

WANDA MOSCALEWSKI ABRAHÃO

MÉTODO DE DETECÇÃO E OCORRÊNCIA DE *Listeria monocytogenes* E DE OUTROS MICRORGANISMOS EM QUEIJOS COMERCIALIZADOS NO ESTADO DO PARANÁ

CURITIBA
2008

WANDA MOSCALEWSKI ABRAHÃO

MÉTODO DE DETECÇÃO E OCORRÊNCIA DE *Listeria monocytogenes* E DE OUTROS MICRORGANISMOS EM QUEIJOS COMERCIALIZADOS NO ESTADO DO PARANÁ

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

CURITIBA
2008

Para:

*Aos meus queridos e saudosos: pais
Pedro Moscalewski e Lydia Regina
Sikorski Moscalewski, e irmã Isabel
Maria.*

*Ao meu querido filho Paulo Henrique e
Paulo, meu esposo, amigo e amor.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, benção e proteção.

À Universidade Federal do Paraná, por propiciar meios para freqüentar o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

À Secretaria de Estado da Saúde por permitir a realização da parte experimental nas instalações do Laboratório Central do Estado.

A Fundação Araucária pelo patrocínio de parte do projeto.

Ao Professor Doutor Roberto Pontarolo, pela orientação e estímulo para a realização deste trabalho, e sua dedicação ao curso de Pós-Graduação.

À Prof. ^a Dr. ^a Marion Burger, nascente de inspiração, que participou com compreensão e carinho na elaboração do projeto e em muitos momentos da execução de meus trabalhos.

Aos farmacêuticos Maria Augusta Leone, Daniel de Christo, Ana Maria Senff e Carmen Lúcia Gomes Souza pela expressiva colaboração na realização da parte prática.

Aos servidores públicos e colegas da Secretaria de Estado da Saúde do Laboratório Central do Estado – LACEN, nos setores de Microbiologia de Alimentos, Biologia Molecular, Meios de Cultura, Reativos e Esterilização.

Aos colegas do Departamento de Farmácia pelo apoio recebido.

Ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo pela confirmação das cepas isoladas.

Ao meu marido Paulo por seu amor, carinho, incentivo e apoio irrestrito.

Agradeço da forma mais especial e carinhosa possível, ao meu filho Paulo Henrique, pela compreensão nos momentos que não pude estar junto em decorrência das necessidades do doutoramento.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente ou anonimamente colaboraram na execução desta jornada, e que tornaram viáveis todos os passos para a realização do curso.

SUMÁRIO

	<i>p</i>
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
2.1 OBJETIVO GERAL.....	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
3 REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1 QUEIJO.....	6
3.1.1 Breve história da origem do queijo.....	6
3.1.2 Definição.....	6
3.1.3 Classificação.....	7
3.1.3.1 Classificação dos queijos de acordo com seu conteúdo de umidade e os microrganismos que participam na maturação, segundo Walter e Hargrove (1972).....	7
3.1.3.2 Classificação pelo teor de umidade.....	8
3.1.3.3 Classificação de acordo com o conteúdo de matéria gorda no extrato seco	9
3.1.4 Processo de fabricação.....	10
3.2 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE <i>Listeria</i> spp.....	11
3.3 CARACTERÍSTICAS DE <i>Listeria</i> spp e DE <i>Listeria monocytogenes</i>	13
3.3.1 <i>Listeria</i> spp.....	13
3.3.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	15
3.4 MECANISMOS DE VIRULÊNCIA DE <i>Listeria monocytogenes</i>	20
3.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS CAUSADAS POR <i>Listeria</i> spp.....	23
3.6 IMPORTÂNCIA DA <i>Listeria monocytogenes</i> NA CONTAMINAÇÃO DOS ALIMENTOS.....	25
3.6.1 Listerioses transmitidas por leite cru.....	29
3.6.2 Listerioses transmitidas por leite pasteurizado.....	30
3.6.3 Listerioses transmitidas por queijos e outros produtos lácteos.....	31
3.6.4 Listerioses transmitidas por produtos cárneos.....	34

3.6.5	Listerioses transmitidas por aves e ovos.....	34
3.6.6	Listerioses transmitidas por pescados.....	35
3.6.7	Listerioses transmitidas por vegetais.....	35
3.6.8	Outros alimentos associados à listeriose.....	35
3.7	OCORRÊNCIA DE <i>Listeria monocytogenes</i> EM LEITE E DERIVADOS.....	36
3.8	OCORRÊNCIA DE <i>Listeria monocytogenes</i> EM OUTROS PRODUTOS.....	47
3.8.1	Produtos cárneos.....	47
3.8.2	Outros produtos de origem animal.....	48
3.8.3	Aves e ovos.....	50
3.8.4	Pescados.....	51
3.8.5	Vegetais.....	52
3.9	METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA O ISOLAMENTO DE <i>Listeria</i> spp.....	54
3.9.1	Metodologias convencionais para o isolamento de <i>Listeria monocytogenes</i>	57
3.9.1.1	Plaqueamento direto.....	57
3.9.1.2	Métodos com meios de enriquecimento.....	58
3.9.2	Métodos rápidos utilizados para a detecção de <i>Listeria monocytogenes</i>	62
3.9.3	Sistemas para identificação de colônias isoladas.....	70
3.9.3.1	Método convencional para identificação das colônias isoladas e diferenciação de espécies de <i>Listeria</i>	70
3.9.3.2	Sistemas alternativos para identificação das colônias isoladas e diferenciação de espécies de <i>Listeria</i>	72
3.9.4	Métodos moleculares utilizados para a detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> ...	73
4.	MATERIAL E MÉTODOS	79
4.1	MATERIAL.....	79
4.1.1	Área de abrangência do estudo.....	79
4.1.2	Produtos lácteos (queijos).....	80
4.1.3	Cepas padrões de referência.....	82
4.1.4	Meio de cultura, soluções, reagentes, insumos e diversos.....	83
4.1.4.1	Meios de cultura.....	83
4.1.4.2	Soluções, reagentes , insumos e diversos.....	86

4.2 MÉTODO.....	87
4.2.1 Recepção e preparação das amostras para análise.....	89
4.2.2 Método convencional para pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	89
4.2.2.1 Enriquecimento seletivo.....	91
4.2.2.2 Plaqueamento seletivo diferencial	92
4.2.2.3 Confirmação das colônias típicas	92
4.2.2.4 Teste sorológico – soroaglutinação rápida.....	97
4.2.3 Metodologia VIP para pesquisa de <i>Listeria</i> spp.	97
4.2.3.1 Enriquecimento seletivo primário.....	97
4.2.3.2 Enriquecimento seletivo secundário.....	98
4.2.3.3 Inoculação do sistema reagente.....	98
4.2.3.4 Leitura do sistema reagente.....	98
4.2.3.5 Plaqueamento seletivo diferencial e identificação bioquímica e sorológica preliminar.....	99
4.2.4 Caracterização bioquímica, sorológica complementar e genotipagem dos isolados de <i>Listeria</i> spp.	100
4.2.5 Indicadores usados para avaliação das metodologias utilizadas na pesquisa de <i>Listeria</i> spp.(método convencional e VIP).....	101
4.2.6 Análise estatística dos dados.....	102
4.2.7 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	102
4.2.8 Número mais provável de coliformes a 45°C	105
4.2.9 Número mais provável de <i>Escherichia coli</i>	106
4.2.10 Contagem de esfatilococos coagulase positiva e <i>S. aureus</i>	107
4.2.11 Contagem de <i>Bacillus cereus</i>	111
4.2.12 Contagem de <i>Clostridium perfringens</i>	117
4.2.13 Determinação da umidade	120
4.2.14 Método de biologia molecular para pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	121
4.2.14.1 Realização da caracterização molecular de cepa padrão 07F7G de <i>L. monocytogenes</i>	122
4.2.14.2 Testes de comparação do crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em diferentes caldos de enriquecimento e períodos de incubação	123

4.2.14.3	Modificações da técnica de extração de DNA utilizando Proteinase K	123
4.2.14.4	Realização de testes com o DNA extraído do caldo de enriquecimento de amostras de queijo contaminadas naturalmente	125
4.2.14.5	Amplificação do gene <i>Dth</i> 18.....	125
4.2.14.6	Amplificação do gene <i>hly</i> A.....	125
4.2.14.7	Amplificação do gene <i>iap</i>	126
4.2.14.8	Visualização dos marcadores moleculares.....	126
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	128
5.1	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA DOS QUEIJOS COMERCIALIZADOS NO ESTADO DO PARANÁ.....	128
5.1.1	Classificação dos queijos de acordo com o teor de umidade.....	128
5.1.2	Ocorrência de <i>Listeria</i> spp. nos queijos	129
5.1.2.1	Pesquisa de <i>Listeria</i> spp. pelo método convencional.....	130
5.1.2.2	Pesquisa de <i>Listeria</i> spp. pelo método VIP.....	130
5.1.3	Comparação do resultado obtido pelo método convencional e VIP na pesquisa de <i>Listeria</i> spp.	131
5.1.3.1	Comparação da sensibilidade e especificidade dos métodos convencional e VIP na detecção de <i>Listeria</i> spp.	135
5.1.4	Resultados da avaliação da qualidade dos queijos analisados em relação a diferentes microrganismos	140
5.1.4.1	Análise dos resultados microbiológicos dos tipos de queijo coletados nos pontos de comercialização	140
5.1.4.2	Avaliação dos queijos obtidos de pontos de comercialização em relação aos limites de tolerância microbiológica conforme legislação vigente	145
5.1.4.3	Avaliação microbiológica das amostras de queijo envolvidas em DTA.....	152
5.2	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>L. monocytogenes</i>	155
5.2.1	Caracterização molecular da cepa padrão 07F7G de <i>L. monocytogenes</i>	155
5.2.2	Caracterização molecular da cepa padrão 07F7G de <i>L. monocytogenes</i> após enriquecimento em LEB, TSB-Y, Fraiser e Fraiser modificado	156
5.2.3	Caracterização molecular de <i>L. monocytogenes</i> nas amostras naturalmente contaminadas.....	158
6	CONCLUSÕES	162
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	164

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	<i>p</i>
FIGURA 01 - FABRICAÇÃO DE QUEIJO EM PLANTA INDUSTRIAL.....	9
FIGURA 02 - PROCESSO GERAL DE ELABORAÇÃO DE QUEIJO.....	10
FIGURA 03 - DIVISÃO ADMINISTRATIVA DA SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ SEGUNDO AS REGIONAIS DE SAÚDE – 2002.....	79
FIGURA 04 - FLUXOGRAMA DE ETAPAS PARA A DETECÇÃO DE <i>Listeria spp</i> ATRAVÉS DO MÉTODO CONVENCIONAL.....	91
FIGURA 05 - DIAGRAMA DAS ETAPAS PARA A CONFIRMAÇÃO DAS COLÔNIAS TÍPICAS DE <i>Listeria spp.</i>	93
FIGURA 06 - LEITURAS DO SISTEMA REAGENTE VIP.....	99
FIGURA 07 - PROCEDIMENTO DE DETECÇÃO DE <i>Listeria spp</i> PELO VIP.....	100
FIGURA 08 - FÓRMULA PARA AVALIAÇÃO DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DE MÉTODOS DE DETECÇÃO	102
FIGURA 09 - ESQUEMA DE ANÁLISE PARA DETECÇÃO DE <i>Salmonella spp.</i> EM ALIMENTOS	105
FIGURA 10 - ESQUEMA DEMONSTRANDO A TÉCNICA DE NMP DE COLIFORMES A 45°C E <i>E.coli</i> ...	106
FIGURA 11 - ESQUEMA DA FORMAÇÃO DE COÁGULO NA REAÇÃO DE COAGULASE DE <i>S. aureus</i>	109
FIGURA 12 - ESQUEMA DEMONSTRANDO A TÉCNICA DE CONTAGEM DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA E <i>S. aureus</i> POR PLAQUEAMENTO EM SUPERFÍCIE.....	111
FIGURA 13 - ESQUEMA DEMONSTRANDO A TÉCNICA DE CONTAGEM DE <i>Bacillus cereus</i> PELO MÉTODO DE PLAQUEAMENTO DIRETO EM SUPERFÍCIE.....	115
FIGURA 14 - ESQUEMA DEMONSTRANDO PROVAS DIFERENCIAIS COMPLEMENTARES PARA <i>Bacillus cereus</i>	117
FIGURA 15 - ESQUEMA DEMONSTRANDO A TÉCNICA DE CONTAGEM DE <i>Clostridium perfringens</i> PELO MÉTODO DE PLAQUEAMENTO DIRETO EM PROFUNDIDADE.....	120
FIGURA 16 - ESQUEMA DA TÉCNICA CONVENCIONAL DE EXTRAÇÃO DO DNA PELA PROTEINASE K.....	122
FIGURA 17 - ESQUEMA DE ETAPAS PARA EXTRAÇÃO DE DNA PELA TÉCNICA DE PROTEINASE K MODIFICADA.....	124
FIGURA 18 - CLASSIFICAÇÃO DOS QUEIJOS QUANTO AO TEOR DE UMIDADE.....	129
FIGURA 19 - OCORRÊNCIA DE <i>Listeria spp.</i> EM AMOSTRAS DE QUEIJOS ANALISADAS NO ESTADO DO PARANÁ.....	133
FIGURA 20 - CONTEÚDO DE UMIDADE DOS QUEIJOS E NÍVEL DE CONTAMINAÇÃO COM <i>L. monocytogenes</i> E <i>L. innocua</i>	134

FIGURA 21 - PERFIS GENÉTICOS DOS ISOLADOS DE <i>Listeria monocytogenes</i> A PARTIR DE QUATRO DIFERENTES INICIADORES.....	138
FIGURA 22 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS ISOLADOS DE <i>Listeria monocytogenes</i>	139
FIGURA 23 - AMPLIFICAÇÃO DOS GENES <i>hlyA</i> , <i>Dth18</i> E <i>iap</i> DE DNA EXTRAÍDO DA CEPA PADRAO.....	155
FIGURA 24 - PCR APÓS ETAPA DE ENRIQUECIMENTO COM AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>Dth18</i>	157
FIGURA 25 - PCR APÓS ETAPA DE ENRIQUECIMENTO E DOIS PERÍODOS DE INCUBAÇÃO.....	158
FIGURA 26 - AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>Dth18</i> DE AMOSTRAS NATURALMENTE CONTAMINADAS.....	160
FIGURA 27 - AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>hlyA</i> DE AMOSTRAS NATURALMENTE CONTAMINADAS.....	160
FIGURA 28 - AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>iap</i> DE AMOSTRAS NATURALMENTE CONTAMINADAS.....	161

LISTA DE TABELAS

	p
TABELA 1 - ETAPAS DE SUBCULTURA, CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO E MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA ANÁLISE DE <i>Listeria</i> spp EM ALIMENTOS PELOS MÉTODOS RECOMENDADOS POR DIFERENTES ÓRGÃOS REGULADORES.....	61
TABELA 2 - TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS E GENÉTICAS UTILIZADAS NA DETECÇÃO DE <i>Listeria</i> spp.....	64
TABELA 3 - REGIONAL DE SAÚDE – COLETAS	80
TABELA 4 - DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS ANALISADAS.....	81
TABELA 5- CARACTERÍSTICAS TÍPICAS DE <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> e <i>Micrococci</i>	108
TABELA 6 - SEQUÊNCIA DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NA DETECÇÃO DE <i>L. monocytogenes</i>	126
TABELA 7- DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS SEGUNDO REGIONAL DE SAÚDE, LOCAL DE COLETA E NÚMERO DE AMOSTRAS.....	128
TABELA 8 - RESULTADOS DAS PROVAS BIOQUÍMICAS UTILIZADAS NA IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DO GÊNERO <i>Listeria</i> OBTIDAS A PARTIR DE AMOSTRAS POSITIVAS PELO MÉTODO CONVENCIONAL E VIP.....	131
TABELA 9 - OCORRÊNCIA DE <i>Listeria</i> spp. E SOROVARIETADES, APÓS CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E SOROLÓGICA, EM DIFERENTES TIPOS DE QUEIJOS COMERCIALIZADOS NO ESTADO DO PARANÁ UTILIZANDO DIFERENTES MÉTODOS DE PESQUISA	132
TABELA 10 - CARACTERÍSTICAS DIFERENCIAIS DAS ESPÉCIES ACEITAS COMO SENDO DO GÊNERO <i>Listeria</i>	133
TABELA 11 - VALORES FALSO-POSITIVOS E FALSO-NEGATIVOS CONSIDERANDO OS RESULTADOS OBTIDOS PELOS DIFERENTES MÉTODOS	135
TABELA 12 - RESULTADO DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE QUEIJOS MUSSARELAS PRODUZIDOS E OBTIDOS EM PONTOS DE COMERCIALIZAÇÃO NO ESTADO DO PARANÁ NOS ANOS 2001/2002	142
TABELA 13 - RESULTADO DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE QUEIJOS PRATO E REQUEIJÃO PRODUZIDOS E OBTIDOS EM PONTOS DE COMERCIALIZAÇÃO NO ESTADO DO PARANÁ NOS ANOS 2001/2002.....	142
TABELA 14 - RESULTADO DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE QUEIJOS FRESCOS DE MASSA CRUA (MINAS FRESCAL E RICOTAS) PRODUZIDOS E OBTIDOS EM PONTOS DE COMERCIALIZAÇÃO NO ESTADO DO PARANÁ NOS ANOS 2001/2002.....	144
TABELA 15 - RESULTADO DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DOS QUEIJOS ARTESANAIS PRODUZIDOS E OBTIDOS EM PONTOS DE COMERCIALIZAÇÃO	145

