10^2$ UFC mão⁻¹. Borges (2006) encontrou 100% (15/15) das amostras provenientes de luvas de manipuladores avaliadas em uma indústria de queijo Coalho, contaminadas com ECP, com contagens entre 10^2 e 5×10^2 UFC mão⁻¹.

S. aureus é um importante indicador de higiene pessoal e de qualidade de alimentos, uma vez que apresenta como seu reservatório primário a pele e membranas mucosas de humanos. Isto salienta o risco de disseminação desses microrganismos, através da manipulação excessiva dos alimentos, associado a práticas insuficientes de higiene (LUONG et al, 2006).

5.5 Caracterização microbiológica do produto final e conformidade com os padrões legais

Seis amostras de queijos provenientes dos três laticínios (A, B e C) foram avaliadas quanto à conformidade aos padrões microbiológicos estabelecidos pela Resolução RDC 12/2001, da ANVISA (BRASIL, 2001).

Foram avaliadas duas amostras de queijo Coalho, provenientes do laticínio A, e quatro de queijo Prato/Lanche, sendo duas provenientes do laticínio B e duas do laticínio C.

Os resultados das análises microbiológicas dos queijos para os parâmetros estabelecidos pela RDC 12/2001 são apresentados na tab 13.

Tabela 13 - Avaliação microbiológica de queijos Coalho e Prato/Lanche produzidos em três laticínios (A, B e C) da região sul do Rio Grande do Sul

Amostra	<i>Coliformes a 45°C</i> (NMP g ⁻¹)	<i>Estafilococos coagulase positiva</i> (UFC g ⁻¹)	<i>Salmonella spp.</i> em 25g	<i>L. monocytogenes</i> em 25g
QC 1 ^A	7,4x10 ²	7,4x10 ⁵	Ausência	Ausência
QC 2 ^A	23	-	Ausência	Ausência
QL 3 ^B	93	-	Ausência	Ausência
QL 4 ^B	93	-	Ausência	Ausência
QL 5 ^C	7,4x10	3,1x10 ²	Ausência	Ausência
QL 6 ^C	7,4x10	9,2x10 ²	Ausência	Ausência

QC: Queijo Coalho; QL: Queijo Prato/Lanche; ^A: amostra coletada no laticínio A; ^B: amostra coletada no laticínio B; ^C: amostra coletada no laticínio C; - = não houve de contagem de ECP

Das seis amostras de queijos, uma (16,66%) estava em desacordo com o padrão regulamentar vigente, estando acima do limite máximo permitido para *Estafilococos coagulase positiva*. Esta amostra foi proveniente da primeira coleta realizada no laticínio A, e foi de um queijo Coalho.

Os coliformes termotolerantes são um grupo de microrganismos facilmente destruídos pelo calor, não sobrevivendo ao tratamento térmico quando adequadamente realizado, por isso, são indicadores de falha de processo ou de contaminação pós-pasteurização devido a condições inadequadas de higiene (SILVA et al., 2003). Dessa forma, é interessante observar que nenhuma das amostras excedeu os limites estabelecidos pela legislação vigente para a esse grupo de bactérias (tab. 13).

Em relação a *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp., não se detectou a presença desses patógenos nas amostras avaliadas. Esses resultados reforçam a importância da pasteurização, já que estes dois patógenos foram isolados de amostras de leite cru utilizadas para fabricar os queijos.

Um dado importante, é que *L. innocua* foi isolada em uma amostra de queijo Coalho. Isso pode ter ocorrido devido a contaminação cruzada, haja vista que os testes de fosfatase e peroxidase realizados no leite pasteurizado utilizado para fabricar o queijo, indicaram que o tratamento térmico foi corretamente realizado. Outros autores analisaram queijo Coalho e também não encontraram *L. monocytogenes*, mas isolaram *Listeria* spp. (FEITOSA et al., 2003; BRUNO et al., 2005). Apesar da legislação vigente estipular unicamente a ausência da espécie *L. monocytogenes* em 25g de alimento, a presença de *L. innocua* é causa de preocupação, haja vista que as necessidades de crescimento entre as espécies de *Listeria* são idênticas, bem como as características fenotípicas nos meios de isolamento são muito semelhantes. Por causa disto, muitos autores consideram a presença de qualquer espécie de *Listeria* como indicativo da presença de *L. monocytogenes*.

Os resultados obtidos nesse experimento estão em concordância com os realizados por outros autores no Brasil, que avaliaram *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* em queijos de alta umidade e em queijo Coalho, e também não isolaram esses patógenos (BORGES, 2006).

Da mesma forma que relatado para os outros microrganismos avaliados, a contaminação do queijo Coalho no laticínio A e do queijo Prato/Lanche no laticínio C por ECP ocorreu, provavelmente, após a pasteurização, já que o leite utilizado na sua elaboração foi pasteurizado e o tratamento térmico é eficiente em eliminar células viáveis desse microrganismo. No laticínio A, a presença desses microrganismos pode ter ocorrido pela manipulação excessiva e higiene inadequada por parte dos manipuladores, já que foi evidenciado $2,4 \times 10^2$ UFC mão⁻¹ de ECP nas superfícies das mãos dos manipuladores durante a primeira coleta nesse laticínio. Ressalta-se que este laticínio não possuía inspeção sanitária legal. A ocorrência de ECP em queijo Coalho, excedendo os níveis estabelecidos pela legislação vigente, tem sido observada em outros estudos (FEITOSA et al., 2003; BORGES et al., 2003).