	NO ESTADO DO PARANÁ NOS ANOS 2001/2002	
TABELA 16 -	NÚMERO DE AMOSTRAS ANALISADAS QUE ATENDEM E NÃO ATENDEM À LEGISLAÇÃO VIGENTE X TEOR DE UMIDADE.....	146
TABELA 17 -	CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE QUEIJOS COM BAIXA UMIDADE E QUE NÃO ATENDEM A RDC - 12 DE 02 DE JANEIRO DE 2001.....	147
TABELA 18 -	CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE QUEIJOS COM MÉDIA UMIDADE E QUE NÃO ATENDEM A RDC - 12 DE 02 DE JANEIRO DE 2001.....	148
TABELA 19 -	CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE QUEIJOS COM ALTA UMIDADE E QUE NÃO ATENDEM A RDC - 12 DE 02 DE JANEIRO DE 2001.....	149
TABELA 20 -	CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE QUEIJOS COM MUITO ALTA UMIDADE E QUE NÃO ATENDEM A RDC 12 DE 02 DE JANEIRO DE 2001.....	150
TABELA 21-	AMOSTRAS ANALISADAS NÃO CONDENADAS PELOS PARÂMETROS ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA, COLIFORMES A 45°C E <i>Salmonella</i> spp, MAS QUE APRESENTAVAM A PRESENÇA DE <i>LISTERIA</i> spp.....	151
TABELA 22 -	CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE QUEIJOS ENVOLVIDOS EM EVENTOS DE SURTO DE DTA NO ESTADO DO PARANÁ, NOS ANOS 2001 E 2002.....	153

LISTA DE QUADROS

	<i>p</i>
QUADRO 1- CLASSIFICAÇÃO DOS QUEIJOS EM RELAÇÃO AOS PROCESSOS DE FABRICAÇÃO.....	141
QUADRO 2- LIMITES MICROBIOLÓGICOS DE ACORDO COM A RDC 12 DE 02/01/2001 PARA QUEIJOS CONFORME TEOR DE UMIDADE.....	146

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APT	ÁGUA PEPTONADA TAMPONADA
ANVISA	AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA
AOAC	ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS
ATCC	AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION
A_w	ATIVIDADE DE ÁGUA
BAM	BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL
BGN	BACILO GRAM NEGATIVO
BGP	BACILO GRAM POSITIVO
BHI	BRAIN HEART INFUSION
BHI ágar	BRAIN HEART INFUSION AGAR
BLED	CALDO DE ENRIQUECIMENTO DE <i>LISTERIA</i> TAMPONADO
BP	ÁGAR BAIRD - PARKER
C	CITOSINA
Caldo VM / VP	CALDO VERMELHO DE METILA/ VOGES-PROSKAUER
CAMP	CHRISTIE, ATKINS E MUNCH-PETERSEN
CENEPI	CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA
CDC	CENTER DISEASE CONTROL AND PREVENTION
DI	DOSE INFECTANTE
DNA	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO
DTA	DOENÇAS TRANSMITIDAS PELOS ALIMENTOS
DVA	DOENÇA VEICULADA POR ALIMENTOS
E	ESPECIFICIDADE
EAM	AGAR EOSINA AZUL DE METILENO
EC	CALDO <i>Escherichia coli</i>
EPM	ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA AGAR
FAO	FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION
FDA	FOOD AND DRUG ADMINISTRATION
FLORIDA	FLORIDA DEPARTMENT OF AGRICULTURE AND CONSUMER SERVICES
FN	FALSO-NEGATIVO
FP	FALSO-POSITIVO
FSIS	FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE
FUNED	FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS
G	GUANINA
H	ANTÍGENOS FLAGELARES
h	HORAS
He	ÁGAR ENTÉRICO DE HEKTOEN
HIV	VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA
IAL	INSTITUTO ADOLFO LUTZ
IC F	INDICADOR DE CONTAMINAÇÃO FECAL
ICMSF	INTERNATIONAL COMMISSION MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS for FOODS
INCQS	INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
INPPAZ	INSTITUTO PANAMERICANO DE PROTEÇÃO DOS ALIMENTOS E ZOOSE

ISEP	INSTITUTO DE SAÚDE DO PARANÁ
LACEN-PR	LABORATÓRIO CENTRAL DO ESTADO DO PARANÁ
Lag	FASE DE ADAPTAÇÃO
LB	LURIA BROTH
LCR	LIGASE CHAIN REACTION
LEB	LISTERIA ENRICHMENT BROTH
LIA	AGAR LISINA IRON
log	LOGARITMO
LPM	ÁGAR CLORETO DE LÍTIO FENILETANOL MOXALACTAM
LPM modificado	AGAR CLORETO DE LÍTIO FENILETANOL MOXALACTAM SELETIVO PARA LISTÉRIA, FORMULADO SEGUNDO LOVETT E HITCHINS (1988) E SUPLEMENTADO COM ESCULINA 1 g/l, CITRATO FÉRRICO AMONIACAL 0,5 G/L
LST	CALDO LAURIL SULFATO TRIPTOSE
MILI	MEIO DE MOTILIDADE INDOL LISINA
MIO	MEIO DE MOTILIDADE, INDOL E ORNITINA
mg	MASSA DE MATÉRIA GRAXA EM GRAMAS
mL	MILILITRO
µL	MICROLITRO
MM	CALDO DE CARNE
mm	MILÍMETRO
MOX	ÁGAR OXFORD MODIFICADO
MS	MINISTÉRIO DA SAÚDE
mu	MASSA ÚMIDA GRAXA EM GRAMAS
mt	MASSA TOTAL EM GRAMAS
MYP	ÁGAR MANITOL GEMA DE OVO POLIMIXINA
N	NEGATIVO
NaCl	CLORETO DE SÓDIO
NC	NÃO CONSTA
nm	NANÔMETRO
O	ANTÍGENOS SOMÁTICOS
°C	GRAUS CENTÍGRADOS OU CELSIUS (TEMPERATURA)
OMS	ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE
OPAS	ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE
OXA	ÁGAR OXFORD
P	PRESENÇA
PAL	ÁGAR PALCAM
PCR	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
pH	POTENCIAL HIDROGENIÔNICO
pKa	CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO
RAPD	RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA
RFLP	RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM
RMC	REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA
RNA	ÁCIDO RIBONUCLÉICO
RNA _m	RNA MENSAGEIRO
RS	REGIONAIS DE SAÚDE
RT-PCR	TRANSCRIÇÃO REVERSA POR PCR

RV	CALDO RAPPAPORT-VASSILIADIS MODIFICADO
S	SENSIBILIDADE
SC	CALDO SELENITO-CISTINA
SEBRAE	SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS,
SESA	SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO ESTADO
SIF	SERVIÇO DE INSPEÇÃO FEDERAL (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA)
SIM	SERVIÇO DE INSPEÇÃO MUNICIPAL (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE - VIGILÂNCIA SANITÁRIA)
SIM modificado	ÁGAR SULFITO INDOL MOTILIDADE + 0,05% DE CLORETO DE TRIFENILTETRAZOLIUM
SIP	SERVIÇO DE INSPEÇÃO DO PARANÁ (SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA)
SMS	SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE
spp.	ESPÉCIES
SR	SEM REGISTRO
SS	ÁGAR SALMONELLA - SHIGUELLA
T	TRIAGEM.
TSA	AGAR TRIPTICASE DE SOJA
TSA – YE	AGAR TRIPTICASE DE SOJA SUPLEMENTADO COM 0,6 % DE EXTRATO DE LEVEDURA
TSC	AGAR TRIPTOSE SULFITO CICLOSERINA
TSI	ÁGAR TRÍPLICE AÇÚCAR FERRO
TTC	CLORETO DE TRIFENILTETRAZOLIUM
UFC	UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIAS
UFC/g	UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIAS/G
UFPR	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
USDA	UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE
USDA - FSIS	UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE
UVM	CALDO UNIVERSIDADE DE VERMONT
VB	CALDO LACTOSADO VERDE BRILHANTE BILE 2%
VIP	ENSAIO VISUAL DE IMUNOPRECIPITAÇÃO
VISA	VIGILÂNCIA SANITÁRIA
VN	VERDADEIRAMENTE NEGATIVO
VP	VERDADEIRAMENTE POSITIVO

RESUMO

Neste estudo foi realizada uma avaliação do padrão higênico-sanitário de 90 amostras de queijos comercializados no Estado do Paraná e 10 amostras de queijos envolvidos em surtos de Doença Transmitida por Alimentos (DTA). Avaliou-se a ocorrência de queijos contaminados com *Listeria monocytogenes* comparando os resultados obtidos das análises feitas com o ensaio visual de imunoprecipitação (VIP) com a metodologia convencional. Desenvolveu-se uma metodologia pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para a identificação de *Listeria monocytogenes* viável em queijos naturalmente contaminados. A ocorrência de *Listeria* spp em queijos comercializados no Estado do Paraná foi de 12%, sendo 6% *Listeria monocytogenes* e 6% *Listeria innocua*. A análise da distribuição de sorovar mostrou que 100% dos isolados de *Listeria innocua* pertencem ao sorotipo 6a enquanto que para *Listeria monocytogenes* o sorovar prevalente foi 1/2a. Os queijos classificados como muito alta umidade foram os que apresentaram maior contaminação com *Listeria* spp (29,2 %), seguido dos de média umidade (12,2 %), alta umidade (5 %). Na comparação da sensibilidade e especificidade dos métodos de detecção de *Listeria* spp observou-se que ambos os métodos apresentaram 100% de especificidade e que o método VIP mostrou maior sensibilidade (63,16%), sendo, portanto, o método mais viável para a triagem de amostras contaminadas. Os queijos artesanais (coloniais) foram os que apresentaram o maior grau de contaminação microbiana, e também os de maior risco para a população por apresentarem amostras contaminadas com *Listeria monocytogenes*, estafilococos coagulase positiva (*S. aureus*) acima da dose infectante. Das amostras provenientes de pontos de comercialização em média 33,33% não atenderam ao padrão microbiológico estabelecido pela legislação vigente, independente do teor de umidade ou do tipo de queijo. Os queijos com muito alta umidade apresentaram maior número de amostras com grau de contaminação microbiológica acima dos limites tolerados. Nas amostras provenientes de surtos de DTA 90 % apresentaram contaminação por *Staphylococcus aureus* acima de 10^5 UFC/g, sendo este o provável agente etiológico causador do evento. Em nenhuma destas amostras foi isolada *Listeria* spp. independente do método utilizado. O método de extração de DNA envolvendo a etapa de precipitação com etanol desenvolvido neste trabalho eliminou os inibidores da PCR presentes em amostras de queijo, permitindo a amplificação de três marcadores para a detecção de *Listeria monocytogenes* em amostras de queijos contaminadas naturalmente. Dos métodos utilizados concluí-se que na otimização da rotina de um laboratório de controle de qualidade cuja pesquisa de *Listeria monocytogenes* seja intensa uma triagem com o método VIP seguido de PCR nas amostras positivas para o gênero *Listeria*, é uma alternativa viável quando se deseja rapidez na obtenção dos resultados e se dispõe da estrutura analítica. A análise efetuada neste estudo evidencia a ocorrência de falhas no processo de fabricação do queijo por parte de alguns produtores no Estado do Paraná representando grande risco à saúde do consumidor.

Palavras chave: *Listeria monocytogenes*, queijo, PCR

ABSTRACT

This study outlined the profile of microbial contamination of 90 cheeses commercialized in Paraná State and 10 samples of cheeses involved in outbreaks of food-transmitted diseases (FTD). The occurrence of cheeses contaminated with *Listeria monocytogenes* was identified by comparing the results obtained by visual immunoprecipitation (VIP) assay with conventional methods. A methodology was developed using polymerase chain reaction (PCR) to identify viable *L. monocytogenes* in naturally contaminated cheeses. The occurrence of *Listeria* spp in cheeses commercialized in the Paraná State was 12%, 6% revealing *L. monocytogenes* and 6% *L. innocua*. Analysis of serovar distribution showed that 100% of the *L. innocua* isolates belonged to serotype 6a, while the prevalent *L. monocytogenes* serovar was 1/2a. Cheeses classified as containing very high humidity presented the greatest *Listeria* spp contamination (29.2%), followed by medium humidity (12.2%) and high humidity (5.0%). Comparison of the sensitivity and specificity of the *Listeria* spp detection methods revealed that both methods presented 100% specificity and that the VIP assay presented greater sensitivity, thus proving that this is the most viable method for contaminated sample triage concerning product liberation for commercialization, given the speed with the results were obtained. Artisanal (colonial) cheeses presented the highest degree of microbial contamination and the greatest risk to consumers, since these presented samples contaminated with *L. monocytogenes* that were staphylococcus coagulase-positive (*S. aureus*) above the de 10^5 UFC/g. Of the samples taken from sales venues, an average of 33.3% did not conform to the microbiological standard established in current legislation, independent of humidity content or cheese type. Cheeses presenting very high humidity also presented a greater number of samples showing a degree of microbiological contamination above the tolerated limits. In samples taken from FTD outbreaks, 90% presented contamination by *Staphylococcus aureus* above the infective dose, such that this was the most probable etiological agent causing the event. No *Listeria* spp was isolated in these samples, independent of the method used. The DNA extraction method involving an ethanol precipitation stage developed in this work eliminated the PCR inhibitors present in the cheese samples, permitting amplification of the three markers used for *L. monocytogenes* detection in naturally contaminated cheese samples. Of the methods used, we conclude that to optimize the routine of a quality control laboratory with a high volume of *Listeria monocytogenes* investigation, triage with the visual immunoprecipitation assay followed by PCR of the *Listeria*-positive samples is a viable alternative when quick results are required and the laboratory is equipped with the analytical infrastructure. The analysis performed in this study revealed the occurrence of failures in the cheese fabrication process of certain producers in Paraná State, representing a high risk to consumer health.

Key words: *Listeria monocytogenes*, cheese, PCR

1 INTRODUÇÃO

A alimentação dentro de padrões higiênicos satisfatórios é uma das condições essenciais para a promoção e a manutenção da saúde (BEAN; GRIFFIN, 1990). Vários agentes causadores de doenças no homem, como produtos químicos, toxinas naturais de plantas e de animais, vírus, parasitas, bactérias e fungos patogênicos podem ser transmitidos pelos alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

No final do século XX ocorreu a globalização da economia, acarretando o aumento do fenômeno migratório de pessoas e transporte de produtos rompendo barreiras nacionais e internacionais (BAIRD-PARKER, 1994; KNABEL, 1995; KNOCHEL; GOULD, 1995). O aumento da incidência das DTA é determinado pela maior exposição das populações aos alimentos destinados ao pronto consumo coletivo “fast foods”, ao consumo de alimentos em vias públicas, a utilização de novas modalidades de produção, ao aumento no uso de aditivos e a mudança de hábitos alimentares. Além desses fatores, devem-se considerar ainda as mudanças ambientais, a globalização e as facilidades atuais de deslocamento da população (BRASIL, 2003).

As DTA ocorrem principalmente na forma de gastroenterites agudas (GRAY; MOSSEL, 1992; NOTERMANS; HOOGENBOOM-VERDEGAAL, 1992; KNABEL, 1995). Entre todos os agentes etiológicos, quatro agentes são considerados prioritários pelo Center Disease Control and Prevention (CDC): *Salmonella* sp., *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* e *E. coli* O157:H7 (VARNAM, 1991).

Os dados levantados de sintomas prevalentes entre os afetados, o período de tempo entre consumo e aparecimento dos sintomas, indicam o provável agente veiculado pelo alimento, sendo estas informações de suma importância para orientar o laboratório na pesquisa dos agentes mais prováveis. O diagnóstico laboratorial das DTA tem por objetivo o esclarecimento de ocorrências de natureza epidemiológica relacionada ao consumo de alimentos e é realizado nas sobras dos alimentos que efetivamente foram ingeridos pelos afetados. O evento epidemiológico pode ser caracterizado e associado ao consumo de uma mesma refeição, o que caracteriza surtos fechados e nos quais os comensais têm relação entre si (locais como residências,

indústrias, escolas, associações, clubes, festas, creches, asilos, etc.) ou envolver consumidores que não compartilham da mesma refeição, mas que têm em comum a ingestão de produto (alimento) de distribuição ampla e que pode afetar pessoas sem relação entre si, de municípios, estados e até países diferentes (SENEFF, 2007)

O Conselho para Ciência Agrícola e Tecnologia estimou em seu relatório datado de 1994, "Patógenos transmitidos pelos Alimentos: Riscos e Conseqüências" que 9.000 óbitos e uma incidência de 6,5 a 33 milhões de casos de doenças ocorrem nos Estados Unidos, a cada ano, relacionados aos alimentos (MEAD *et al.*, 1999).

O Estado do Paraná é um dos únicos estados brasileiros que vêm estudando as DTAs desde 1978. Essa informação permite orientar adequadamente os estabelecimentos alimentares, principalmente os que servem refeições coletivas, no sentido de manipular corretamente os alimentos para evitar a ocorrência de surtos de DTAs (CAMARGO, 1999). Dados da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (2004) mostram que foram notificados 2000 surtos de toxinfecção alimentar (NEGRETE, 2004)

O segmento da população considerada de maior risco para as doenças de origem alimentar é constituído por idosos, crianças, mulheres grávidas e indivíduos debilitados por outras doenças como cirrose, hepatite e câncer (OBLINGER, 1988). A susceptibilidade individual depende de vários fatores como imunodeficiência, estado nutricional e fisiológico, infecções concorrentes ou recentes e da condição do trato gastrointestinal (BAIRD-PARKER, 1994).

O desenvolvimento tecnológico e científico observado nas últimas décadas elevou a expectativa de vida da população, aumentou o número de idosos, melhorou as condições de diagnóstico e tratamento precoce de neoplasias e de doenças auto-imunes, aumentou a freqüência de transplante de órgãos e o uso de imunossupressores. Todos esses incrementos resultaram no aumento populacional do grupo de risco (BRASIL, 2003).

Listeria monocytogenes é um exemplo de patógeno que causa infecção em indivíduos imunodebilitados. Mesmo havendo probabilidade de risco para todos os consumidores, este patógeno é potencialmente mais perigoso para neonatos, prematuros, idosos, gestantes e pacientes imunodeprimidos (LOGUERCIO *et al.*, 2001). A listeriose geralmente causa sintomas típicos de gripe, mas em recém-natos e idosos,

pode desenvolver meningite, septicemia e morte (KLIMA; MONTVILLE, 1995). Este fato, juntamente com o isolamento do microrganismo em alimentos processados prontos para o consumo fez com que a atenção de indústrias alimentícias seja redobrada pelas Autoridades de Saúde Públicas e de pesquisadores em vários países (LOGUERCIO *et al.*, 2001). *Listeria monocytogenes* é um padrão de pesquisa para a investigação imunológica e se converteu em um modelo para a análise dos mecanismos moleculares de parasitismo intracelular bacteriano (TORRES *et al.*, 2005)

Considerando a sua ampla distribuição no ambiente de forma ubíqua e a sua presença no trato intestinal de vários animais, a *Listeria monocytogenes* pode contaminar o leite e derivados, carnes, aves e vegetais, sendo que os surtos descritos na literatura estão associados ao leite, ao queijo tipo mexicano e ao repolho (GILBERT, 1994; LECHOWICH, 1988; SCHUCHAT *et al.*, 1991).

Provavelmente, os hábitos alimentares contemporâneos têm contribuído para aumentar a listeriose, uma vez que ocorre multiplicação durante o armazenamento e distribuição sob refrigeração (DOYLE, 1988). *L. monocytogenes* apresenta multiplicação na faixa de 2,5° a 44° C, embora existam relatos sobre seu crescimento também a 0° C. Este microrganismo suporta repetidos ciclos de congelamentos e descongelamentos (FRANCO; LANDGRAF, 2005). Devido à ampla possibilidade de crescimento em baixa temperatura, agrava-se o risco de listeriose. Isto ocorre na proporção direta da produção crescente de alimentos frescos e processados prontos para o consumo e que usualmente são conservados à temperatura de refrigeração entre 4 a 8°C. Devido à severidade da infecção, diversos países têm adotado uma política rigorosa de controle de *L. monocytogenes*. No entanto, seu controle é dificultado pelas próprias características da bactéria, como a possibilidade de crescimento sob refrigeração, tolerância a diversos agentes conservantes e distribuição ubíqua (LOGUERCIO *et al.*, 2001).

Os métodos convencionais para a detecção de *L. monocytogenes* em alimentos se baseiam na utilização de meios de cultivos específicos para o isolamento e contagem dos microrganismos viáveis, seguidos por testes confirmativos bioquímicos e sorológicos. Essa metodologia é extremamente trabalhosa, além de requerer condições

rígidas de biossegurança em virtude da virulência deste agente, bem como, o tempo para sua realização, que dura em média de 5 a 10 dias (KLEIN; JUNEJA, 1997).

Há a necessidade do desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis, de baixo custo, fácil utilização e interpretação para detecção específica de patógenos os quais ainda não estão disponíveis para muitos microrganismos, inclusive para *L. monocytogenes*, fundamentais para o controle desse microrganismo (ALMEIDA *et al.*, 1999).

O desenvolvimento de novas metodologias para a identificação de *L. monocytogenes* e outros patógenos emergentes ou re-emergentes, causadores de doenças de origem alimentar fornece subsídios para o desenvolvimento de medidas políticas, legislativas, priorização de áreas de pesquisa e avaliação de programas de controle de surtos epidêmicos (NOTERMANS; GIESSEN, 1993).

Nas últimas décadas, pesquisas demonstram a necessidade do desenvolvimento de métodos moleculares rápidos e mais específicos para diagnóstico e estudo epidemiológico de *L. monocytogenes* (ALMEIDA *et al.*, 1999). O que justifica o conhecimento da incidência deste microrganismo em diferentes alimentos e o desenvolvimento de métodos rápidos para a sua detecção. A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) também é um método utilizado na detecção e identificação de *L. monocytogenes* em diferentes tipos de produtos alimentícios.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver e comparar métodos de detecção e avaliar a incidência de *Listeria monocytogenes* em queijos comercializados no Estado do Paraná

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Traçar o perfil de contaminação microbiana de queijos comercializados no Estado do Paraná;
- Identificar a ocorrência de queijos contaminados com *Listeria monocytogenes*;
- Verificar a ocorrência de *Listeria monocytogenes* em amostras envolvidas em surtos de DTA e o possível agente etiológico causador do evento.
- Comparar os resultados obtidos nas análises feitas pelo método rápido VIP (Ensaio Visual de Imunoprecipitação) com a metodologia convencional de cultura “in vitro” de *Listeria monocytogenes* em amostras de queijo;
- Desenvolver uma metodologia por PCR para a identificação de *Listeria monocytogenes* viável, em queijos naturalmente contaminados;
- Desenvolver uma metodologia de extração de DNA que elimine os inibidores da PCR presentes nas amostras de queijos;
- Padronizar condições de PCR para a identificação de *Listeria monocytogenes* em amostras de queijos naturalmente contaminadas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 QUEIJO

3.1.1 Breve História da Origem do Queijo

Há relatos de consumo de leite solidificado datando de 7.000 anos a.C. e achados arqueológicos revelam a existência de queijos feitos a partir de leite de vaca e de cabra 6.000 anos antes da era cristã (PERRY, 2004). O homem observou que o extrato procedente do estômago dos ruminantes jovens era o responsável pela coagulação do leite (PEREDA *et al.*, 2005).

Queijos foram encontrados nas tumbas egípcias particularmente na de Tutankamon 1500 a.C. Durante o Império Romano a produção de queijos aperfeiçoou-se, alcançando um alto padrão. A técnica de maturação já havia sido desenvolvida e as casas possuíam espaço próprio para a fabricação dos queijos (PERRY, 2004).

A emigração dos povos difundiu o modo de fabricar queijo, como também, na Idade Média, os deslocamentos realizados nas Cruzadas e as peregrinações a outros lugares sagrados (PEREDA *et al.*, 2005).

Os monges trapistas transformaram a fabricação de queijos em uma verdadeira arte, sendo os responsáveis pelo aperfeiçoamento da tecnologia e o desenvolvimento de novas variedades. Durante a Renascença, o queijo perdeu parte de sua popularidade por ser considerado pouco saudável. No século XIX iniciou-se a produção em massa de queijos. No início do século XX foi aberta a primeira grande queijaria na França (PERRY, 2004).

3.1.2 Definição

Segundo a legislação brasileira, queijo é o produto fresco ou maturado obtido 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 ácido orgânico, 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. A denominação “queijo” está reservada aos produtos em que a base Láctea não contenha gordura e/ou proteínas de origem não Láctea (BRASIL, 1996).

3.1.3 Classificação

3.1.3.1. Classificação dos queijos de acordo com seu conteúdo de umidade e os microrganismos que participam na maturação, segundo Walter e Hargrove (1972)

A) Queijos muito duros (umidade inferior a 25%)

- Maturados por bactérias : Parmesão (I), Romano (I)

B) Queijos duros (umidade de 25 a 36%)

- Com buracos - Maturados por bactérias: Emmenthal (S), Gruyère (F)
- Sem buracos - Maturados por bactérias : Cantal (F), Cheddar (GB), Manchego (E), Catellano (E), Mohón (E), Edam (H), Gouda (H), Caciallo (I)

C) Semimoles (umidade de 36 a 40%)

- Maturação por bactérias: Gallegos (E), tipo manchego (E), St. Paulin (F), Lancashire (GB)
- Maturação por bactérias e microrganismos (bactérias e leveduras) superficiais: Limburger (B), Tilsit (A), Bel Pasese (I), Munster (F)
- Maturação por fungos internos (azuis): Roquefort (F), Cabrales (E), Gorgonzola (I), Stilton (GB), Ganablu (D)

D) Moles (umidade superior a 40%)

- Maturados por fungos adicionados: Camembert (F), Brie (F)
- Não maturados: Mozzarella (I), Cottage (GB), Burgos (E), Villalón (E), Petit Suisse (F)

(I) Itália, (S) Suíça, (F) França, (GB) Grã-Bretanha, (E) Espanha, (H) Holanda, (B) Bélgica, (A) Alemanha, (D) Dinamarca.

3.1.3.2 Classificação pelo teor de umidade

A) Queijos de baixa umidade: Geralmente conhecidos como queijos de massa dura, apresentam conteúdo de umidade de até 35,9% (PORTARIA 146, 07/03/1996)

Exemplos: Queijo em Pó, Queijo Gruyère, Queijo Montanhês, Queijo Parmesão ou Parmesano, Queijo Provolone, Queijo Ralado, Queijo Reggiano ou Reggianito, Queijo Sbrinz;

B) Queijos de média umidade: Geralmente conhecidos como queijos de massa semi-dura, apresentam conteúdo de umidade entre 36 e 45,9% (PORTARIA 146, 07/03/1996)

Exemplos: Queijo Cream, Queijo Danbo, Queijo de Coalho, Queijo Edam, Queijo Emmental, Queijo Esrom, Queijo Frisian Clove, Queijo Gouda, Queijo Gorgonzola, Queijo Havart, Queijo Leyden, Queijo Maasdam, Queijo Mimollete, Queijo Minas Padrão, Queijo Mussarela, Queijo Prato, Queijo Provolone, Queijo Ralado, Queijo Roquefort, Queijo Suíço;

C) Queijos de alta umidade: Geralmente conhecidos como queijos de massa branda ou “macios”, apresentam conteúdo de umidade entre 46 e 54,9% (PORTARIA 146, 07/03/1996)

Exemplos: Queijo Camembert, Queijo de Coalho.

D) Queijos de muito alta umidade: Geralmente conhecidos como queijos de massa branda ou “moles”, apresentam conteúdo de umidade não inferior a 55% (PORTARIA 146, 07/03/1996)

Exemplos: Queijo Cottage, Queijo Minas Frescal, Queijo Petit Suisse, Queijo Processado ou fundido, Queijo Quark, Queijo Ricota Fresca, Requeijão.

3.1.3.3 Classificação de acordo com o conteúdo de matéria gorda no extrato seco durante o processo de fabricação do queijo (Figura 1).

A) Desnatado (< 10%)

Exemplo: Queijo Cottage.

B) Semi-gordo (25 - 44,9%)

Exemplos: Queijo de Coalho, Queijo Minas Frescal, Queijo Mussarela, Queijo Parmesão.

C) Gordo (45 – 59,9%)

Exemplos: Queijo Dambo, Queijo de coalho, Queijo Prato.

D) Extra-gordo ou duplo creme (> 60%)

Exemplos: Queijo Boursin, Queijo Petit Brie.



FIGURA 1 –FABRICAÇÃO DE QUEIJO EM PLANTA INDUSTRIAL

Fonte: www.inoxnew.com.br/IMAGENS/fabrica-de-queijo.jpg

3.1.4 Processo de fabricação

A Figura 2 apresenta um esquema do processo geral da elaboração de queijo.

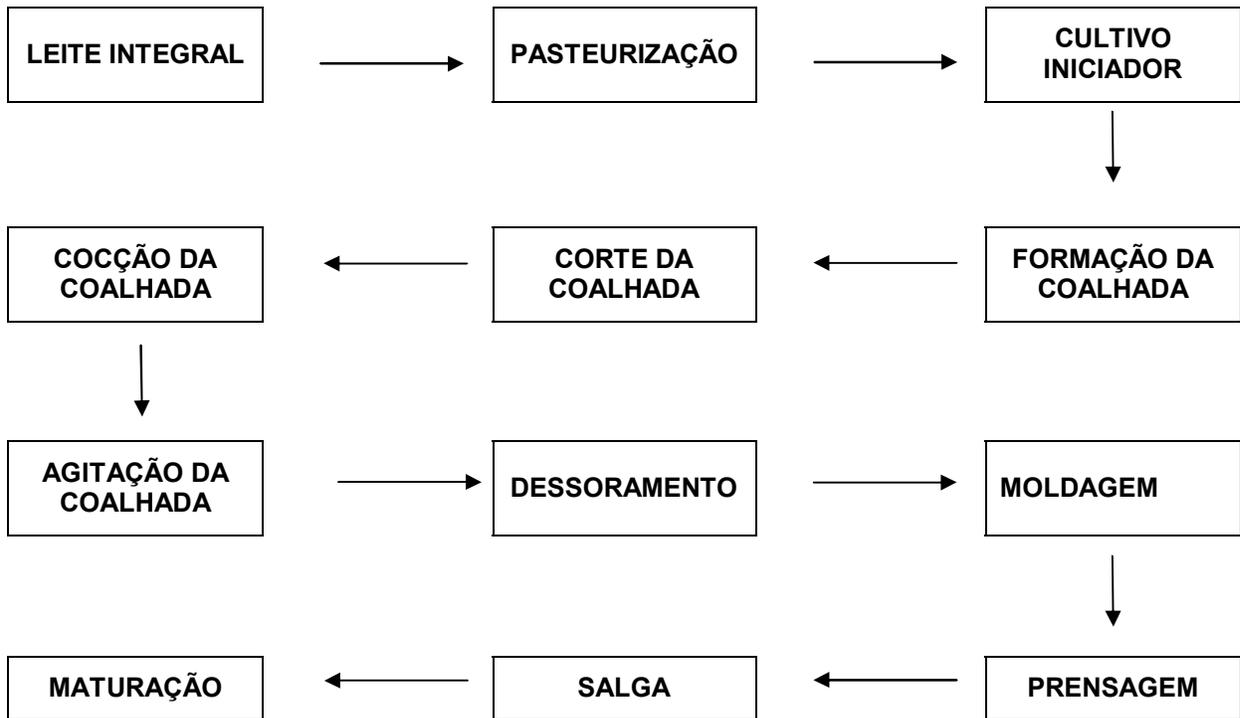


FIGURA 2 - PROCESSO GERAL DA ELABORAÇÃO DE QUEIJO

FONTE: PEREDA *et al.*, 2005

Onde:

Adição do cultivo iniciador: É uma das etapas-chave da elaboração do queijo. Nesse momento criam as condições para produzir queijos moles ou duros.

Formação da coalhada: Consiste na adição de coalho para obter a coagulação das caseínas.

Corte da coalhada: É a divisão do coágulo em partes iguais a fim de facilitar a expulsão do soro.

Cocção da coalhada: Tratamento térmico aplicada às porções de coalhada obtidas durante seu corte.

Agitação da coalhada: Movimento contínuo do lactossoro.

Dessoramento: As partículas de coalhada começam a expulsar o soro já no momento do corte.

Moldagem: Introduce-se na coalhada em moldes adequados para dar-lhe a forma típica de cada variedade.

Salga: Sua finalidade é potencializar o sabor e inibir o crescimento de bactérias indesejáveis.

Maturação: Processo pelo qual se modificam as características físicas e químicas do queijo, responsáveis pelo seu sabor e aroma.

3.2 CLASSIFICAÇÃO TAXONOMICA DE *Listeria* spp

Em 1926, no Departamento de Patologia da Universidade de Cambridge, Murray e colaboradores realizaram o primeiro isolamento de *Listeria monocytogenes* em sangue de coelhos e correlacionaram como a causa de doenças entre cobaias de laboratório e coelhos. Os autores propuseram o nome de *Bacterium monocytogenes* para o “novo” organismo devido à elevação característica nos valores sangüíneos dos leucócitos mononucleares. Três anos depois, foi isolado de fígado infectado de camundongo africano por Pirie, que o nomeou de *Listerella hepatolytica* pelo comprometimento hepático durante a infecção. Desse modo, a similaridade dos organismos descritos pelos diferentes pesquisadores levou, em consenso, ao nome de *Listerella monocytogenes*. O nome do gênero foi escolhido em honra ao cirurgião Lorde Lister e a partir de 1940 o gênero foi modificado para *Listeria*, porque *Listerella* já era a denominação de um grupo de bolores denominação que foi aceita e adotada na 6ª edição do *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Em 1954, foi aprovado pela Comissão Judicial de Nomenclatura e Taxonomia Bacteriológica (MURRAY *et al.*, 1926; PIRIE, 1940; LOVETT, 1989; RYSER; MARTH, 1991; DONNELLY *et al.*, 1992; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005; KLIMA; MONTVILLE, 1995). É interessante ressaltar que, tanto MURRAY quanto PIRIE, atribuíram as infecções dos animais ao consumo de alimentos contaminados (LOGUERCIO *et al.*, 2001). Por outro lado, a literatura relata que, entre 1891 e 1911 já fora descrito um organismo muito semelhante à *Listeria monocytogenes* (BAHK; MARTH, 1990). A relação entre *Listeria* e outras bactérias permaneceu obscura até a década de 1970. A bactéria não era citada nas três primeiras edições do *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, publicadas em 1923, 1925 e 1930. Na edição de 1934 *Listeria* foi incluída na tribo Kurthia, da família Corynebacteriaceae (ROCOURT, 1999). A partir da oitava edição do Manual, *Listeria* foi considerada como um gênero com afiliação incerta e classificada juntamente com *Erisipelothrix* e *Cayophanon*, e em seguida na família Lactobacillaceae (LOVETT, 1989; ROCOURT, 1999). Por fim, em 1986, no *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*,

Listeria foi classificada na seção de bacilos Gram-positivos, regulares e não esporulados, juntamente com *Lactobacillus*, *Erysipelothrix*, *Brochothrix*, *Renibacterium*, *Kurthia* e *Cayophanon* (HOLT *et al.*, 1994; ROCOURT, 1999; SEELINGER; JONES, 1986).