Um dado interessante é que, embora uma amostra de queijo Coalho e duas amostras de queijo Prato/Lanche apresentassem ECP, apenas aquela referente ao queijo Coalho ($7,4 \times 10^5$) estava acima do limite de contagem de ECP, estabelecido pela legislação vigente (10^3). Este é um fato preocupante, pois a literatura relata que são necessárias contagens entre 10^5 a 10^6 UFC de *S. aureus* por grama de alimento para que ocorra a produção de toxinas em níveis capazes de provocar intoxicação (FRANCO; LANDGRAFF, 2002). Entretanto, nas outras amostras que apresentaram contaminação por ECP, esses níveis podem também ser atingidos, dependendo da temperatura de armazenamento do produto.

6 CONCLUSÕES

- Há ocorrência de *L. innocua* e de *L. monocytogenes* em plantas de processamento de queijos de média e alta umidade localizadas na região sul do Rio Grande do Sul. A ocorrência de *Listeria* spp. foi maior no laticínio A, que não possuía fiscalização legal no período das coletas;
- O leite cru é um importante veículo de introdução de *Listeria* spp., em especial de *L. monocytogenes*, nas plantas de processamento. Apesar desse patógeno não ter sido isolados no produto final, sua presença tanto em superfícies com contato, quanto em superfícies sem contato com o produto, demonstra o risco de contaminação cruzada para os queijos, que são produtos prontos para o consumo;
- *L. monocytogenes* não foi isolada nas superfícies das mãos dos manipuladores, o que minimiza os riscos de contaminação cruzada por parte dos operários durante a fabricação do produto;
- A identificação de *L. monocytogenes* 1/2a e 4b, além da presença de cepas multirresistentes a antibióticos de uso clínico contra bactérias Gram-positivas, denota perigo para a saúde pública;
- O leite cru de má qualidade é uma importante fonte de microrganismos que depreciam o produto e/ou oferecem riscos de saúde aos consumidores, como, coliformes totais e termotolerantes, *Salmonella* spp., estafilococos coagulase positiva e *Listeria* spp.. Com isso, salienta-se a importância da obtenção de matéria prima de boa qualidade a realização de tratamento térmico adequado no leite;

REFERÊNCIAS

ABRANHÃO, WANDA MOSCALEWSKI. **Método de detecção e ocorrência de *Listeria monocytogenes* e de outros microrganismos em queijos comercializados no estado do Paraná.** Curitiba, 2008. 229f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná, 2008.

AIRES-DE-SOUSA, M.; PARENTE, C.; VIEIRA-DA-MOTA, O.; BONNA, I.; SILVA, D.; LENCASTRE, H. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine Milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.12, p.3845-3849, 2007.

ALLERBERGER, F. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v.35, p. 183 -189, 2003.

ANDREWS, H. W.; FLOWERS, R. S; SILIKERS, J.; BAILEY, S. J. *Salmonella*. In.: APHA (American Public Health Association). **Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods**. 4^o ed. Washington: APHA, 2001. chap. 37, p357-380.

ANTONIOLLO, Paulo César. ***Listeria* spp. em ovinos e carcaças ovinas em nível de abatedouro.** 2001. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial)-Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

ARQUÉZ, J. L.; RODRÍGUEZ, E.; GAYA, P.; MEDINA, M.; MUÑEZ, M. Effect of combinations of high-pressure treatment and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on the survival of *Listeria monocytogenes* intraw milk cheese. **International Dairy Journal**, v.15, n.6/9, p. 893-900, 2005.

APHA. **Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods**. 4rd ed. Washington D.C.: American Public Health Association, 2001.

ARSLAN, S. and ÖZDEMİR, F. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* spp. in homemade white cheese. **Food Control** v.19, p.360–363, 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). (1995). **Official methods of analysis of AOAC international**. 16.ed. Washington, 1995. v. 1-2.

AURELI, P., FERRINI, A.M., MANNONI, V., HODZIC, S., WEDELL-WEERGAARD, C., OLIVA, B. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Italy to antibiotics. **International Journal of Food Microbiology**. v.83, p.325–330, 2003.

AUTIO, T. **Tracing the sources of *Listeria monocytogenes* contamination and listeriosis using molecular tools.** Dissertation. Department of Food and

Environmental Hygiene Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland, 2003.

AYGUN, O.; PEHLIVANLAR, S. *Listeria spp.* in the raw milk and dairy products in Antakya, Turkey. **Food Control**. v.17. p. 676–679, 2006.

AZEVEDO, I., REGALO, M. MENA, C., ALMEIDA, G., CARNEIRO, L., TEIXEIRA, P., HOGG, T., GIBBS, P. A. Incidence of *Listeria spp.* in domestic refrigerators in Portugal. **Food Control**. v.16, p. 121-124, 2005.

BANNERMAN, T. L.; MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN, R.H. *Staphylococcus*, micrococcus, and other catalase positive cocci that grow aerobically. (ed.) **Manual of clinical microbiology**. 8rd ed. Washington D. C.: ASM, v.1, cap.28, p.384-404, 2003.

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. ***Listeria: a practical approach to the organism and its control***, 2^a ed., Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2005, 288p.

BEMRAH, N., SANAA, M., CASSIN, M. H., GRIFFITHS, M. W., & CERF, O. Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk. **Preventive Veterinary Medicine**, v.37, p. 129–145, 1998.

BENNET, R.W. Atypical toxigenic *Staphylococcus* and non-*Staphylococcus aureus* species on the horizon An update. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 10, p. 1123-1126, 1996.

BENNETT, R.W.; LANCETTE, G. A. *Staphylococcus aureus* In: UNIDAD STATES. Food and Drugs Administration Bacteriological Analytical Manual., 8^o ed (revisão A), 2001. Cap 12. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-12.html>. Acesso em: jan.2009.

BESSE, N. G. Influence of various environmental parameters and of detection procedures on the recovery of stressed *L. monocytogenes*: a review. **Food Microbiology**, v.19, p. 221-234, 2002.