Vários marcadores quimiotaxonômicos têm sido utilizados na verificação da posição filogenética do gênero *Listeria*, que pertence ao grupo de bactérias Gram positivas de baixo conteúdo de G+C no DNA (<55%), reforçando a sua distinção do gênero *Corynebacterium* e a sua relação com bactérias lácticas (ROCOURT, 1999).

Por vários anos, o gênero *Listeria* spp. apresentou apenas a espécie *L. monocytogenes*. Posteriormente, foram incluídas outras espécies *L. denitrificans*, em 1948, *L. grayi*, em 1966, *L. murrayi*, em 1971, *L. innocua*, em 1981, *L. welshimeri* e *L. seeligeri*, em 1983, e *L. ivanovii*, em 1985 (ROCOURT, 1999). Apesar das espécies de *Listeria* serem fenotipicamente similares, elas podem ser diferenciadas pela produção de hemolisina, incluindo teste CAMP (Christie, Atkins e Munch-Petersen) e análise de patogenicidade em ratos (HOLT *et al.*; 1994; McKELLAR, 1994; ROCOURT, 1988; SEELINGER; JONES, 1986; SCHUCHAT *et al.*, 1991) e pela produção de ácido a partir de D-xilose, L-ramnose e manitol. A atividade hemolítica é a característica mais importante e de difícil identificação de *L. monocytogenes* (HOLT *et al.*; 1994; RYSER; DONNELLY, 2001). Com base em estudos mais recentes empregando a hibridização de DNA-DNA, análise de restrição de enzima multilocos e seqüenciamento de 16S rRNA, o gênero *Listeria* compreende atualmente 6 espécies divididas em 2 linhas de descendência:

I - *L. monocytogenes* e espécies proximamente relacionadas, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* e subsp. *londoniensis*, e

II - *L. grayi* (*L. murrayi* foi recentemente incluída nesta espécie) (Rocourt; Cossart, 1997).

As espécies da primeira (I) podem ser divididas em 2 grupos:

a) *L. monocytogenes* e *L. innocua* e,

b) *L. ivanovii*, *L. selligeri* e *L. welshimeri* (DONNELLY, 2001; McLAUCHLIN, 1997; ROCOURT, 1999; RYSER, 1999).

L. denitrificans foi reclassificada para *Jonesia denitrificans*, e *L. murrayi* foi reclassificada como uma subespécie de *L. grayi* (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

Atualmente, na segunda edição do *Taxonomic Outline of the Prokaryotic General Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, o gênero *Listeria* encontra-se classificada na Classe Bacilli, Ordem I Bacillales e família IV Listeriaceae (GARRITY *et al.*, 2001).

3.3 CARACTERÍSTICAS DE *Listeria* spp e *Listeria monocytogenes*

3.3.1 *Listeria* spp

Morfologicamente, os microrganismos do gênero *Listeria* apresentam a forma de pequenos bastonetes Gram positivos. As colônias, quando em meio de cultura claros e translúcidos e sob luz oblíqua transmitida, apresentam coloração azul esverdeada (SEELIGER; JONES, 1986).

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 5 mm abaixo da superfície, e mantendo-se restrita à picada no fundo do tubo. Este tipo de migração produz um crescimento característico lembrando um guarda-chuva (SILVA *et al.*, 1997).

São aeróbios e anaeróbios facultativos e possuem movimentos característicos em forma de tombamento ocorrendo somente em uma faixa estreita de temperatura de 20 - 25°C (SEELIGER; JONES, 1986). *Listeria* spp. cresce sob condições aeróbias e microaerófilas, dando preferência à ambiente com 10% de dióxido de carbono. *Listeria* spp multiplica-se na faixa ampla de temperaturas, entre 3 a 45°C com temperatura ótima de 30 a 37°C, mas é considerado um patógeno psicrotolerante (DONNELLY *et al.*, 1992).

Podem crescer em pH variando entre 4,3 a 9,6 (DONNELLY, 2001), atividade de água (A_w) mínima de 0,90 (FARBER *et al.*, 1992) e toleram altas concentrações de cloreto de sódio, sobrevivendo a 25,5% de NaCl (DONNELLY, 2001).

As características bioquímicas utilizadas para identificação das bactérias do gênero *Listeria* são: produção de catalase, não produção de oxidase, fermentação de

glicose com produção de ácido láctico sem produção de gás, provas positivas de Voges Proskauer e vermelho de metila, a capacidade de hidrolisar a esculina, e a incapacidade de utilizar a uréia (RYSER; DONNELLY, 2001). Outras características que também podem ser utilizadas na caracterização bioquímica do gênero *Listeria*: não utilização do citrato exógeno e não produção de indol; capacidade de hidrolisar hipurato de sódio; não hidrolisar uréia, gelatina e caseína (SEELIGER; JONES, 1986; RYSER; DONNELLY, 2001).

A diferença entre as espécies baseia-se em testes de fermentação de carboidratos (manitol, ramnose e xilose; provas de redução de nitrato; produção de hemólise em ágar sangue (β -hemolisina), incluindo o teste CAMP, e o teste de patogenicidade em camundongos (SEELIGER; JONES, 1986; LOVETT, 1987).

Há três espécies hemolíticas de *Listeria*: *L. ivanovii*, *L. monocytogenes* e *L. seeligeri*, e a diferenciação entre elas se dá pela fermentação ou não de três açúcares, *D*-xilose, *L*-ramnose, α -metil-*D*-manosídeo (ROCOURT *et al.*, 1983; ROCOURT; CATIMEL, 1985). *L. seeligeri* é, geralmente, menos hemolítica do que *L. monocytogenes*. Pode-se, assim, definir a diferença entre as espécies (DALLAS *et al.*, 1995).

Em estudos sobre fermentação de carboidratos foi observado que *Listeria* spp em condições anaeróbias utilizam somente hexoses e pentoses como substrato para seu crescimento. O crescimento rápido de *L. monocytogenes* e *L. innocua* ocorre na presença de carboidratos, especialmente, quando é usada a glicose como fonte de carbono. *L. murray* utiliza galactose. *L. ivanovii* e *L. seeligeri* são as únicas que fermentam xilose (PINE *et al.*, 1989, SEELIGER; JONES, 1986, FARBER; PERTERKIN, 1991).

As espécies *L. ivanovii* e *L. seeligeri* foram associadas em pelo menos quatro casos de listeriose humana. *L. ivanovii* e *L. monocytogenes* são ocasionalmente responsáveis por abortos em animais. *L. seeligeri* é frequentemente considerada como microrganismo não patogênico (KLIMA; MONTVILLE, 1995). Entretanto, a única espécie considerada patogênica para o homem é a *Listeria monocytogenes* (PICHI *et al.*, 1999).

Além da *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. ivanovii* são espécies já detectadas nos alimentos e ambiente (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005; McLAUCHLIN, 1997).

A presença de *Listeria* spp em ambientes de processamento de alimentos ocorre devido à sobrevivência em aerossol ou células aderindo-se a superfícies de contato e, desta forma, proliferando-se em micro colônias formando biofilme pela inadequada limpeza e higienização (SASAHARA; ZOTTOLA, 1993).

3.3.2 *Listeria monocytogenes*

O agente etiológico da maioria dos casos de listeriose em humanos é *L. monocytogenes*, um bacilo Gram-positivo, curto, de 0,4-0,5 µm de diâmetro e 0,5-2 µm de comprimento, com extremidades arredondadas, que pode apresentar forma cocóide ou filamentosa, em culturas com 2-3 dias (FARBER; PETERKIN, 1991; PHAN-THANH *et al.*, 2000; LOVETT, 1989; DONNELLY, 1994). Os microrganismos podem ser observados isolados ou em cadeias curtas (ROCOURT, 1999; RYSER; DONNELLY, 2001). Assemelham-se a cocos em culturas velhas e perde a habilidade em reter o complexo cristal violeta mais lugol, o que leva freqüentemente a erros de identificação (SEELIGER; JONES, 1986). Conseqüentemente, têm sido classificados erroneamente em diagnóstico clínico como *Corynebacterium* spp., *Haemophilus influenza*, *Erysipelothrix* spp., pneumococos, estreptococos ou estafilococos (RYSER; DONNELLY, 2001). É um microrganismo desprovido de cápsula, não formador de esporos (LOGUERCIO *et al.*, 2001).

L. monocytogenes multiplica-se em aerobiose ou anaerobiose e prefere ambientes microaerofílicos (ROCOURT, 1999).

Possui rápida multiplicação na maioria dos meios bacteriológicos, crescendo bem em caldo infusão cérebro coração (BHI), caldo soja tripticase e caldo tripticase (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). Requer biotina, riboflavina, tiamina e aminoácidos como cisteína, glutamina, isoleucina e valina (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005; ROCOURT, 1999). Em ágar nutriente, as colônias típicas de *Listeria* são cinza azuladas, apresentando de 0,2 a 0,8 mm de diâmetro após 24 horas de incubação (RYSER;

DONELLY, 2001). As colônias, quando visualizadas à luz transmitida, em direção oblíqua apresentam brilho azul-esverdeado (FARBER; PETERKIN, 1991).

O patógeno apresenta reação catalase positiva e oxidase negativa; expressa β -hemolisina, produzindo uma zona de clareamento em ágar sangue (BENEDICT, 1990; FARBER; PETERKIN, 1991; HOLT *et al.*, 1994); produz ácido por fermentação de glicose, frutose, manose, galactose, celobiose, maltose, melezitose, trealose e ramnose, sem formação de gás; hidrolisa esculina, salicina, amigdalina e hipurato de sódio; apresenta teste vermelho metil positivo; produz amônia a partir da arginina; reage negativamente para produção de sulfeto de hidrogênio, indol e nitrato redutase; liquefaz gelatina; hidrolisa amido e uréia; reduz telurito; e é parcialmente inibido por 0,02% de azida e cianida (BENEDICT, 1990; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005; RYSER; DONELLY, 2001).

Independente da classificação em diferentes espécies, bactérias do gênero *Listeria* spp. podem ser submetidas à tipificação por sorologia, possibilitando a divisão em sorotipos com base nos antígenos somáticos (O) e flagelares (H). A confirmação sorológica não é necessária para a identificação de rotina de *L. monocytogenes*, mas é bastante útil para a determinação da prevalência de determinados sorotipos em estudos epidemiológicos e o rastreamento de contaminações alimentares e ambientais (BENNET; WEAVER, 1995). Mais de 14 sorotipos já foram caracterizados (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4bX, 4c, 4d, 5, 6a, 6b, "7") (DONELLY, 2001). Não existem estudos correlacionando sorotipos com adaptação ao hospedeiro humano e, conseqüentemente, estabelecendo um significado clínico na tipificação sorológica (LUNGE, 2000). Dos sorotipos identificados de *L. monocytogenes*, somente três são mais comumente responsáveis pelos surtos de listerioses 1/2a, 1/2b, e mais freqüentemente 4b (KEROUANTON *et al.*, 1998; MARGOLLES *et al.*, 1998). O sorotipo 1/2 é comumente isolado em produtos cárneos, os mais incidentes são, em ordem decrescente, 1/2a, 1/2b e 4b, enquanto as cepas freqüentemente isoladas de casos clínicos são 4b, 1/2a e 1/2b (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). Uma vez que todas as espécies não patogênicas de *Listeria*, exceto *L. welshimeri*, dividem um ou mais antígenos somáticos com *L. monocytogenes*, o uso de sorotipagem como teste individual, sem caracterização bioquímica, não se apresenta como adequado para a

confirmação de cepas isoladas como *L. monocytogenes* (RYSER; DONELLY, 2001). Como nos métodos bioquímicos, os métodos de sorotipagem são também capazes de fornecer resultados discrepantes devido a sua dependência nas suas características fenotípicas de *Listeria*. Por essa razão, os métodos de sorotipagem tem sido sobrepostos com procedimentos moleculares que intrinsecamente são mais específicos e sensíveis para identificação e diferenciação de espécies de *Listeria* (LIU, 2006).

Treze cepas de *L. monocytogenes* foram isoladas de 12 casos clínicos de listeriose ocorridos em 6 municípios da região sudoeste do Estado de São Paulo, no período de janeiro de 1995 a maio de 2005. As cepas foram submetidas ao teste de sensibilidade a cinco antimicrobianos (ampicilina, gentamicina, trimetoprim, sulfametoxazol e vancomicina). Dez cepas pertenciam ao sorotipo 4b, duas ao sorotipo 1/2a e apenas uma ao sorotipo 1/2b. Com o emprego da técnica de PFGE e as enzimas Apal e Ascl, as cepas foram separadas em três grupos diferentes, de acordo com seus perfis moleculares. A caracterização desses isolados clínicos apresentaram perfis moleculares semelhantes indicando uma possível relação clonal entre elas (LEMES-MARQUES *et al.*, 2007).

São capazes de crescer em diferentes temperaturas, tempos de incubação e concentrações salinas (COLE *et al.*, 1990; CONNER *et al.*, 1986; BUCHANAN; KLAWITTER, 1990). A temperatura ótima de crescimento situa-se na faixa de 30 a 37°C, embora temperaturas extremas como 1°C e 45°C permitam o crescimento de *Listeria* spp., e congelamentos a -18°C e descongelamentos sucessivos parecem não promover a sua inativação (SCHUCHAT *et al.*, 1991).

Supõe-se que *L. monocytogenes* pode crescer a baixas temperaturas como conseqüência de sua habilidade em modificar a composição de sua membrana lipídica (JONES *et al.*, 1997).

L. monocytogenes é termolábil, pode ser destruída durante o cozimento, no entanto, é considerada mais resistente que outros patógenos. A pasteurização do leite, a 71,6 °C por 15 segundos pode inativar este organismo (ROSENOW; MARTH, 1987; DONELLY *et al.*, 1992).

Alguns fatores como tempo, temperatura de incubação e as condições de recuperação influenciam a termo resistência das linhagens de *Listeria* spp, embora, a grande maioria dos trabalhos sobre a resistência térmica seja conflitante. Choques de

temperatura de 55 e 63°C por 30 minutos podem induzir o aumento da resistência, particularmente a 63°C. Estes parâmetros de 62,8 °C por 30 minutos foram selecionados para reproduzir condições de pasteurização lenta (VASSEUR *et al.*, 1999).

Avaliou-se a resistência de *L. monocytogenes* ao calor, após aplicação de choques de temperaturas durante 180 minutos em diferentes temperaturas (24 a 48°C), concluíram que dentro da faixa de temperatura estudada a resistência aumentou quando choques de temperaturas foram aumentados, sendo que a resistência máxima obtida foi a 45°C (PAGAN *et al.*, 1997).

L. monocytogenes possui flagelos peritríquios, os quais dão ao microrganismo uma característica de motilidade em tombamento, e este comportamento ocorre somente em faixas restritas de temperatura (20°C a 25°C) (FARBER; PETERKIN, 1991; HOLT *et al.*; 1994; . ROCOURT, 1999). *L. monocytogenes* é um halotolerante. Pode tolerar concentrações de 10% a 30% de cloreto de sódio e crescer a uma A_w de 0,90 (RYSER; DONELLY, 2001), dependendo de fatores que influenciam a multiplicação, como pH e temperatura (LOVETT, 1989).

Algumas linhagens podem tolerar ambientes de 20% de NaCl e A_w de 0,83. Estudos mostraram que *L. monocytogenes* em ambientes com 25,5% de NaCl, sobrevive por 132 dias a 4°C, 32 dias a 22°C e 5 dias a 37°C (SEELIGER; JONES, 1986).

O cloreto de sódio é principalmente usado na indústria de alimentos em salmoura para fabricação de queijo. VASSEUR *et al.*, (1999) demonstraram que todas as espécies de *Listeria* foram capazes de crescer sob as condições experimentais de 4,0; 5,0; 6,2 e 8,0 % de NaCl em caldo de enriquecimento TSB- YE (Caldo tripticase de soja suplementado com 0,6 % de extrato de levedura), embora tenha variado fracamente, dependendo das concentrações de NaCl e da linhagem estudada.

A adaptação de *Listeria* spp. em altas concentrações de soluto envolve acúmulo intracelular de compostos orgânicos chamados de osmólitos (glicina, betaina), que atuam contrabalançando a força osmótica, impedindo, desta forma a perda de água pela célula (SLEATOR *et al.* , 1999).

Os ácidos sórbico e benzóico são inibidores do crescimento de *L. monocytogenes*, sua suscetibilidade a estes compostos tem estreita interação com a

temperatura e pH, sendo a inibição mais efetiva em pH 5 e 4 °C (VARNAM; EVANS, 1991). Os resultados enfatizam que a atividade antilisterial do ácido acético foi melhor do que o ácido láctico ou ácido clorídrico. O ácido láctico pode ser menos inibitório por não conseguir penetrar na membrana da célula, pois o efeito inibitório destes ácidos pode estar correlacionado com a constante de dissociação (pKa) e com a melhor permeabilidade da membrana da célula para ácidos fracos e suas formas não dissociadas (VASSEUR *et al.*, 1999). A A_w ideal para o crescimento de *Listeria* spp é próxima de 0,97. Foi constatada a sobrevivência destes microrganismos em alimentos desidratados, indicando sua capacidade de tolerar A_w inferior a 0,93 (DOYLE *et al.*, 1985).

Estudos com *L. monocytogenes* demonstram que o patógeno multiplica-se em valores de pH que variam de 4,4 a 9,6, com pH ótimo de crescimento de 7,0 (RYSER; DONNELLY, 2001; SCHUCHAT *et al.*; 1991). *L. monocytogenes* cresce em pH entre 5,0 e 9,6 com crescimento ótimo em pH entre 7,0 e 7,5. Estudos indicam que este microrganismo é capaz de sobreviver por longos períodos em pH abaixo de 5,6, que em pH entre 4,2 e 4,8, têm sua sobrevivência limitada e, é mais rapidamente inativada pelo calor (DONNELLY *et al.*, 1992, GALDIERO *et al.*, 1997).

A multiplicação pode ocorrer mesmo na presença de nitrito de sódio (FARBER; HARWIG, 1996). Foi relatado que *L. monocytogenes* tolera concentrações de nitrito de sódio de cerca de 156 ppm, valor máximo permitido para carnes curadas nos Estados Unidos (DOYLE, 1988). A inibição do crescimento do patógeno, no entanto, é obtida pela combinação com outros fatores. Ao associar 100 ppm de nitrito de sódio, 3% de NaCl e pH próximo a 5,5 a uma temperatura de 50°C a bactéria foi inativada (SHAHAMAT *et al.*, 1980). Nisina e pediocina, produzidas por *Lactococcus lactis* spp. *Lactis* e *Pediococcus* spp., respectivamente, bem como outras bacteriocinas, têm demonstrado capacidade de inativar *L. monocytogenes*, como têm sido verificados em diversos trabalhos (BARNES *et al.*, 1989; BERRY *et al.*, 1990; MING *et al.*, 1997; ZHENG *et al.*, 1999; ARIYAPITIPUN *et al.*, 2000).

Foi pesquisada a sobrevivência de *L. monocytogenes* em queijo pasteurizado laboratorialmente contaminado, estocado a 30°C, que, embora houvesse decréscimo na população do patógeno, após 96 horas da inoculação ainda havia bactérias viáveis no

produto (GLASS *et al.*, 1998). A presença de bactérias lácticas, no entanto, reduzir o número de células viáveis de *Listeria monocytogenes*, não só pela redução do pH como pela produção de bacteriocinas (SHAACK ; MARTH, 1988).

3.4 FATORES DE VIRULÊNCIA DE *L. monocytogenes*

Como importante fator de ação para a instalação do patógeno e disseminação da infecção, a *L. monocytogenes* apresenta um mecanismo específico de invasão de células fagocíticas e não fagocíticas como macrófagos, células epiteliais e endoteliais, fibroblastos, hepatócitos e vários tipos de células nervosas, como por exemplo, os neurônios (COSSART, 2002; HAIN; STEINWEG; CHAKRABORTY,2006)

Estudos sugerem que *L. monocytogenes* pode infectar o homem e outros animais pelas seguintes vias: oral, ocular, cutânea, respiratória ou urogenital. A forma mais comum de contaminação dessa bactéria é pela ingestão de alimentos contaminados, portanto o trato gastroentestinal é a principal porta de entrada para a bactéria no hospedeiro. O trato intestinal é local de entrada para *L. monocytogenes* no organismo através das células epiteliais no ápice das microvilosidades. Então, difundem-se, não só pelo interior desta célula, como também de uma célula para outra. Na fase seguinte, são fagocitadas por macrófagos, mas não induzem uma resposta inflamatória significativa (PEARSON; MARTH, 1980). As células de *L. monocytogenes*, uma vez dentro dos macrófagos, encontram-se protegidas dos leucócitos polimorfonucleares (FRANCO; LANDGRAF, 2005). Aproximadamente, um a dois dias a sua penetração, as bactérias são carregadas pela linfa ou pela corrente sanguínea. A partir daí, o patógeno pode atingir os linfonodos, a placenta, o fígado e o baço. Após essa etapa inicial, a bactéria promove uma rápida colonização dos tecidos invadidos. Usando o mesmo sistema de invasão celular, a espécie virulenta pode atravessar a barreira placentária e chegar ao feto, além de infectar o sistema nervoso central. A capacidade que *L. monocytogenes* possui de invadir células não fagocíticas deve-se a um mecanismo chamado “zipper type” . Nesse mecanismo, a bactéria vai gradualmente sendo internalizada pela célula hospedeira até sua total entrada na mesma, ficando inicialmente envolta pela membrana celular. A partir de então, inicia-se o ciclo de vida

intracelular. Esse ciclo segue alguns passos já conhecidos. A espécie patogênica produz as toxinas Listeriolisina O (LLO) e a fosfolipase C (PIPLC) que acidificam o meio e rompem o vacúolo. Cerca de 30 min após a sua entrada, *L. monocytogenes* está livre no citosol (IRETON; COSSART, 1997).

Uma vez no citosol, a bactéria multiplica-se dobrando sua população em uma hora. Para a sua locomoção dentro do citoplasma, a bactéria utiliza a motilidade chamada de cauda de actina. Essa cauda de actina realiza movimentos rotatórios que irão propulsar a bactéria pelo citosol até encontrar a membrana plasmática e chagar à célula adjacente. Então, a bactéria será novamente internalizada por vacúolos, porém agora este possui uma membrana dupla: uma formada pela primeira célula que já foi invadida e outra formada pela que está sendo invadida. A seguir, recomeça todo o ciclo de lise do vacúolo para cada celular vizinha até a colonização total do tecido (VASQUEZ – BOLAND *et al.*, 2001). Cada uma das etapas descritas do processo de invasão celular está associada a diversos mecanismos de virulência.

O processo de patogênese de *L. monocytogenes* tem sido bastante estudado em nível molecular. A listeriolisina O é codificada pelo gene *hlyA*. Mutantes de *L. monocytogenes* que perdem a atividade do gene *hlyA* não são capazes de causar hemólise e perdem a virulência. No ano de 1999, Kayal *et al.*, descobriram que listeriolisina O, secretada por *L. monocytogenes*, é um potente estimulador inflamatório (PORTNOY *et al.*, 1988). Listeriolisina O pertence a família de citolisinas colesterol dependentes e formadoras de poros (KAYAL; CHARBIT, 2006)

O aspecto chave para patogenicidade de *L. monocytogenes* é sua habilidade de invadir e multiplicar em fagócitos e não fagócitos. Presume-se que a adesão da *L. monocytogenes* seja mediada por moléculas na superfície da célula com receptores complementares presentes na célula eucariótica (PANDIRIPALLY *et al.*, 1999).

Outros fatores de virulência são codificados pelos genes *actA*, *plcB*, *inlA* e *inlB*. A *actA* é responsável pela polimerização da actina, levando à extrusão da bactéria de célula infectada até as células vizinhas. A lecitinase codificada pelo gene *plcB* é requerida para a lise da membrana do vacúolo que contém a bactéria. Caminho alternativo pode permitir a invasão direta de células não fagocíticas. Neste processo

estão envolvidos dois genes, *inlA* e *inlB*, que codificam proteínas que estão envolvidas na indução da endocitose da bactéria (KUHN; GOEBEL, 1998).

Por outro lado, o processo de adesão da bactéria à célula hospedeira é outra etapa do processo infeccioso. Estudos têm demonstrado que uma proteína extracelular conhecida por p60 e codificada pelo gene *iap*, tem uma função chave na aderência deste organismo em células eucarióticas (KUHN; GOEBEL, 1989).

O gene *hly* é controlado por um regulador positivo de transcrição, chamada de PrfA, codificada pelo gene *prfA*, que faz parte de um grupo de genes. O operon lecitinase é composto por um gene *mpl* para uma metaloprotease, outro gene *actA* que codifica ActA e um gene *plcB* para a lecitinase. A metaloprotease parece ser necessária para o processamento proteolítico da lecitinase na sua forma madura (SOKOLOVIC *et al.*, 1993). Todos estes genes são essenciais para a virulência de *L. monocytogenes* e a expressão deles está sob o controle coordenado de PrfA que é absolutamente necessário para que haja a transcrição eficiente destes genes dentro do hospedeiro. O gene PrfA é expresso por dois promotores, *PrprfA*, que é negativamente regulado pela própria PrfA, e *PrplcA*, que é positivamente regulado por PrfA. A consequência desta complexa organização genética é que níveis basais de PrfA são produzidos por *PrplcA*, os quais são insuficientes para ativar a expressão dos genes de virulência individualmente sob condições de não indução. No entanto, quando a bactéria entra no hospedeiro, a expressão de *PrplcA* é induzida e o sistema de auto-regulação positiva rapidamente leva a altos níveis da proteína PrfA na célula e por consequência, à indução de outros fatores de virulência (SHEEHAN *et al.*, 1994).

No mundo todo está se dando ênfase na análise e caracterização de mecanismos regulatórios que controlam a expressão de PrfA (e consequentemente dos genes de virulência dependentes de PrfA) em resposta a estímulos ambientais (COFFEY *et al.*, 1996; ERMOLAEVA *et al.*, 1997). Sob condições de stress como elevação de temperatura (SOKOLOVIC; GOEBEL, 1989; LEIMEISTER-WACHTER *et al.*, 1992; ZEMSER; MARTIN, 1998) e stress nutricional (BOHNE *et al.*, 1994; ERMOLAEVA *et al.*, 1997; PARK *et al.*, 1992; SOKOLOVIC *et al.*, 1993), a síntese das proteínas dependentes de PrfA é aumentada e diferenças na sua quantidade são observadas em diferentes amostras de *L. monocytogenes*. Isto explicaria a variação

existente na expressão dos fatores de virulência entre as diferentes amostras. Ripio *et al.*, em 1996, estudaram os níveis de expressão de LLO e da lecitinase em amostras selvagens de *L. monocytogenes*, concluindo que a vasta maioria delas exibe um fenótipo caracterizado por fraca atividade hemolítica e de lecitinase, e que reações fortes representam um fenótipo variante.

3.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS CAUSADAS POR *Listeria* spp

Listeriose, doença causada por *Listeria*, foi observada em animais por Hulphers em 1911, quando o gênero era ainda chamado de *Listerella* (JAY, 1996).

A doença foi relatada em humanos pela primeira vez em 1929, estabelecendo-se a partir de então a correlação entre *Listeria monocytogenes* e meningite em humanos (BAHK; MARTH, 1990). Em 1933, foi associada com doença peri-natal (JAY, 1996). Nesse mesmo ano, a doença em ovinos foi identificada e caracterizada, uma vez que os animais apresentarem movimentação de rotação (sintomatologia que ainda hoje é utilizada para identificar encefalite causada por *L. monocytogenes* em ruminantes) (BAHK; MARTH, 1990).

A despeito da abundância de *L. monocytogenes* no meio ambiente, relativamente poucas pessoas adquirem a listeriose, o que é provavelmente resultado de uma resposta imune eficiente pela maioria das pessoas saudáveis. No entanto, deve-se levar em consideração que muitos microrganismos do gênero *Listeria* spp. presentes no meio ambiente não são ou são apenas fracamente virulentos. Há relatos de que amostra de *L. monocytogenes* envolvidas em surtos de listeriose, caracterizadas por técnicas de PCR, apresentaram diferenças nas suas seqüências de DNA e possivelmente na expressão dos seus diferentes fatores de virulência (DOYLE, 2001). Estes resultados sugerem que nem todas as amostras de *L. monocytogenes* encontradas no meio ambiente ou em alimentos apresentam o mesmo perigo para a saúde humana. Entretanto, não há até o momento uma maneira fácil de distinguir quais amostras podem apresentar riscos para a saúde. Amostras expostas a condições de moderada acidez desenvolvem tolerância à acidez, tornando-se mais hábeis na sua capacidade de invadir e proliferar em culturas celulares ou mesmo em alimentos. Dessa

maneira, fatores ambientais parecem afetar a virulência de *L. monocytogenes*, o que torna necessário o conhecimento sobre a potencialidade das amostras na produção de fatores de virulência (CONTE *et al.*, 2000).

As manifestações associadas com *L. monocytogenes* em humanos incluem meningoencefalite, sintomas de gripe, baixo grau de septicemia no período pré-natal, síndrome de mononucleoses, septicemia em adultos, pneumonia, endocardites, abscessos localizados, lesões cutâneas papular ou pustular, conjuntivites, uretrites e ocorrência de abortos. Também pode causar danos cerebrais e retardamento mental (PEARSON; MARTH, 1980).

Os indivíduos preferencialmente atingidos são os neonatos, as gestantes, indivíduos na faixa etária acima de 60 anos e os imunodeprimidos. O índice de mortalidade nesses casos pode variar de 20 a 30% (ICMSF, 1996; McLAUCHLIN, 1996; RAINALDI *et al.*, 1991; ROCOURT; COSSART, 1997).

As mulheres gestantes pertencem a um grupo de alto risco devido à infecção ser transmitida para o feto e podendo causar aborto, natimorto ou parto prematuro. As gestantes geralmente não apresentam sintomatologia característica, podendo ocorrer em alguns casos sintomas semelhantes a um resfriado, com febre, mialgia e cefaléia. Através da corrente sangüínea da mãe, o microrganismo atinge o feto (infecção transplacentária) causando aborto, geralmente no terceiro trimestre de gestação, ou doença no neonato (ROCOURT, 1996). Outra forma de contaminação dos neonatos ocorre durante o parto normal. O período de incubação é de 10-20 dias, com desenvolvimento posterior de meningite (SCHLECH, 1996). Cerca de 11% dos neonatos acometidos por meningite podem apresentar seqüelas (ROCOURT, 1996).

Nos indivíduos imunossuprimidos ou idosos geralmente ocorre meningite ou meningoencefalite, devido ao tropismo do microrganismo pelo sistema nervoso central. Os casos de meningite apresentaram letalidade de 43,8%. Outra forma comum da doença nesses indivíduos é a septicemia (ROCOURT, 1996). Também tem sido relatada a forma gastroentérica, em decorrência ao consumo de alimentos contaminados (DALTON *et al.*, 1997a).

A incidência de listeriose em gestantes varia, de acordo com relatos, de 4,7-30 casos por 100.000 nascimentos. Em pacientes transplantados este valor sobe para 200

casos/100.000; pacientes oncológicos, 13 casos /100.000; indivíduos com mais de 65 anos; 1,4 casos /100.000 e em indivíduos portadores do vírus HIV a incidência varia de 52-115 casos /100.000 indivíduos. Considerando o conjunto dos indivíduos citados, em torno de 30% podem apresentar seqüelas (ROCOURT, 1996).

A taxa de portadores assintomáticos é de 5%, variando de 1 a 10%. Parece provável que em indivíduos saudáveis ocorram infecções autocuráveis que não são diagnosticadas como listeriose (DAVIES et al., 1984, LOVETT; TWEDT, 1988).

A listeriose ocorre esporadicamente na população humana, mas podem surgir surtos epidêmicos. Dos sorotipos identificados de *L. monocytogenes*, somente três são mais comumente responsáveis pelos surtos de listerioses 1/2a, 1/2b, e mais freqüentemente 4b (KEROUANTON et al., 1998; MARGOLLES et al., 1998).

3.6 IMPORTÂNCIA DA *L. monocytogenes* NA CONTAMINAÇÃO DOS ALIMENTOS

A importância da *Listeria monocytogenes* para a saúde pública está no fato dela causar uma severa infecção em humanos e nos animais caracterizada por meningite, septicemia ou aborto (GANDHI; CHIJINDAS, 2007).

Vários surtos da enfermidade têm sido descritos pelo mundo. Na Europa e nos EUA diversos surtos de listeriose foram atribuídos ao consumo de leite pasteurizado, produtos de laticínio em especial queijos de alta umidade, vegetais crus e produtos cárneos (CANTONI et al., 1989; PARODI et al., 1990; FARBER, PETERKIN, 1991; McLAUHLIN et al., 1991; JACQUET et al., 1995; CDC, 1999; ROCOURT; COSSART, 1997; TOBIA et al., 1997).

Casos esporádicos da doença foram registrados, tendo sido causados pelo consumo de aves, produtos de salsicharia, pescado entre outros (FARBER; PETERKIN, 1991; ROCOURT; COSSART, 1997).

L. monocytogenes do sorogrupo 4 está mais relacionada a surtos, enquanto que o sorogrupo 1/2a é o mais detectado em alimentos, estando mais envolvido em casos esporádicos (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005; SCHLECH, 1996). Nos países de clima temperado ocorre uma variação sazonal da doença, com maior número de casos nos meses de outono e inverno seguido pela primavera e verão (ROCOURT, 1996).

Baseado nos casos de listeriose já identificados, estima-se nos EUA uma incidência anual de 1600 casos, com aproximadamente 400 mortes (SHANK et al., 1996). Já pelos dados do FoodNet (CDC-EUA), estima-se que ocorram 2493 casos de listeriose de origem alimentar anualmente, com 499 mortes, o que torna a *L. monocytogenes* um dos 5 patógenos que mais causa morte nos EUA, sendo responsável por 28% do total de óbitos causados por doenças de origem alimentar, naquele país (MEAD et al., 1999).

Apesar da magnitude da sintomatologia com possibilidades de seqüelas e da alta mortalidade, a incidência de listeriose é considerada baixa. Na Inglaterra ocorreram 116 casos em 1996, número que pode ser considerado baixo quando comparado as toxinfecções causadas por *Salmonella* spp. e *Campylobacter* com 29.887 e 43.877 casos respectivamente (DUGGAN; PHILLIPS, 1998).

No Canadá poucos casos foram confirmados: em 1993, 56 casos e em 1994, 46 casos (FARBER, HARWIG, 1996).

Na Alemanha, estima-se que ocorram 200 casos de listeriose/ ano para uma população de 80 milhões. Isso resulta em aproximadamente 3 casos por 1 milhão de habitantes. Nos EUA estes valores são de 4 a 5 por milhão. Esses dados mostram que a listeriose é uma doença relativamente rara (BUCHANAN et al., 1997).