BILLE, J. Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. In MILLER, A.J.; SMITH, J.L.; SOMKUTI, G.A. (Eds). Foodborne Listeriosis. Amsterdam: Society for Industrial Microbiology, Elsevier, cap.12, p.71–74, 1990.

BILLE, J.; BLANC, D.S.; SCHMID, H.; BOUBAKER, K.; BAUMGARTNER, A.; SIEGRIST, H.H.; TRITTEN, M.L.; LIENHARD, R.; BERNER, D.; ANDERAU, R.; TREBOUX, M.; DUCOMMUN, J.M.; MALINVERNI, R.; GENNÉ, D.; ERARD, P.H.; WAESPI, U. Outbreak of human listeriosis associated with tome cheese in northwest Switzerland, **Eurosurveillance Monthly**, v. 11, n.6, p. 91-3, 2006.

BORGES, M. F.; FEITOSA, T.; NASSU, R. T.; MUNIZ, C. R.; AZEVEDO, E. H. F de; FIGUEIREDO, E. A. T. Microrganismos patogênicos e em queijo de coalho produzido no Ceará, Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 31-40, jan./jun., 2003.

BORGES, M.; ANDRADE, A.P.; ARCURI, E.; KABUKI, D.; KUAYE, A. Fortaleza: Embrapa Agroindustrial Tropical, 2009. 31p (Embrapa Agroindustrial Tropical. Documentos, 119)

BORGES, M.F. Diagnóstico de contaminação por bactérias patogênicas em uma indústria processadora de queijo coalho e detecção de genes associados a fatores de virulência, 2006. 221f. Tese (Doutorado em tecnologia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

BRANCO, M. A. A. C.; FIGUEIREDO, E. A. T.; BORGES, M. F.; SILVA, M. C. D.; DESTRO, M. T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 393-408, jun./dez., 2003.

BRANT, L.M.F.; FONSECA, L.M.; SILVA, M.C.C. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos de minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.6, p. 1570-1574, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 jan. de 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de queijo de coalho. Instrução Normativa nº30, de 26/06/ 2001. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 jul.2001, p.13-15.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, Laboratório Nacional de Referência Animal. **Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes**. II – Métodos Físicos e Químicos. Brasília, 1981. 217 p

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Decreto 2244 de 04 de junho de 1997: **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Brasília, DF: Riispoa, 1997.Título VII, cap. IV, art. 598.

BRASIL. Portaria nº 358, de 04 de setembro de 1997. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Prato. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 set. 1997. n. 172, p. 19690.

BRUNO, L. M.; FEITOSA, T.; NASSU, R. T.; CARVALHO, J. D. G.; ANDRADE, A. A. Avaliação microbiológica de queijo de coalho artesanais e industrializados comercializados em Fortaleza, CE. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 60, n. 345, p. 217-220, jul./ago, 2005.

BUCHRIESER, C. Biodiversity of the species *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*. **Microbes and Infection**, v.9, p.1147-1155, 2007.

BUSANI, L.; CIGLIANO, A.; TAIOLI, E.; CALIGIURI, V.; CHIAVACCI, L.; DI BELLA, C.; BATTISTI, A.; DURANTI, A.; GIANFRANCESCHI, M.; NARDELLA, M. C.; ROLESU, S.; TAMBA, M.; MARABELLI, R.; CAPRIOLI, A. Prevalence of *Salmonella* enterica and *Listeria monocytogenes* contamination in food of animal origin in Italy. **Journal of Food Protection**, v.68, n.8, p.1729-1733, 2005.

CARRIQUE-MAS, J.J; HOKEBERG, I; ANDERSSON, Y; ARNEBORN, M.;THAM, W; DANIELSSON-THAM , M.L; OSTERMAN ,B.;LEFFLER, M.;STEEN ,M; ERIKSSON, E; HEDIN ,G; GIESECKE,J; Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese—an outbreak of listeriosis. **Epidemiol Infect.** v.130, p.79-86.,2003.

CARVALHO, J. D. G. **Avaliação da qualidade de queijos tipo Minas Frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializados em Campinas.** 2003. 107f. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade estadual de Campinas, Campinas.

CASTELLANO, P., FARIAS, M.E., STILES, M.E., HOLZAPFEL, W., VIGNOLO, G., Sensitivity variations of *Listeria* strains to the bacteriocins, Lactocin 70s, enterocin CRL 35 and nisin. **Biotechnology Letters**, v. 23, n.8, p. 605-608, 2001.

CASTRO, A. F. P. *Listeria*.In: TRABULSI, L. R. **Microbiologia.** 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1989. 386 p. cap. 26, p. 131-132.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria spp.*, coliformes totais e fecais e *E.Coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de alimentos**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 281-287, set./dez. 2001.

CAVALCANTE, J. F. M.; ANDRADE, N. J.; SILVA, R. F. N. Valorização do queijo de artesanal brasileiro: caso do queijo de coalho. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 215-218, jul./ago., 2004

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Salmonella* surveillance: Annual Summary, 2004. Atlanta: United States Department of Health and Human Services, CDC, 2005. 15p. Disponível em:<<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2004/Salmonellainroduction2004.pdf>>. Acesso em: 08 Mar. 2006.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION. Outbreak of *Listeria monocytogenes* infections associated with pasteurized milk from a local dairy – Massachusetts, 2007. **Morbidity and Mortality Weekly Reports**, Atlanta, v. 57, n. 40, p.1097-1100, Oct. 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), 2005. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved standard - Sixth Edition (M7-A6). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

CHAMBEL, L.; SOL, M.; FERNANDES, I.; BARBOSA, M.; ZILHÃO, I.; BARATA, B.; JORDAN, S.; PERNI, S.; SHAMA, G., ADRIÃO, A.; FALEIRO, L.; REQUENA, T.

PELÁEZ, C., ANDREW, P. W.; ENRITIRO, T. Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's Milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle, **International Journal of Food Microbiology**, v.116, p52-63, 2007.

CHARPENTIER E, GERBAUD G, JACQUET C, ROCOURT J, COURVALIN P. Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* species, **J. Infect. Dis.**v. 172, p. 277–281, 1995.

COLAK, H.; HAMPIKYAN H.; BINGOL, E.B.; ULUSOY,. Prevalence of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp in Tulum cheese. **Food Control**, v.18, p.576-579, 2007.

CONTER, M.; PALUDI, D.; ZANARDI, E.; GHIDINIS, S.; VERGARA, A.; LANIERI, Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*, **International Journal of Food Microbiology**, v.128, p. 497-500, 2009.

CORBIA, A. C. G.; NASCIMENTO, M. G. F.; NASCIMENTO, E. R.; LIGNON, G. B. Research on *Listeria monocytogenes* and total plate count in Minas Soft Chesse. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.23, n.2, p. 72-75, 2001.

CORDANO, A. M., & ROCOURT, J., Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. **International Journal of Food Microbiology**. v.70, p.175–178, 2001.

COUZINET S.; JAY, C.; BARRAS, C.; VACHON, R.; VERNET, G.; NINET, B.; JAN, I.; MINAZIO, M.; FRANCOIS, P.; LEW, D.; TROESCH, A.; SCHRENZEL, J. High-density DNA probe array for identification of *Staphylococci* to the species level. **Journal of Microbiological Methods**, n.6, p.201-208, 2005.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C. G. M.; STANFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 263-271, set/dez., 2002.

DALTON, C. B.; AUSTIN, C. C.; SOBEL, J.; HAYES. P. S.; BIBB, W. F.; GRAVES, L. M.; SWAMINATHAN, B.; PROCTOR, M. E.; GRIFFIN, P. M. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 336, n.2, p.100-105, Jan., 1997.

DALTON, C. B.; GREGORY, J.; KIRK, M. D.; STAFFORD, R. J.; GIVNEY, R.; KRAA, E.; GOULD, D. Foodborne disease outbreaks in Australia, 1995 to 2000. **Communicable Diseases Intelligence**, v. 28, n, 2, p, 211-224, 2004.

DE BUYSER, M. L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and different industrialized countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n. 1-2, p.1-17, 2001.

DEURENBERG, R. & STOBBERINGH, E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution**, v.8, p.747-763, 2008.

DIAS, D.A.M. **Persistência de cepas de *Listeria monocytogenes* em linha de abate industrial de frango em um matadouro localizado no Estado de São Paulo**. Dissertação. 2008, 84f.,(Mestre em Ciência dos Alimentos)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. São Paulo.

DOUMITH, M.; BUCHRIESER, C.; GLASER, P.; JACQUET, C.; MARTIN, P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.8, p. 3819-3822, 2004.

DREVETS, D. A., & BRONZE, M. S. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v. 53, n. 2, p.151-165, 2008.

DUNCAN, S.E.; YAUN,B.R.; SUNMER, S. S. Microbiological Methods for Dairy Products. In: WERH, H. M.; FRANZ, J. F. (Eds.). **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, 17th ed. American Public Health Association, Washington, D. C. Chapter 9, p. 249-268, 2004.

EL-SHENAWY, M. A. Sources of *Listeria* spp. in domestic food processing environment. **International Journal of Environmental Health Research**, v.8, n.3, p.241-251, 1998.

FACINELLI, B., GIOVANETTI, E., VARALDO, P. E., CASOLARI, P., & FABIO, U. Antibiotic resistance in foodborne *Listeria*. **Lancet**, v. 338, p.1272, 1991.

FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological review**. v. 55, n.3, p. 476 – 511, 1991.

FARBER, J. M., WARBURTON, D. W., BABIUK, T. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. **Government of Canada – Method Health Protection Branch - HBP**, Quebec (Canadá): Polyscience Publication, Sep. 1994. 16 p. (MFHPB-30).

FEITOSA, T.; BORGES, M. F de; NASSU, R. T; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. **Pesquisa de Salmonella sp., Listeria sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 23, n. suplemento, p. 162-165 dez., 2003.

FERNANDES. M.S, **Avaliação de risco e de pontos críticos de contaminação por Enterococcus spp. e Bacillus cereus no processamento de ricota**. Dissertação. 152f. (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Faculdade Estadual de Campinas. Campinas.

FIGUEIREDO, E. A. T. **Ocorrência do gênero *Listeria* e avaliação da diversidade genética de *Listeria monocytogenes* através do rondam amplified polymorphic DNA (RAPD) e sua distribuição em uma linha de processamento de leite pasteurizado tipo C**. 2000. 100p. Tese (Doutor em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

FLEMING, D. W.; COCHI, S. L.; MACDONALD, K. L.; BRONDUN, J.; HAYES, P. S.; PLIKAYTIS, B. D.; HOIMES, M. B.; AUDURIER, A.; BROOME, C. V.; REINGOLD, A. L. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New England Journal of Medicine*, Boston, v. 312, n. 7, p. 404-407, Jan., 1985.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; SWEENEY, P. L. H. *Fundamentals of cheese science*. Massachusetts: Kluwer Academic, 2000 . 587p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2002. 184p.

FRILABO, **Foto *Listeria monocytogenes***. Disponível em <<http://www.frilabo.pt/fcms/images/stories/Listeriamonocytogenes.jpg>>. Acesso em 25 jan. 2010.

GABIS, D. A.; FLOWERS, R. S.; EVANSON, D.; FAUST, R. E. A survey of 18 dry dairy processing plant environments for *Salmonella*, *Listeria* and *Yersinia*. *Journal of Food Protection*, v. 52, n.2, p.122-124, 1989.

GAHAN C. G. M. & HILL, C. Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of Applied Microbiology*. v. 98, p. 1345-1353, 2005.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M.L. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of food Microbiology*. v.113, p.1-15, 2007.