A dose mínima infectante para a listeriose ainda não foi estabelecida, mas acredita-se que se fosse baixa, maior número de casos seriam relatados frente ao que se tem observado. De fato, de acordo com dados dos surtos já ocorridos, têm-se poucas evidências de que baixos números de *L. monocytogenes* no alimento possam causar listeriose em indivíduos susceptíveis (FARBER, HARWIG, 1996). Porém, a partir da análise de alimentos envolvidos em surtos e casos esporádicos de listeriose, encontraram-se tanto contagens elevadas (acima de 10^3 UFC/g) quanto contagens baixas (inferiores a 10^2 UFC/g). Partindo-se destes achados, poder-se-ia dizer que doses de *L. monocytogenes* iguais ou maiores a 10^2 UFC/g de alimento poderiam causar quadro de toxinfecção alimentar (FAO, 1999).

A dose infectante de patógeno de origem alimentar está relacionada, entre outros fatores, com as condições do hospedeiro, o nível de contaminação do alimento pelo patógeno, a quantidade ingerida de alimento e a virulência das cepas (FAO, 1999;

HEISICK *et al.*, 1995). A contaminação de alimentos com níveis acima de 10^3 UFC/g é considerada alta para a *L. monocytogenes* (DESEO, 1999). Experimentos feitos com animais saudáveis indicaram que a ingestão de quantidades de *L. monocytogenes* entre 10^3 e 10^6 UFC/g seriam suficientes para causar dano à saúde (MADDEN, 1992).

Tendo visto a importância da *L. monocytogenes* para a saúde pública, sabe-se que os alimentos são uma importante fonte de contaminação aos humanos. Os alimentos, por sua vez, se contaminam em praticamente toda a cadeia produtiva. O habitat primário de *L. monocytogenes* é o solo e a água. Vegetais podem contaminar-se pelo solo ou adubos usados como fertilizantes. Animais podem carrear a bactéria sem apresentar doença, e contaminar os alimentos de origem animal como carne e leite. A *L. monocytogenes* tem sido encontrada numa grande variedade de produtos crus, como carnes cruas e vegetais, assim como alimentos que se contaminam após o processamento, principalmente os alimentos prontos para consumo (CDC, 1998).

Pode-se dizer que a maioria dos alimentos consumidos pelos humanos, estão contaminados pela *L. monocytogenes*. Ela também pode ser encontrada nos equipamentos e utensílios da indústria de alimentos (JEONG, FRANK, 1994; MANERU, GARCÍA-JALÓN, 1995; DESTRO *et al.*, 1996; RODRIGUES, 1999) sendo estes considerados importantes fontes de contaminação.

Baseado nessas informações, a Organização Mundial de Saúde (OMS) concluiu que a eliminação de *L. monocytogenes* de todos os alimentos é impraticável (FARBER, HARWIG, 1996).

A maior importância da *L. monocytogenes* para a indústria de alimentos é a sobrevivência e a multiplicação em temperatura de refrigeração. Esse dado é relevante, principalmente para os alimentos refrigerados prontos para consumo, caso sejam insuficientemente processados e/ou contaminados após o processamento (McCARTHY, 1997).

Estudos têm sugerido que mudanças na composição dos ácidos graxos da membrana polar lipídica sejam responsáveis por manter a integridade dessa membrana em uma ampla faixa de temperatura do microrganismo permitindo sua multiplicação em temperaturas baixas (JONES *et al.*, 1997).

Os alimentos implicados nos surtos de listeriose que causaram maior número de casos são aqueles produtos que permitem a multiplicação da *L. monocytogenes* até populações elevadas antes do consumo. Fatores tais como pH, A_w , presença de conservantes e vida de prateleira, são utilizados como parâmetros para avaliar se um determinado alimento suporta ou não a multiplicação da *L. monocytogenes* (FARBER, HARWIG, 1996).

Em alguns produtos há interferência de outros fatores que atuam de forma decisiva para o controle efetivo do desenvolvimento da *L. monocytogenes*, como a presença de bacteriocinas e componentes da formulação como ácidos, condimentos e especiarias (FARBER; DALEY, 1994).

Com base nos dados obtidos nos surtos e casos esporádicos de listeriose ocorridos nas últimas décadas, são considerados alimentos de maior risco (ROCOURT; COSSART, 1997):

1 - os prontos para consumo, estocados sob refrigeração, com vida de prateleira longa, conforme detectado por QVIST *et al.*, (1994). Deve-se ressaltar que alimentos prontos para consumo são aqueles que não necessitam de algum tipo de preparo antes do consumo (FARBER, HARWIG, 1996). O consumo a frio dos embutidos cozidos tipo "frankfurter" é um dos maiores fatores de risco ao consumidor, possibilitando a ingestão de quantidades apreciáveis de *L. monocytogenes* (KRÂMÉR; BAUMGART, 1993).

2 - os alimentos contaminados com populações elevadas de *L. monocytogenes* (> 100 UFC/g ou ml) (McLAUHLIN, 1996).

Os alimentos prontos para consumo vêm tendo sua produção aumentada em resposta à demanda por produtos de fácil utilização, com maior vida de prateleira, e também por serem mais práticos (JUNEJA *et al.*, 1997). Isso tem contribuído para tornar a *L. monocytogenes* ainda mais preocupante, pois por não requererem cocção antes do consumo e serem armazenados por vários dias em temperaturas de refrigeração, favorece a multiplicação de *Listeria*, caso presente, em detrimento de outros microrganismos (QVIST *et al.*, 1994).

Produtos prontos para consumo tratados termicamente apresentam, geralmente, diminuição acentuada ou eliminação da microbiota acompanhante, principalmente de bactérias ácido lácticas. Com isso, a manipulação no pós-processamento favorece a

contaminação pela *L. monocytogenes* que devido à ausência de competidores tem sua multiplicação facilitada durante a estocagem em temperaturas de refrigeração (SCHMIDT; KAYA, 1990; SCHMIDT, 1995; GUANG-HUA, MAO-ZHAN, 1997).

No Canadá, para alimentos prontos para consumo, os limites toleráveis de *L. monocytogenes* baseiam-se na determinação de quais alimentos suportam o seu desenvolvimento. Com essas informações e baseando-se principalmente em parâmetros intrínsecos, como atividade de água e pH, declaração no rótulo da vida de prateleira e condições de estocagem, estabeleceu-se uma classificação em 3 categorias. De acordo com esse critério, as mortadelas e outros produtos prontos para consumo ligados a surtos ou casos esporádicos de listeriose foram classificados na Categoria I, que determina a ausência de *L. monocytogenes* em 50 g do produto (FARBER; HARWIG, 1996).

No Brasil, a RDC 12 de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA/MS, determina ausência de *L. monocytogenes* em 25 g em vários tipos de queijo, porém, para produtos cárneos, não há exigência da pesquisa do referido patógeno. A Comissão Internacional de Especificação em Microbiologia para Alimentos estima que 100 UFC/g de alimento são aceitáveis para indivíduos que não se enquadram no grupo de risco (RODRIGUEZ-LAZARO *et al.*, 2004)

Vários estudos têm sido feitos para quantificar *L. monocytogenes* em alimentos. A maioria dos alimentos contém <2 log de UFC de *L. monocytogenes*/g. Apesar de níveis acima de 4 log/g serem raramente observados, valores acima de 5 log/g têm sido encontrados. Esses autores compilaram dados de 7063 produtos e constataram que do total de produtos cárneos analisados, 13,7% encontravam-se na faixa de 0,04-1 UFC/g, 7,8% entre 1-10² UFC/g e 1,6% acima de 10² UFC/g (NOTERMANS *et al.*, 1998).

3.6.1 Listeriose transmitida por leite cru

A primeira evidência de transmissão de *L. monocytogenes* por alimentos ocorreu após a II Guerra Mundial em Halle, Alemanha Oriental, onde aproximadamente 100 casos de partos prematuros foram registrados numa clínica obstétrica. A presença de *L. monocytogenes* no leite e derivados consumidos pelos pacientes foi considerada responsável pelos surtos (GRAY; KILLINGER, 1966).

Alguns autores citam casos esporádicos de listeriose com a suspeita de transmissão pelo leite:

- a) Em 1973, uma mulher canadense de 28 anos entrou em trabalho de parto prematuro e perdeu a criança 33 horas após o nascimento. Antes da concepção, a mulher havia consumido leite cru e creme (BOWMER *et al.*, 1973).
- b) Na Califórnia, uma paciente de 43 anos, portadora de AIDS, que consumia regularmente leite cru, contraiu meningite listérica (RYSER; MARTH, 1991).

Os pesquisadores, na Iugoslávia, associaram um caso de listeriose, em uma menina de 24 dias, com o consumo de leite materno contaminado. Trinta dias após o aparecimento dos sintomas, *L. monocytogenes*, sorovar 4b, foi isolada do líquido cefalorraquidiano e do sangue da criança, assim como do leite materno. A recuperação da criança ocorreu três dias após a suspensão da amamentação (VLAHOVIC *et al.*, 1988).

3.6.2 Listeriose transmitidas por leite pasteurizado

O consumo de uma marca específica de leite pasteurizado, integral e com 2% de gordura, foi epidemiologicamente ligado a 49 casos de listeriose que ocorreram em Massachusetts, entre junho e agosto de 1983. Destes, 42 casos ocorreram em adultos (86%) e 7 no par mãe/filho (14%). A taxa de mortalidade foi de 29%, com 14 óbitos. *L. monocytogenes* foi isolada de 15 das 124 amostras de leite (12%) obtidas antes da pasteurização e de 2 das 14 amostras obtidas de filtros de leite (14%). Diferentes sorotipos foram identificados, incluindo 1a, 3b, 4ab e 4b, com predomínio do sorotipo 4b (FLEMING *et al.*, 1985). O sorovar implicado no surto não foi isolado do leite pasteurizado, nem do ambiente da indústria, levando alguns investigadores a questionar se realmente o leite foi o responsável pelo surto (DONNELLY *et al.*, 1987).

Em julho de 1994, nos Estados Unidos, 66 pessoas desenvolveram listeriose após consumirem leite achocolatado pasteurizado. Ao contrário dos surtos normalmente notificados até então, os sintomas gastrintestinais (diarréia, febre, náusea e vômito) foram predominantes. Cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2 b foram encontradas no leite achocolatado nos níveis de 10^8 a 10^9 UFC/mL (DALTON *et al.*, 1997).

3.6.3 Listerioses transmitidas por queijos e outros produtos lácteos

O consumo de queijos contaminados com *L. monocytogenes* é reconhecido como uma importante rota de transmissão de listeriose humana (RYSER; MARTH, 1990).

Os queijos, especialmente do tipo mole, devem receber muita atenção, pois foram veículos de transmissão de listeriose em vários casos esporádicos e surtos (HO *et al.*, 1986; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1988; AZADIAN *et al.*, 1989).

Níveis de 10^7 UFC/g foram encontrados em alguns queijos naturalmente contaminados com *L. monocytogenes* o que torna este produto um risco para a saúde do consumidor (FARBER; PETERKIN, 1991).

A possibilidade de que o queijo possa servir como veículo na transmissão de listeriose tornou-se evidente quando o consumo de queijo tipo Mexicano da marca Jalisco foi ligado ao surto do sul da Califórnia. Entre 1 de janeiro e 15 de agosto de 1985, ocorreram 142 casos, com 48 mortes e uma taxa de mortalidade de 33,8% (LINNAN *et al.*, 1988). As investigações sugeriram que possa ter ocorrido uma mistura de leite cru contaminado com leite pasteurizado durante a produção dos queijos e / ou uma contaminação após a pasteurização do leite (SILLIKER, 1986). Este foi o primeiro surto de listeriose registrado, onde o alimento envolvido na epidemia foi identificado durante o surto (FARBER; PETERKIN, 1991).

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, num total de 50 casos por milhão de pessoas/ano. A taxa de mortalidade foi de 28%, com 34 mortes. Dos 120 isolados clínicos examinados no período epidêmico, 111 (93%) foram do sorovar 4b, e destes, 98 (85%) foram isolados do queijo Vacherin Mont D'Or. As pesquisas revelaram que as cepas isoladas do queijo tipo "Vacherin Mont d'Or" eram do mesmo sorotipo e fagotipo da maioria das culturas humanas isoladas no período (BILLE, 1990).

Em Londres, ocorreu um caso de meningite por *L. monocytogenes* em uma paciente imunocompetente que se contaminou pela ingestão de queijo mole (AZADIAN *et al.*, 1989).

O queijo mole, do tipo Mexicano e Feta, foram responsáveis por 15% das listerioses esporádicas estudadas nos Estados Unidos, entre 1988 e 1990 (SCHUCHAT *et al.*, 1992).

Em 1987, ocorreu um surto em Los Angeles, acometendo 11 pessoas e a manteiga foi incriminada como possível veículo da infecção (apud RYSER, 1999).

Na Dinamarca, no período de março de 1989 a dezembro de 1990, aconteceu um surto de listeriose causado pelo consumo de queijo. A investigação mostrou uma evidente ligação epidemiológica entre o consumo de queijo com fungo azul ou queijo duro com os casos reportados no período (apud RYSER, 1999). Em 1989, o queijo Camembert foi implicado em um surto, em Luxemburgo (De BYSER *et al.*, 2001).

Em julho de 1994, ocorreu um surto de listeriose caracterizado por sintomas de gastroenterite e febre após o consumo de leite achocolatado em um piquenique, em Illinois, EUA. 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, tipo eletroforético enzimático e ribotipo. As investigações revelaram que o surto ocorreu, provavelmente, devido às práticas de higienização deficientes da indústria, ocasionando a contaminação do produto durante seu processamento (após a etapa de pasteurização), e armazenamento inadequado, durante o piquenique, do produto a uma temperatura que possibilitou o crescimento da bactéria (DALTON *et al.*, 1997).

Em 1995, na França, ocorreu um surto devido ao consumo de queijo “Brie de Meaux”, queijo macio produzido com leite cru (GOULET *et al.*, 1995). No período de 4 meses, em 1997, 14 casos de listeriose foram diretamente associados ao consumo de queijo “Pont-L'évêque” produzido na Normandia. O queijo implicado foi produzido com leite cru, e continha *L. monocytogenes* sorotipo 4b com população superior a 1.000 UFC por grama (apud RYSER, 1999; apud De BYSER *et al.*, 2001).

Na Finlândia, entre janeiro de 1998 a abril de 1999, ocorreu um surto por *L. monocytogenes* sorotipo 3a. Neste surto, o veículo foi a manteiga pasteurizada. Os isolados de amostras de manteiga, dos pacientes, dos equipamentos e ambiente (dreno)

da indústria apresentaram o mesmo perfil eletroforético, sugerindo contaminação de origem ambiental durante o processamento, após a etapa de pasteurização (LYYTIKÄINEN *et al.*, 2000).

No período entre outubro de 2000 a janeiro de 2001, na Carolina do Norte, 12 pessoas apresentaram infecção por *L. monocytogenes*. As investigações revelaram que queijo fresco macio tipo Mexicano, de fabricação artesanal, produzido com leite cru contaminado, foi o causador do surto (BOGGS *et al.*, 2001).

Na Suécia, entre 15 de junho a 09 de julho de 2001, houve um surto no qual, 48 pessoas sofreram de gastroenterite após consumir produtos lácteos manufaturados na fazenda. Apesar de estafilococos coagulase positivo e *Escherichia coli* enteropatogênica também terem sido encontrados nos alimentos analisados, as investigações epidemiológicas revelaram que queijo fresco, processado a partir de leite cru, contaminado com *L. monocytogenes* foi o agente causador do surto (CARRIQUE-MAS *et al.*, 2003).

Em Quebec, Canadá, no período de abril a dezembro de 2002, ocorreu um surto de listeriose acometendo 17 pessoas. As investigações conduzidas pelas autoridades de Saúde Pública local concluíram que o alimento responsável havia sido um queijo produzido com leite tratado termicamente (temperatura abaixo da pasteurização) e maturado por 60 dias (GAULIN *et al.*, 2003).

Em 2003, nos Estados Unidos, lotes de queijo tipo mineiro foram recolhidos, após um teste de rotina revelar a presença de *Listeria monocytogenes* no alimento. Não foi relatada a ocorrência de doentes (FDA, 2003).

Em 1989, um caso foi descrito por Azadian *et al.*(1989), onde *L. monocytogenes* sorotipo 4b foi isolada do doente e do alimento, queijo contendo 10⁷ UFC/g de *L. monocytogenes*. Mc Lauchlin *et al.*(1990) descreveram um caso associado ao consumo de queijo de leite de cabra. Em 1997, Gilot *et al.* (1997) relataram um caso associado ao consumo de queijo Camembert.

No ano de 2007, Mello confirmou 26 cepas de *L. monocytogenes*, previamente isoladas de produtos lácteos e identificadas por método clássico usando a técnica de PCR para o gene *hly* e análise de variação nucleotídica do domínio central do gene *iap*. Os resultados mostraram variações na seqüência nucleotídica contendo substituições,

inserções e deleções e um número de seqüências similares entre as cepas isoladas e a cepa controle EGD-e. De acordo com os resultados obtidos, a maioria das cepas apresentou uma característica molecular comum diferentes das cepas padrão. E, este perfil predominante pode ser considerado como a característica da *L. monocytogenes* isolados de produtos lácteos do sul do Brasil (MELLO,2007).