GARRITY, G.M.; HOLT, J.G. The road map to the manual. In: Boone, DR, Castenholz, RW (Eds). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, New York: Berlim: Springer-Verlag, 2001, v.1, p. 119-166.

GAULIN, C.; RAMSAY, D.; RINGUETTE, L.; ISMAIL, J. First documented outbreak of *Listeria monocytogenes* in Quebec, 2002. *Canada Communicable Disease Report*, Quebec, v. 29, n. 21, Nov., 2003. Disponível em: <hc-sc.gc.ca/pphb-dgspsp/publicat/ccdr-/03vol29/dr2921ea.html>. Acesso em: 01 Mar. 2006.

GOMBAS, D. E., CHEN, Y., CLAVERO, R. S., SCOTT, V. N. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Journal of Food Protection*, v. 66, n. 4, p.559 – 569, 2003.

GOMES, T. A. T.; TOLEDO, M.R. F.; TRABULSI, L. R. Genética Bacteriana, In: TRABULSI, L.R., **Microbiologia**. 2 ed. Rio de Janeiro, São Paulo: Atheneu, 1989, 368p. cap.4, p.25-35.

GOROSTIZA, A.; CICHOSCKI, A. J.; VALDUGA, A. T.; VALDUGA, E.; BERNARDO, A.; FRESNO, J. M. Changes in soluble nitrogenous compounds, caseins and free amino acids during ripening of artisanal Prato cheese: a Brazilian semi-hard cows variety. *Food Control*, v. 85, n. 3, p. 407-414, 2004.

GOULET, V.; HEDBERG, C.; LE MONNIER, A.;VALK, H. Increasing Incidence of listeriosis in France and Other European Countries. **Emerging Infectious Diseases**. v.14, n 5, 2008.

GRAVES, L.M., HELSEL, L.O., STEIGERWALT, A.G., MOREY, R.E., DANESHVAR, M.I., ROOF, S.E., ORSI, R.H., FORTES, E.D., MILILLO, S.R., DENBAKKER, H.C., WIEDMANN, M., SWAMI-NATHAN, B., SAUDERS, B.D., 2010. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment. Finger Lakes National Forest. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.60, p. 1280–1288, 2010.

GRAY, M.L.; KILLINGER, A.H. *Listeria monocytogenes* and *Listeria* infections. **Bacteriology Reviews**, v.30, n.2, p. 309-382, 1966.

GUERRA, M.M.M.; BERNARDO, F.M.A. Ocorrência Natural de *Listeria spp.* em Queijos Alentejanos (Portugal). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. V.XCIV, n.531, p.142-147, 1999.

HANSEN, J. M., P. GERNER-SMIDT, AND B. BRUUN. Antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* in Denmark 1958-2001. **APMIS**. n.113, p.31-36, 2005.

HARAKEN, S.; SALEH, I.; ZOUHAIRI, O.; BAYDOUN, E.; ALWAN, N. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy-based food products, **Science of the Total Environment**, n.407, p.4022-4027, 2009.

HERVEY, C.; ESPIÉ, E.; VALK, H.; VAILLANT, V. Two outbreaks of *Salmonella Enteritidis* phage type 8 linked to the consumption of Catal cheese made with raw milk, France, 2001. **European Communicable Disease Bulletin**, v.8, n.7-8, p.151-168, 2003.

HOF, H., History and epidemiology of listeriosis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, n.35, p.199–202, 2003.

HOFER, E.; REIS, C.M.F. Species and serovars of *Listeria* isolated from sick and clinically healthy animals in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 79-83, 2005.

HOLT, J. G. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's of Manual Determinative Bacteriology**. 9^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, 787p.

INTERNATIONAL COMMISSION IN MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS - ICMSF. **Microorganisms in food: characteristics of microbial pathogens**. London: Blackie Academic & Professional, v.5. 513p., 1998.

IZQUIERDO, E.; MARCHIONI, E.; AOUDE-WERNER, D.; HASSELMANN, C.; ENNAHAR, S. Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacteriocin. **Food Microbiology**. V. 26, p.16–20, 2009.

JABLONSKI, L. M.; BOHACH, G. A. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology, fundamentals and frontiers**. 2nd ed., Washington: ASM, 2001. Cap. 19, p. 411-434.

JACQUET, C., GOUIN, E., JEANNEL, D., COSSART, P. ROCOURT, J. Expression of ActA, Ami, InlB, and Listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. **Appl. Environ. Microbiol**, v.68, p.616-622, 2002.

JANTZEN, M. M. ; J. NAVAS, M. ; M. de Paz, B. ; PAZ, M. ; M. Nuñez ; SILVA, W. P.; Martínez-Suárez, J. . Evaluation of ALOA plating medium for its suitability to recover high pressure-injured *Listeria monocytogenes* from ground chicken meat. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, p. 313-317, 2006.

JAY, J. M. Listerioses de origem animal In: **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre 6 ed: Artmed, 2005. 711 p., cap. 25, p. 517-542.

JEMMI, T.; STEPHAN, R.; *Listeria monocytogenes* food-borne pathogen and hygiene indicator, **Rev. Sci. Tech. off Epiz.**, v.25, n.2, p. 571-580, 2006.

KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in latin-style fresh-cheese processing plants. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 87, n. 9, p. 2803-2812, Sept. 2004.

KATHARIOU, S. Pathogenesis determinants of *Listeria monocytogenes*: **Microbial foodborne diseases**. In: CARY, J. W.; LINZ, J.W; LINZ, J.E.; BHATNAGAR, D. Techonomics Publishing Co. Lancaster, Pa. p. 295-314, 2000.

KORNAVACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae, Coliforms, and Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In.: **APHA Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods**. 4^o ed. Washington: APHA, 2001. chap. 8, p69-82.

LADO, B. H., & YOUSEF, A. E. (2007). Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In E. T. Ryser, & E. H. Marth (Eds.), *Listeria, listeriosis and food safety*, p. 157-214. CRC Press.

LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. M. O. P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Contagem de *Staphylococcus sp.* e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária de Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 5, p. 702-709, maio, 2005.

LAWRENCE L. M. & GILMOUR, A. Incidence of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environmental and in a poultry products and their rapid confirmation by multiplex PCR. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 60, p. 4600-4604, 1994.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genetics, **Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.

LECLERCQ, A.; CLERMONT, D.; BIZET, C.; GRIMONT, P. A. D.; FLÈCHE-MATÉOS, A. L.; ROCHE, S. M.; BUCHRIESER, C.; CADET-DANIEL, V.; LE MONNIER, A.; LECUIT, M.; ALLERBERGER, F., *Listeria rocourtiae* sp. nov.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, doi:10.1099/ijs.0.017376-0, nov, 2009.

LEITE JÚNIOR, A. F. S.; FLORENTINO, E. R.; OLIVEIRA, E. B. D. de; TORRANO, A. D. M. Qualidade microbiológica do “queijo de coalho” comercializado à temperatura ambiente ou sob refrigeração, em Campina Grande (PB), **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n. 73, p. 53-59, jun.2000.

LEMES-MARQUES, E.G.; CRUZ, C.D.; DESTRO, M.T. Pheno and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates from the southern region of the state of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.1236-1243, 2007.

LIMA, Andréia Saldanha. **Disseminação de *Listeria monocytogenes* no processamento de lingüiça mista frescal avaliada por sorologia e RAPD**. 2004. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

LIU, D. Identification subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. **Journal Med Microbiolgy**, v. 55, p. 645-659, 2006.

LIU, S.; PURI, V.; DEMIRCI, A., Evaluation of *Listeria innocua* as a suitable indicator for replacing *Listeria monocytogenes* during ripening of Camembert cheese. **International Journal of Food Science and Technology**. v.44, p. 29-35, 2009.

LOGUERCIO, A.P.; ALEIXO, J.A.G. Microbiologia de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 6, p. 1063-1067, 2001.

LOVETT, J. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M.P. Food borne bacterial pathogens. **New york: Marcel Dekker, Inc.** 1989. cap. 7, p. 283-310.

LÜBECK, G.M.; LARA, J.A.F.; BAGATINI, L.; KAMIZAKI, N.K.K.; MIGLIORANZA, L.H.S. Avaliação de características físico-químicas e microbiológicas de algumas marcas de queijo tipo colonial, produzido no sudoeste do Estado do Paraná. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 18., Juiz de Fora. Anais. Juiz de Fora: [EMBRAPA], 2001. p.184-193.

LUNDÉN, J. M.; AUTIO, T. J.; KORKEALA, H. J. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 87, n. E. Suppl., p. E6-11, July, 2004.

LUONG, T.; DUNMAN, P. M.; MURPHY, E.; PROJAN, S. J.; LEE, Y. Transcription profiling of mgrA Regulon in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v.188, n.5, p.1899-1910, 2006.

LYYTIKÄINEN, O.; AUTIO, T.; MAIJALA, R.; RUUTU, P.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; MIETTINEN, M.; HATAKKA, M.; MIKKOLA, J.; ANTTILA, V.-J.; JOHANSSON, T.; RANTALA, L.; AALTO, T.; KORKEALA, H.; SIITONEN, A. An outbreak of *Listeria*

monocytogenes serotype 3a infections from butter in Finland. **The Journal of Infectious Diseases**, v.181, n.5, p.1838-1841, May, 2000.

MACDONALD, P. D. M.; WHITWAM, R. E.; BOGGS, J. D.; MACCORMACK, J. N.; ANDERSON, K. L.; REARDON, J. W.; SAAH, J. R.; GRAVES, L. M.; HUNTER, S. B.; SOBEL, J. Outbreak listeriosis among mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 5, p. 677-682, Chicago, EUA, 2005.

MAKINO, S. I.; KAWAMOTO, K.; TAKESHI, K.; OKADA, Y.; YAMASAKI, M.; YAMAMOTO, S.; IGIMI, S. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, n. 2 p. 189-196, 2005.

MANTILLA, SAMIRA P. S. Importância da *Listeria monocytogenes* em alimentos de origem animal, **Revista FZVA**, v.14, n.1, p. 180-192, 2007.

MATARAGAS, M., DROSINOS, E. H., METAXOPOULOS, J. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *L. monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$. **Food Microbiology**, 2003, 20, p. 259-265.

MATTOS, R.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; MAGNANI, D.; NERO, L.A.; BARROS, M.; PIRES, E., PAQUEREAUS, B., Qualidade do leite cru produzido na região do agreste de Pernambuco, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 173-182, jan./mar. 2010.

MILLEZI, A.; TONIAL, T.; ZANELLA, J.; MOSCHEN, E.; AVILA, C.; KAISER, V.; HOFFMEISTER, S. Avaliação e qualidade microbiológica das mãos dos manipuladores e do agente sanificante na indústria de alimentos. **Revista Analytica**, n.28, p.74-80, 2007.

MIRHOSSEINI, M., NAHVI, I., TAVASSOLI, M., Characterisation of anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocins from Enterococcus faecium strains isolated from dairy products. **International Journal of Dairy Technology**, v.63, n.1, p. 55-61, 2010.

MURRAY, E.G.D.; WEBB, R.E.; SWANN, M.B.R. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by hitherto undescribed *bacillus Bacterium monocytogenes*. **Journal Pathology Bacteriology**, v.29, p.407-439, 1926.