3.6.4 Listeriose transmitida por produtos cárneos

Ocorreram dois surtos de listeriose envolvendo produtos cárneos na década de 90. O primeiro teve registro em 22 estados dos EUA, no período compreendido entre 2 de agosto de 1998 e 8 de fevereiro de 1999, atingindo 100 pessoas, com 21 mortes (15 adultos e 6 neonatos). Os alimentos envolvidos foram salsichas e "deli meats". A indústria localizada em Michigan, "Sil Mar Foods", iniciou o recolhimento dos lotes sabidamente contaminados evitando que a disseminação fosse ainda mais ampla (CDC, 1999). O segundo surto noticiado, ocorreu na França a partir de meados de novembro de 1999. Foram notificadas a princípio 7 mortes e 26 doentes. Evidências epidemiológicas indicaram que o provável alimento responsável foi a galantine de língua de porco (PROMEDMAIL, 2000).

De maneira geral a contaminação dos produtos cárneos se dá pelo meio ambiente, pelos ingredientes e pela própria contaminação primária da carne (KORSAK *et al.*, 1998).

Segundo o "Food Safety and Inspection Service" (FSIS) do Ministério da Agricultura americano, os produtos cárneos são responsáveis, todos os anos, por 5 milhões de casos de doenças de origem alimentar com 4000 mortes, sendo *L. monocytogenes*, um dos patógenos mais freqüentes (FSIS, 1998).

3.6.5 Listeriose transmitida por aves e ovos

Na Inglaterra o primeiro caso de listeriose humana tendo como fonte a carne, ocorreu em 1988, pelo consumo de frango cozido. Porém nos EUA, o primeiro caso ocorreu em 1989, tendo como fonte, salsicha de peru (KERR *et. al.*, 1988a,b).

3.6.6 Listerioses transmitidas por pescados

O primeiro caso de listeriose ligado ao consumo de peixe ou pescado, foi registrado em 1989, quando uma italiana de 54 anos contraiu meningite listérica, quatro dias após o consumo de peixe defumado, do qual *L. monocytogenes* foi isolada (FACINELLI *et al.*, 1989).

3.6.7 Listeriose transmitida por vegetais

Um surto de listeriose humana, no Canadá, em 1981, foi associado ao consumo de salada de repolho e foi constatado que o adubo utilizado na plantação do repolho era proveniente de fezes de ovelhas contaminadas por *L. monocytogenes* (PETRAN *et al.*, 1988). Este surto foi considerado o primeiro surto documentado com 41 pessoas doentes e taxa de mortalidade superior a 28% (SCHLECH *et al.*, 1983).

Um paciente de 74 anos, pós-operado num hospital de Londres, apresentou septicemia e meningite listérica após o consumo de alface contaminada. Diferentes sorovares de *L. monocytogenes* (1/2a e 1/2c) foram isolados do paciente e em 1 das 11 (9,1%) amostras de alface preparadas na cozinha do hospital, porém não foram isoladas em outras 44 amostras de alimentos examinados. O consumo de vegetais crus pode representar uma ameaça potencial à saúde dos pacientes hospitalares, muitos dos quais debilitados e ou imunodeprimidos (BENDIG; STRANGWAYS, 1989).

Durante o período de 1980 a 1990, ocorreram 12 surtos de listeriose em diferentes países, sendo que o maior deles envolveu 1566 pessoas e ocorreu na Itália em 1997. Este surto foi provocado pela ingestão de sacada de milho (SCHLECH, 2000; AURELI *et al.*, 2000).

3.6.8. Outros alimentos associados à listeriose

Foram também associados a surtos de listeriose saladas, camarão, patê, marisco, frango cozido, nuggets de frango, salsicha de peru, cogumelos salgados,

sorvete, lingüiça, vegetais em conserva, tabletes de alfafa (apud FARBER; PETERKIN, 1991), alimento à base de língua de porco cozido (JACQUET *et al.*, 1995). Mais recentemente, salsicha tipo “hot dog” (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC, 1998), peixe defumado (MIETTINEN *et al.*, 1999), salada de milho e atum (AURELI *et al.*, 2000), imitação de carne de caranguejo (FARBER *et al.*, 2000) e carne de peru cozido (HURD *et al.*, 2000; FRYE *et al.*, 2002) foram incriminados em surtos de listeriose.

3.7 OCORRÊNCIA DE *L. monocytogenes* EM LEITE E DERIVADOS

Os alimentos, especialmente os de origem animal, exercem um importante papel na transmissão da listeriose humana, entre eles, o leite e seus derivados representam um grande perigo (GORET; OUDAR, 1965).

Além de suas importantes características nutricionais, a coleta e o beneficiamento do leite (ordenha, transporte, resfriamento, pasteurização, distribuição), bem como a produção de seus derivados, envolvem diversas etapas que se não forem bem controladas, poderão favorecer a contaminação e/ou multiplicação de *L. monocytogenes*. Alguns autores consideram a silagem, muitas vezes usada para alimentar o gado no inverno, uma importante fonte de *Listeria* spp., a qual pode contaminar os animais, a carne e o leite consumidos pelo homem, sendo que com base nestas considerações e alguns estudos realizados, foi sugerida a ocorrência de sazonalidade no isolamento da bactéria (COLEMAN, 1986; WEHR, 1987; LOVETT, 1987; LIEWEN; PLAUTZ, 1988; BAHK; MARTH, 1990). Por outro lado, outros estudos realizados consideraram não haver relação entre a incidência de *L. monocytogenes* no leite e a alimentação do gado com a silagem (FARBER *et al.*, 1988, FENLON; WILSON, 1989, LUND *et al.*, 1991, MOURA, 1992).

Avaliou-se a qualidade microbiológica da silagem produzida em Portugal e otimizaram-se alguns aspectos relacionados com a eficácia de detecção de *L. monocytogenes* mediante protocolo baseado na técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) para detecção direta desse microrganismo em amostras de silagens. O protocolo foi aplicado a 74 amostras, em simultâneo com o método bacteriológico convencional. Este último permitiu a detecção de *L. monocytogenes* em

11 silos (15%). Por meio do protocolo FISH, observou-se que 22 silos (29,7%) se encontravam contaminados. O método FISH apresentou precisão (77,0%), especificidade (92,5%) e sensibilidade (72,7%) elevadas, sendo adequado para a análise microbiológica presuntiva de silagens, uma vez que é um método rápido, fácil de realizar, sensível, reprodutível e pouco dispendioso (OLIVEIRA; GUERRA; BERNARDO, 2008).

A infecção do úbere da vaca é de preocupação especial, já que o patógeno pode ser liberado no leite de animais mastíticos. Segundo a literatura, quando *L. monocytogenes* está presente nos alimentos, sua população é geralmente baixa, cerca de menos de 10^2 células/ml ou grama de alimento, sendo que seu crescimento pode ser sobrepujado pela microflora acompanhante (LOVETT, 1988a; GOLDEN *et al.*, 1988a; DONNELLY, 1988; FERNANDEZ-GARAYZABAL e GENIGEORGES, 1990; BAILEY *et al.*, 1990a).

Uma vez contaminada uma planta de processamento de alimentos por *L. monocytogenes*, a mesma pode sobreviver por longos períodos, se a temperatura for baixa e o organismo estiver protegido pelos componentes do alimento (PALUMBO; WILLIAMS, 1990).

Um aspecto muito importante consiste em evitar que os produtos lácteos pasteurizados sofram contaminação pós-processamento devido à sua natureza psicrotrófica e à ausência de microrganismos competidores. *L. monocytogenes* poderá sobreviver e proliferar durante o armazenamento refrigerado. Como consequência, poderá atingir níveis elevados de população, tornando-se, portanto, um problema de saúde pública (VAN DENVER, 1988).

Em diversos trabalhos de ocorrência de *L. monocytogenes* nos produtos lácteos, percebe-se uma variação importante nos resultados obtidos pelos autores. Neste sentido, cabe ressaltar que foram adotadas metodologias diferentes para a obtenção desses resultados.

Um total de 95 amostras refrigeradas de leite cru, provenientes da região central e oeste da Espanha apresentaram *L. grayi* em 89,5% das amostras, *L. monocytogenes* em 45,3%, *L. innocua* em 15,8%, *L. welshimeri* em 3,1% e *L. seeligeri* em 1,05%. Esses resultados são considerados elevados em relação a outros estudos (DOMINGUEZ

RODRIGUEZ *et al.*, 1985).

Também na Espanha, foi isolada *L. monocytogenes* de 21% das amostras de leite pasteurizado com 3,2% de gordura (FERNANDEZ-GARAYZABAL *et al.*, 1986).

Nos EUA, foi recuperada *L. monocytogenes* de 15 das 121 amostras de leite analisadas (12%) e de 2 das 14 amostras de filtros de leite (14%) (HAYES *et al* 1986).

Foi constatada a ocorrência de *Listeria* sp em 706 amostras de diferentes tipos de queijos, procedentes de diversos países e foram encontrados 8,2% de amostras positivas para *L. monocytogenes*. Destas amostras, 11 eram de queijos macios, 06 (seis) de queijos semi-duros e uma de queijo massa filada. Os queijos maturados por crescimento superficial de bolores apresentaram maior contaminação por *L. monocytogenes* do que aqueles que continham bolores em toda a massa. Os autores não encontraram diferença significativa, quanto à presença do microrganismo, entre queijos elaborados com leite pasteurizado e aqueles fabricados com leite cru (TERPLAN *et al.*, 1986).

Em um total de 28 amostras de leite pasteurizado, tratado a 78°C por 15 segundos, comercializado na cidade de Madrid, Espanha, foi encontrada uma cepa hemolítica de *L. monocytogenes* patogênica para camundongo. A *L. grayi* foi isolada de 89,2% e a *L. innocua* de 1,07% das amostras (GARAYZABAL *et al.*, 1987).

Outras 140 amostras de queijos de diversos tipos foram analisadas para detectar a presença de *L. monocytogenes*. Foi isolado o microrganismo a partir de uma única amostra, a qual havia sido produzida artesanalmente com leite de cabra cru (COMI *et al.*, 1987).

Foi investigada a presença de *Listeria* spp. em 374 amostras de queijos macios e semi duros, foi encontrada somente duas amostras positivas para *L. monocytogenes* e uma para *L. innocua* (FARBER *et al.*, 1987).

L. monocytogenes foi encontrada em 10% de um total de 69 amostras de queijos macios examinados (BECKERS *et al*,1987). A bactéria pôde também ser isolada de outras 3 amostras. As amostras de queijo positivas para o patógeno foram elaboradas com leite cru. Os mesmos pesquisadores encontraram também *L. monocytogenes* em 4,3% de 137 amostras de leite cru oriundas da Holanda.

Durante o período referente a outubro de 1984 e agosto de 1985, foi confirmada

a ocorrência de *Listeria* spp. em 650 amostras de leite cru provenientes de 3 estados dos EUA. A incidência de *L. innocua* foi de 7,7%, de *L. monocytogenes* de 4,2%, e a de *L. ivanovii*, *L. welshimeri* e *L. seeligeri* menor do que 1% (LOVETT *et al.*, 1987),

O Florida Department of Agriculture and Consumer Services, FLORIDA (1987) examinou 36 amostras de sorvetes, e encontrou 41% delas contaminados por *Listeria* sp. Paralelamente, o Departamento examinou também 17 amostras de queijos, encontrando 64% de positividade, para esse gênero bacteriano.

Utilizou-se 3 procedimentos diferentes para a detecção de *L. monocytogenes* em 90 amostras de queijo macio maturado superficialmente, sendo que o microrganismo foi isolado de 41 das amostras (DOYLE; SCHOENI, 1987).

Na Suíça, foi investigada a presença de *L. monocytogenes* em leite cru e encontraram apenas 1% as amostras positivas para o microrganismo. A investigação também se estendeu a 1004 amostras de queijo e a 343 amostras de queijos maturados superficialmente por bolores, sendo que a positividade para *L. monocytogenes* foi de 5% e 9,6%, respectivamente (BREER; SCHOPFER, 1988).

Um total de 71 amostras de leite cru provenientes de um laticínio da Nova Zelândia, foram analisadas objetivando o isolamento de *Listeria* sp, encontrou a *L. innocua* em 14%, e a *L. welshimeri* em 1,4% delas. A *L. monocytogenes* não foi encontrada em nenhuma das amostras (STONE, 1987).

Pesquisa realizada na região metropolitana de Curitiba, incluindo 60 amostras de sorvete não constatou a presença de *Listeria monocytogenes*. Entretanto, em uma amostra foi constada *Salmonella* spp (ABRAHAO, 2005).

Foram também analisadas 445 amostras de leite cru oriundas de tanques de armazenamento em Ontário, Canadá, visando isolar *Listeria* sp. A ocorrência foi de 12,4%, assim distribuída: *L. innocua* foi à espécie mais freqüente, estando presente em 9,7% das amostras. *L. monocytogenes*, 2,0%. *L. welshimeri*, 1,3 FARBER *et al.*, (1988).

Duas metodologias diferentes foram utilizadas para a detecção de *L. monocytogenes* em 939 amostras de leite cru, sendo que somente 15 amostras (1,6%) foram positivas para o microrganismo (DONNELLY *et al.*, 1988).

Queijos macios provenientes de diversos países, adquiridos no varejo, no Reino Unido, foram pesquisados quanto à presença de *L. monocytogenes* por GILBERT e PINI

(1988). A ocorrência de *L. monocytogenes* foi maior em queijos oriundos da França, num percentual de 14%; seguiram-se os queijos procedentes da Inglaterra e País de Gales com 4% de positividade. As amostras do Chipre, Dinamarca e República Federal da Alemanha não apresentaram a bactéria.

Um total de 222 amostras de queijos macios fabricados no Reino Unido e em outros países foi analisado com o objetivo de isolar *Listeria*, encontraram 10% das amostras contaminadas com *L. monocytogenes*, distribuídas da seguinte forma conforme a procedência: queijos italianos (16%); franceses (14%); cipriota (10%); e Reino Unido (4%). Algumas cepas de *L. innocua* também foram isoladas (PINI; GILBER, 1988).

Na Itália, foi pesquisada a presença de *L. monocytogenes* em 777 amostras de queijos e encontraram a bactéria em apenas 2,3% das amostras. O mesmo trabalho foi realizado em queijos importados e observou-se uma frequência de 4.5% de amostras positivas no total das amostras examinadas (CANTONI *et al.*, 1988a).

Investigou-se durante um ano, a presença de *Listeria sp* em vários tipos de queijos consumidos na Itália. *L. monocytogenes* foi encontrada em 3,7% de amostras positivas no queijo tipo "Gorgonzola"; 6,4% de amostras positivas no queijo tipo "Taleggio" e 5,6% de amostras positivas no queijo tipo "Itálicas". A bactéria estava também presente em 12,5% dos "swabs" de superfícies dos equipamentos empregados na elaboração dos queijos CANTONI *et al.*, (1988b). A *L. monocytogenes* foi isolada em 2% das amostras de queijos macios com pH maior que 5,6 COMI e CANTONI (1988).

Durante um ano, em Ontário, Canadá foi analisado 315 amostras com um total de 11,4% positivas. Em se tratando de espécies, a mais freqüente foi a *L. innocua*, 5,7%, seguida pela *L. monocytogenes*, 5,4%, e pela *L. welshimeri*, 0,3%. Constatou-se que a diferença de estações do ano sobre a presença das diferentes espécies de *Listeria* no leite cru não apresentava valores significativos (SLADE *et al.* 1988).

Na Escócia foi investigada a ocorrência de *L. monocytogenes* em 180 amostras de leite cru de latões. A presença da bactéria oscilou de 3,8% no verão para 1,0% no outono. Não foi observada a correlação entre a presença do microrganismo e as condições higiênicas de obtenção da matéria prima ou a silagem empregada na alimentação dos animais (FENLON; WILSON, 1989).

Na Itália, utilizando-se de ensaio imunoenzimático, obteve-se resultado positivo para *L. monocytogenes* em 14 das 375 amostras de queijo Gorgonzola, em 14 das 216 amostras de queijo Taleggio e em 5 das 95 amostras de queijo Itálico. Não foi obtido resultado positivo para o microrganismo a partir da análise de 1150 amostras de outros tipos de queijos. Houve positividade em 9 dos 72 "swabs" de superfícies e equipamentos de manufatura de queijos (CANTONI *et al.*, 1989).

No Canadá, 14 amostras de leite pasteurizado apresentaram-se negativas para a presença de *L. monocytogenes*. Somente 2 amostras foram positivas entre as 530 amostras analisadas de produtos para sorvete (FARBER *et al.*, 1989).

Na Irlanda foram testadas 589 amostras de leite cru de 70 fazendas durante 13 meses, entre 1989 e 1990. Os resultados mostram que *Listeria spp.* foi isolada de (49) 8,3% das amostras; *L. monocytogenes* de (29) 4,9% e *L. innocua* de (20) 3,4% (REA *et al.*, 1992).

Na província de Bologna, Itália foi analisada durante um período de 21 meses, 20 amostras de manteiga, 40 amostras de leite cru e 121 amostras de queijos macios produzidos tanto por pequenos como por grandes produtores, divididos em 2 categorias, queijos com curto período de maturação e queijos com período de maturação de algumas semanas. *L. monocytogenes* não foi isolada a partir das 40 amostras de leite cru, das 20 amostras de manteiga, tão pouco das amostras de queijos de pouca maturação, porém destes últimos, isolou-se *L. innocua* de 1 amostra do produto de pequenos produtores e também a partir de 1 amostra de grandes produtores. Quanto aos queijos de longa maturação, *Listeria monocytogenes* foi isolada de 2 amostras do produto de pequenos produtores, sendo que o isolamento só foi possível a partir da casca, mas não do núcleo do queijo. Nenhuma amostra foi positiva para *L. innocua* (MASSA *et al.*, 1990).