NALÉRIO, E.S. **Aspectos epidemiológicos e moleculares de *Listeria spp.* e de *Listeria monocytogenes* na cadeia produtiva de aves do sul do Rio grande do Sul**. Dissertação, 2007. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

NALÉRIO, É. S. ; ARAUJO, M. R. ; SEQUEIRA, K. ; BASSANI, M. T. ; SILVA, W. P. *Listeria monocytogenes*: monitoramento desse perigo biológico na cadeia produtiva

de frangos do sul do Rio Grande do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 3, p. 626-630, 2009.

NASSU RT, LIMA JR, BASTOS RSM, MACEDO AB, LIMA PHM. Diagnóstico das condições de processamento de queijo de coalho e manteiga da terra no Estado do Ceará. **Revista Higiene Alimentar**, v.15, n. 89, p. 28-36, 2001.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARD/NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Pennsylvania, 2005. (NCCLS document M2-M8 and supplemental tables M100-S15).

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PONTES NETTO, D.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* and chemical residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 211-215, jul./set. 2004.

NORMANNO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S.; MULA, G; DAMBROSIO, A.; POGGIU, A.; DECASLELLI, L.; MIONI, R.; SCUOTA, S.; BALZONI, G.; DI GIANNATALE, E.; SALINETTI, A. P.; LA SALANDRA, G.; BARTOLI, M; ZUCCON, F.; PIRINO, T.; SIAS, S.; PARISI, A.; QUAGLIA, N. C.; CELANO, G. V. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, n. 1, p. 73-79, Jan., 2005.

OKURA, M.H. **Isolamento e identificação de enteropatógenos de leite cru produzido nas microrregiões do Triângulo Mineiro, MG**. 2002. 68f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – FCAV, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

OLSEN, S. J.; MACKINON, L. C.; GOULGING, J. S.; SLUTSKER, L. Surveillance for foodborne diseases outbreaks, 1992-1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 49, n.01, p. 1-51, 2000.

PAINTER, J.; SLUTSKER, L. **Listeria, listeriosis, and food safety**, New York, Marcel Dekker. 3^aed. Cap.4, p.85-109, 2007.

PELLES, F., WAGNER, M.; VARGA, L.; HEIN, I.; BÉRI, B.; SZABÓ, A. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. **International Journal of Food Microbiology**, v.118, p.186-193, 2007.

PEREIRA, S, O. R.; PEREIRA, K.C. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do queijo canastra e de sua matéria prima produzidos na região de São Roque de Minas (MG). **Scientiae et Praxis**, v.1, n.2, 2008.

PERRIN, M., BEMER, M., DELAMARE, C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**.v. 41, n. 11, p. 5308-5309, 2003.

PERRY, K.S.P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v.27, n.2, p.293-300, 2004.

PESAVENTO, G., DUCCI, B., NIERI, D., COMODO, N., NOSTRO, A. LO, Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods, **Food Control**, v.21, p.708–713, 2010.

PHILLIPS, I., CASEWELL, M., COX, T., DEGROOT, B., FRIIS, C., JONES, R., NIGHTINGALE, C., PRESTON, R., WADDELL, J., Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 23, p.28–52, 2004.

PINTADO, C.M.B.S.; OLIVEIRA, A.; PAMPULHA, M.E.; FERREIRA, M.A.S.S. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. **Food Microbiology**, v. 22, p. 79-85, 2005.

POURSHABAN, M., FERRINI, A. M., CANNONI, V., OLIVA, B., & AURELI, P. Transferable tetracycline resistance in *Listeria monocytogenes* from food in Italy. **Journal of Medicine Microbiology**, v.51, n.7, p. 564–566, 2002.

POYART-SALMERON, C., CARLIER, C., TRIEU-CUOT, P., COURTIEU, A.L., COURVALIN, P. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. **The Lancet**. v.335, p. 1422–1426, 1990.

PRITCHARD, T. J.; BELIVEAU, C. M.; FLANDERS, K. J.; DONNELLY, C.W. Increased incidence of *Listeria* species in dairy processing plants having adjacent farm facilities. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.57, n.9, p.770-775, 1995.

RAHIME, E.; AMERI, M.; MONTAZ, H., Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from milk and dairy products in Iran. **Food Control**, n.21, p.1448-1452, 2010.

REIJ, M.W., DEN ANTTREKKER, E.D. Recontamination as source of pathogens in processed foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.91, p.1-11, 2004.

ROBBINS, J.B.; FISCHER, C.W.; MOLTZ, A.G.; MARTIN, S.E. Elimination of *Listeria monocytogenes* biofilms by ozone chiorii, and hydrogen peroxide. **Journal of food Protection**, Des Moines, v.68, n.3, p.494-398, 2005.

ROCHA, J. A.K. **Estudo da presença de *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* em indústria processadora de queijo minas frescal**. Dissertação. 2004 89f. (Mestre em tecnologia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ROCOURT, J. *Listeria monocytogenes*: the state of the science. **Dairy Food and Environmental Sanitation**, London, v. 14, n. 2, p. 70-82, 1994.

ROCOURT, J., & BUCHRIESER, C. (2007). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position. In E. T. Ryser, & E. H. Marth (Eds.), **Listeria, listeriosis and food safety** (pp. 1e20). CRC Press.

RODAS-SUAREZ, O.R., FLORES-PEDROCHE, J.F., BETANCOURT-RULE, J.M., QUINONES-RAMIREZ, E.I., VAZQUEZ-SALINAS. Occurrence and antibiotic

sensitivity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from oysters, fish, and estuarine water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.7410–7412, 2006.

RODRIGUES- LAZARO, D., et al., Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real – time PCR: assessment of hly, iap and lin 02482 targets and amplifluor technology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p 1366-1377, 2004

RYSER, E.T.; DONNELLY, C.W. *Listeria*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: APHA, 2001. p.343-353.

SAFDAR, A., ARMSTRONG, D.. Antimicrobial activities against 84 *Listeria monocytogenes* isolates from patients with systemic listeriosis at a comprehensive cancer center (1955–1997). **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, p.483–485, 2003.

SALAMANO, R.; BRASELLI, A.; HOPPE, A.; MONTEGHIRFO, R.; SILVA, T. Neurolisteriosis in adults: report of six clinical cases. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**. São Paulo, v.63, n. 4, p. 1063-1069, 2005.

SAMELIS, J., KAKOURI, A., PAPPA, E.C., MATIJASIC, B.B., GEORGALAKI, M. D., TSAKALIDOU, E., ROGELJ, I. Microbial Stability and Safety of Traditional Greek Graviera Cheese: Characterization of the Lactic Acid Bacterial Flora and Culture-Independent Detection of Bacteriocin Genes in the Ripened Cheeses and Their Microbial Consortia. **Journal of Food Protection**, v.73, n. 7, p. 1294-1303, 2010.

SANCHEZ, G.N.; RODRIGUES, RM.; OLIVEIRA, P.R.; GARZA, L.M. Development of two Multiplex polymerase chain reaction for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. **Journal of Food Protection**, v.66, n.6, p.1055-1062, 2002.

SAUDERS, B. D.; WIEDMANN, M. **Listeria, Listeriosis, and food safety**, New York: Marcel. Dekker, 3^a ed. Cap.1, p. 1-20, 2007.

SCHITTLER, LIZIANE. **Caracterização molecular e sorotipificação de *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* isoladas em matadouro -frigorífico de suínos da região das missões-RS**. Pelotas, 2008. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial). Universidade Federal de Pelotas, 2008.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 17, n. 1, p. 14-56, Jan., 2004.

SEELIGER, H. P. R.; JONES, D. genus *Listeria*. In: SNEATH, P. H. A. (Ed). Berguey's **Manual of sistematic bacteriology**. 9th ed. Baltimore, USA: The Willians Wilkins Co., 1986. v. 2, p.1235-1245.

SHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C. V. Epidemiology of human listeriosis. **Clinical Microbiology**. V.4, p. 169-183. 1991.

SILVA, I. M. M.; ALMEIDA, R. C. C.; ALVES, M. A. O.; ALMEIDA, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. In critical control points and the environment of Minas frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 81, n. 03, p. 241-248, Mar., 2003.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V.A.C., SILVEIRA, F.A. **Métodos de análises microbiológica de alimentos**. Manual técnico ITAL n. 14, Campinas, p. 135-141. 1997.

SNAPIR, Y.M.; VAISBEIN, E.; NASSAR, F. Low virulence but potentially fatal outcome - *Listeria ivanivii*. **European Journal of Internal Medicine**, v.17, p.286-287, 2006.

SORIANO, J. M.; FRONT, G.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J. Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. Trends in **Food Science and Technology**, Cambridge, v. 13, n. 2, p. 60-67, Feb., 2002.

STONSAOVAPAK, S.; BOONYARATANAKORNKIT, M. Prevalence and antimicrobial resistance of *listeria* species in food products in Bangkok, Thailand. **Journal of Food Safety**. n.30, p.154–161, 2010.

SWAMINATHAN, B.; DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. In: (Ed.). **Food microbiology, fundamentals and frontiers**. 2nd ed., Washington D. C.: ASM, 2001. Chap. 18, p. 383-409.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, n.9, p.1236-1243, 2007.

TOMPKIN, R. B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 4, p. 709-725, Nov., 2002.

TRABULSI, LUIZ RACHID; ALTETTHUM, FLAVIO. **Microbiologia**. 5^oed. São Paulo: Atheneu, 2008.760p.

VAZ, C.S.L. **Determinação da diversidade fenotípica e genotípica de Salmonella entérica subsp. Entérica sorovar Enteritidis no Rio Grande do Sul**. 2007. 137f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

VAZQUEZ-BOLAND, J. A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMINGUES-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZALEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 3, p. 584-640, July, 2001.

VITAS, A. I.; AGUADO, V.; GARCIA-JALON, I. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p. 349-356, 2004.

VON LAER, A., **Mapeamento da contaminação por *Listeria monocytogenes* em uma planta de processamento de lingüiça mista frescal através de sorologia e**

PFGE. Pelotas, 2004.79f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPeL, 2004.

WERBER, D.; DREESMAN, J.; FEIL, F.; VAN TREECK, U.; FELL, G.; ETHELBRG, S.; FISHER, I. S. T.; BEHNKE, S. C.; BARTELT, E.; WEISE, E.; ELLIS, A. SIITONEN, A.; ANDERSON, Y; TSCHÄPE, H.; KRAMER, M. H.; AMMON, A. International outbreak of Salmonella Orangeburg due to German chocolate. **BMC Infectious Diseases** v. 5, n. 7, p. 1-10, 2005.

WESLEY, I.W. **Listeria, listeriosis, and food safety.** New York: Marcel Dekker, 3ªed., cap 3, p.55-84, 2007.

WEHR, H.M. *Listeria monocytogenes* – a current dilemma special report. J. Assoc. Off. Anal. Chem. v.70, p. 769 772, 1987.

WHITE, D.G.; ZHAO, S.; SIMJEE, S.; WAGNER, D.D.; MCDERMOTT, P.F. resistance of foodborne pathogens. **Microbes and Infection**, 4(4): 405-412, 2002.

YUCEL, N.; CITAK, S.; ÖNDER, M.; prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey, Food Microbiology, n. 22, p.241-245, 2005.

ZHANG, Y., YEHA, E., HALLB, G., CRIPEB, J., BHAGWATC, A.A., MENGET, J., Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods. **International Journal of Food Microbiology**, n.113, p.47–53, 2007.