De um total de 252 amostras de leite cru provenientes de tanques de armazenamento das fazendas, foi verificado que apenas 10 amostras (4%) estavam contaminadas com *Listeria spp.*, sendo que 4 amostras (1,6%) abrigavam *L. monocytogenes* e 6 amostras (2,0%) abrigavam *L. innocua*. Por outro lado, a partir de 15 amostras de leite provenientes de tanques de plantas processadoras, obtiveram 4 amostras (26,6%) contaminadas com *L. monocytogenes* e 1 amostra contaminada com

L. innocua. Das 8 amostras de creme cru analisadas, 2 estavam contaminadas com *L. innocua* e nenhuma delas abrigava *L. monocytogenes* (TIWARI; ALDENRATH, 1990b).

Por outro lado, leites e queijos comercializados no varejo em Campinas, São Paulo, obtiveram um percentual de positividade de 12,5% para *Listeria*. As amostras de leite pasteurizado tipo "B" e "C" foram negativas para o microrganismo. Entretanto, as de leite cru tipo "B" e queijo Minas Frescal foram, no conjunto, 5,0% positivas para *L. monocytogenes*, 20% para *L. innocua*, 2,5% para *L. seeligeri* e 2,5 % para *L. welshimeri* (DESTRO, 1990).

Durante um período de 6 meses, foram analisadas 100 amostras de queijos tipo hispânico, produzidos e comercializados ilegalmente na Califórnia. Foram encontradas 2 amostras positivas (2,0%) para *L. monocytogenes* e 2 positivas para *L. innocua* (GENIGEORGES *et al.*, 1991).

Foi realizado um estudo comparativo de métodos para o isolamento de *Listeria* do leite cru, o qual envolveu diferentes combinações de meios de enriquecimento e plaqueamento. Foram analisadas 300 amostras do produto, sendo que *L. innocua* foi isolada de 77 amostras (26%), *L. monocytogenes* de 9 amostras (3,0%) e *L. welshimeri* de 5 amostras (1,7%) (LUND *et al.*, 1991),

No Brasil, não foi isolada *Listeria spp.* a partir da análise de 20 amostras de leite pasteurizado. Foram também analisadas 20 amostras de leite cru, os autores obtiveram isolamento somente de *L. innocua* em 2,0% das amostras, e da análise de 20 amostras de queijo Minas Frescal, obtiveram 40,0% de positividade para *Listeria. spp.*, sendo *L. innocua*. 30,0%, *L. monocytogenes* 10,0%, *L. seeligeri* 5,0% e *L. welshimeri* 5,0% (DESTRO *et al.*, 1991),

Na Noruega foram analisadas 90 amostras de queijo macio importado, encontrando 10 amostras (11,0%) positivas para *L. monocytogenes*. A contaminação pode ter ocorrido principalmente durante o manuseio do produto nos estabelecimentos de venda, já que 7 das 10 amostras positivas foram adquiridas num mesmo estabelecimento (RORVICK; YNDESTAD, 1991).

Amostras ambientais de usinas de leite de Vermont - EUA foram analisadas. Isolou-se *L. innocua* em 16,1% das amostras e *L. monocytogenes* em 1,4% (KLAUSNER; DONNELLY, 1991).

Um estudo foi desenvolvido para verificar a ocorrência das espécies de *Listeria* em vários produtos lácteos produzidos na Irlanda do Norte, através de 3 diferentes procedimentos de detecção. Durante um período de 1 ano foram analisadas 176 amostras de leite cru, 95 amostras de leite pasteurizado e 33 amostras de queijo macio, adquiridas em centros de processamento e em fazendas. Das amostras de leite cru, 27 (15,3%) continham *L. monocytogenes*, 18 (10,2%) continham *L. innocua* e 5 (2,8%) *L. seeligeri*. Das 95 amostras de leite pasteurizado examinadas, somente 1 (1,05%) foi positiva para *L. monocytogenes*; e das 33 amostras de queijo macio, 1 (0,3%) foi positiva para *L. seeligeri* (HARVEY; GILMOUR, 1992),

No Brasil, realizou-se um levantamento da incidência de *Listeria spp.* em 440 amostras de leite cru e pasteurizado, sendo 110 amostras de leite cru tipo C, 110 amostras de leite cru tipo B, 110 amostras de leite pasteurizado tipo C e 110 amostras de leite pasteurizado tipo B, todas provenientes de uma usina de beneficiamento da cidade de São Paulo. Do leite cru tipo C, isolou-se *L. monocytogenes* de 12,7% das amostras, *L. innocua* de 13,6% e *L. welshimeri* de 1,8%. Do leite cru tipo B, isolou-se *L. monocytogenes* de 6,4% das amostras, *L. innocua* de 5,4% e *L. grayi* de 0,9%. Com relação à análise das amostras do leite pasteurizado tipo C, não foi obtido positividade para *Listeria spp.*. Por outro lado, *L. innocua* foi isolada a partir de 1,8% das amostras de leite pasteurizado tipo B (MOURA, 1992).

No Marrocos foram examinadas 227 amostras de leite e derivados, produzidos no país e importados, para a presença de *L. monocytogenes*. Obteve-se 10% de positividade para as amostras de leite cru, 10 e 6% para as amostras dos leites fermentados Raib e Iben, e 18% para as amostras de queijo tradicional sendo que uma destas amostras de queijo tradicional continha também *L. innocua* (EL MARRAKCHI *et al.*, 1993).

Em Piracicaba - São Paulo, não se detectou pela metodologia desenvolvida basicamente para produtos lácteos por Lovett e revisada por Lovett e Hitchins a presença de *Listeria monocytogenes* ou outra espécie do gênero em nenhuma das 20 amostras de queijo Minas Frescal comercializadas nessa cidade (CASAROTTI; GALLO; CAMARGO, 1994).

Na Suécia, foram examinadas 333 amostras de retalhos de queijo macios e

semi-macios produzidos no país e importados, para a presença de *L. monocytogenes*. Obteve-se a positividade de 6% para as amostras de queijo. Esse microrganismo foi somente encontrado nos queijos importados (18 da França, e um da Alemanha e Itália). O número de *L. monocytogenes* variou de $< 1 \times 10^2$ para 1×10^5 UFC/g. As cepas isoladas pertenciam ao sorogrupo 1/2 com exceção das isoladas de duas amostras que pertenciam ao sorogrupo 4 (LONCAREVIC *et al.*, 1995).

Foram analisadas 18 amostras do queijo tipo “Cameros”, um queijo Espanhol Frescal produzido a partir de leite de cabra, provenientes de quatro produtores diferentes e obtiveram a incidência de 5,6% de *L. monocytogenes*. Foi associada à presença deste microrganismo, com contaminação pós-pasteurização ou pós-processamento, haja vista que foi utilizado leite pasteurizado no preparo destes queijos (OLARTE *et al.*, 1999).

Na Argentina foram analisadas 35 amostras de queijo provenientes de gôndolas de supermercados de venda direta ao público e constatou-se o isolamento de quatro cepas de *Listeria monocytogenes* correspondendo ao sorotipo 4 (11,4%) (COPES *et al.*, 2000)

Foi investigada a qualidade microbiológica do leite *in natura* e na linha de produção (leite recém-pasteurizado e leite ensacado), de uma usina de beneficiamento em Campina Grande - PB, Brasil. Observou-se que 33 (73,3%) das amostras de leite cru e 9 (30%) das de leite pasteurizado estavam contaminadas com *Listeria* spp., identificadas *L. monocytogenes* em 17 (51,5%) amostras de leite cru e em 9 (100%) de leite beneficiado (4 recém-pasteurizadas e 5 ensacadas) (CATÃO; CEBALLOS, 2001). Por outro lado, pesquisando *Listeria* spp em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil não se detectou a ocorrência dessa bactéria em 250 amostras (PADILHAT *et al.*, 2001).

Foi desenvolvido um estudo para verificar a ocorrência das espécies de *Listeria* em vários tipos de queijos europeus com manchas vermelhas e obtiveram 15,8% das amostras contaminadas com o gênero *Listeria* sendo 6,4% *Listeria monocytogenes*, 10,6%, *Listeria innocua*, 1,2% *Listeria seeligeri*. Seis amostras de queijo continham duas ou mais espécies de *Listeria*, incluindo pelo menos um isolado de *Listeria monocytogenes* (RUDOLF; SCHERER, 2001).

Em vinte e quatro amostras com 2 a 3 semanas de produção do queijo tipo “Tetilla” produzido com leite bovino cru foi detectado *Listeria monocytogenes* em duas amostras (MENENDEZ *et al.*, 2001).

Trinta e quatro amostras de queijos vendidos em Portugal, 24% estavam contaminadas com *Listeria monocytogenes* e 44% com outras espécies de *Listeria* (GUERRA; MCLAUCHIN; BERNARDO, 2001).

Também em 2001, foi detectada a ocorrência de 0,8% de *Listeria monocytogenes* em 256 amostras de queijo macio no Chile (CORDANO; ROCOURT 2001).

Foi constatada a presença de *Listeria* spp em cinco amostras analisadas provenientes de pequenas usinas de fabricação de queijo tipo colonial produzido no sudoeste do estado do Paraná e coletadas em balcões frigoríficos de supermercados da mesma cidade (LUBECK *et al.*, 2002).

Duzentas e vinte e duas amostras de queijos macios procedentes do Reino Unido e de outros países foram analisadas. Em 10% das amostras foram detectadas *L. monocytogenes* em níveis de $< 10^2$ UFC/g a 10^5 UFC/g. A incidência dos queijos de vários países foi à seguinte: Itália (16%), França (14%), Chipre (10%) e Reino Unido (4%). Somente 2 sorotipos (1/2 e 4 b) foram isolados. Algumas amostras continham também *L. innocua* que foi a única outra espécie encontrada (PINI; GILBERT, 2002).

Em 2003 realizou-se um trabalho sobre a ocorrência de *Listeria* spp em pontos críticos de controle e no ambiente de processamento de queijo Minas Frescal. Foram identificados como pontos críticos para a produção deste queijo a recepção do leite cru, pasteurização, coagulação e armazenamento, foram detectadas na fábrica B a presença de *L. monocytogenes* a partir do leite cru (16,7%) e do chão da sala do refrigerador de queijos (14,3%) (SILVA *et al.*, 2003).

Em 24 amostras de queijo produzidos no Estado do Rio Grande do Norte (Brasil) foi detectada *Listeria* spp em 9% e 15% das amostras de queijos de coalho e manteiga respectivamente, pelo teste de ELISA, mas a presença de *L. monocytogenes* não foi confirmada pelo método convencional (FEITOSA; BORGES; NASSU, 2003)

Também em 58 amostras de queijo artesanal tipo coalho comercializado na cidade de Manaus foi detectada *Listeria* spp em duas amostras (3,4%), *L.*

monocytogenes (soro variedade 1/ 2 b) foi identificada em uma amostra coletada na zona centro-sul de Manaus (RAMOS; COSTA, 2003).

Foi verificada a qualidade higiênico-sanitária de amostras de queijo de coalho (11 amostras) e de queijo de manteiga (13 amostras) oriundos de seis microrregiões do Rio Grande do Norte e constatou-se que 9% e 15% destas, respectivamente, continham *Listeria* spp (FEITOSA *et al.*, 2003).

Um estudo sobre a ocorrência de *Listeria monocytogenes* em alimentos frescos e processados em Navarra (Espanha) obteve de 99 amostras analisadas de queijo macio, o percentual positivo de 1% para *Listeria monocytogenes*, 6,1% para *Listeria innocua* e 1,0 % para *Listeria grayi* (VITAS; AGUADO; GARCIA-JALON, 2004).

Em 2005, foi relatado um estudo realizado em 1995-1996 com 63 amostras de queijo macio produzido em Portugal na Província de Beira Baixa utilizando método tradicional de preparo do queijo e com leite de ovelha cru. Os autores obtiveram o isolamento de *Listeria* sp em 47 amostras (75%) tendo sido isolado *L. monocytogenes* em 29 (46%) e *L. innocua* em 18 (29%). Dos 24 isolados de *L. monocytogenes* 20 pertenciam a sorotipo 4b, três ao sorotipo 1/2b e um ao sorotipo 1/2a (PINTADO *et al.*, 2005).

Um estudo realizado durante o período de março de 2004 a março de 2005 obteve 6 amostras positivas para *L. monocytogenes* em um universo de 250 amostras de queijo Tulum que é produzido a partir de leite cru e é considerado um dos mais populares queijos semiduros na Turquia (COLAK *et al.*, 2007).

Listeria spp foi detectada em 11,8 % de em 93 amostras de queijo minas Frescal que foram processadas por 3 processos industriais (adição de cultura láctea, acidificação direta com ácido láctico e ultra-filtração). Essas amostras foram coletadas em supermercados de Campinas (São Paulo). *L. monocytogenes* foi encontrada em 42,9 % de 7 amostras de queijo obtidas pelo processo de acidificação direta. *L. innocua* foi isolada em 57,1% das amostras restantes. Nas amostras processadas com a adição de cultura láctica, foram isoladas somente *L. innocua* (12,9%). E, nas obtidas pelo processo de ultra filtração não foi detectada *Listeria* spp (CARVALHO *et al.*, 2007).

Recentemente, dez casos de listeriose foram detectados numa região do nordeste da Suíça durante um período de oito semanas. Eram oito pacientes

imunodeprimidos com bacteremia (três óbitos) e duas mulheres grávidas que tiveram um aborto séptico. Todos os casos eram devidos ao sorotipo 1/2a. Entrevistas com os pacientes revelaram que um queijo tenro chamado “tomme”, fabricado e distribuído localmente, foi à fonte alimentar implicada no surto. *Listeria monocytogenes* 1/2a do mesmo tipo foi identificado nas amostras do queijo, como também na manteiga fabricada na mesma leiteria, em quantidades de 10^3 - 10^4 e 10 - 10^2 UFC/g, respectivamente (BILLE *et al.*, 2006).

3.8 OCORRÊNCIA DE *L. monocytogenes* EM OUTROS PRODUTOS

3.8.1 Produtos cárneos

Em amostras de retalhos de carne crua de gado em maio de 1987, no Canadá, foi evidenciado que em 50 amostras, 45 (90%) continham *Listeria spp.* e 29 (58%) *L. monocytogenes*. Da mesma forma na Dinamarca, detectou-se a incidência de *Listeria* em 67 amostras, coletadas em açougues e supermercados. *Listeria spp* foi encontrada em 45 (67%) amostras e *L. monocytogenes* em 19 (28%) amostras (TRUSCOTT; MCNAB, 1988, SKOVGAARD; MORGEN, 1988)

Num estudo similar, determinou-se a incidência de *Listeria* em 51 amostras de carne crua de porco, obtidas em matadouros e açougues. Os resultados mostraram que *Listeria spp* foi encontrada em 32 (64,7%) amostras, com 11,8% das amostras positivas para *L. monocytogenes* e 51 % para *L. innocua* (SKOVGAARD; NORRUNG, 1989).

Assim como no leite cru, a *L. innocua* foi isolada de carne de bovino e suíno com igual ou maior frequência do que *L. monocytogenes*, sugerindo que ambos os organismos podem ocupar nichos similares em abatedouros e no meio ambiente das indústrias de processamento da carne. Portanto, a presença de *L. innocua* em carne crua pode ser indicativa de possível contaminação com *L. monocytogenes* (RYSER; MARTH, 1991).

Os níveis de *L. monocytogenes* em carnes geralmente são inferiores a 10^3 UFC/g. Isso demonstra que a maioria dos alimentos está contaminada, mas sempre em níveis baixos (FARBER; PETERKIN, 1991).

3.8.2 Outros produtos de origem animal

Verificou-se que o processo normal utilizado para fabricar "pepperoni" (tipo de salame apimentado), não foi eficiente para eliminar a *L. monocytogenes* quando o organismo estava inicialmente presente apresentando a contagem de 7×10^4 UFC/grama de massa de "pepperoni". O aquecimento do "pepperoni" a temperatura de 51,7°C por 4 horas, imediatamente após a fermentação, reduziu a população da bactéria, mas não a eliminou completamente (GLASS; DOYLE, 1989).

Em uma pesquisa realizada na Austrália, a *Listeria spp.* estava presente em 33 das 205 amostras de vários produtos de origem animal e superfícies de contato com alimentos nas indústrias. *L. monocytogenes* estava presente em 10 (4,9%), *L. innocua* em 22 (10,7%) e *L. welshimeri* em 1 amostra (SENEVIRATNA *et al.*, 1990).

Em Queensland, Austrália, 342 amostras de produtos prontos para o consumo, como presunto, salame, bacon, rissole de carne, nos quais se isolou *L. monocytogenes* em 45 amostras (13,2%), *L. innocua* em 82 amostras (24,0%), *L. welshimeri* em 4 amostras (1,2%) e *L. seeligeri* em três amostras (0,9%) (VARABIOFF, 1992).

Em Bologna, na Itália, inocularam *L. monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* em manteiga magra e observou-se que houve crescimento dos patógenos em taxas mais elevadas do que a microflora natural do produto e que *L. monocytogenes* mostrou uma melhor aptidão para proliferar na manteiga do que *Yersinia enterocolitica* (LANCIOTTI *et al.*, 1992).

L. monocytogenes foi detectada acima de 10^5 UFC/g em 5,8% das amostras de embutidos tipo "frankfurter" fatiados e embalados a vácuo, e entre 10^2 - 10^4 UFC/g, em 70% (SCHMIDT; KAYA, 1990, *apud* SCHMIDT, 1995).

Em 175 amostras de 8 tipos diferentes de produtos cárneos comercializados em nove províncias da comunidade autônoma de Castilha e León (Espanha) foi isolada *Listeria monocytogenes* em 11,4% das amostras (GÓMEZ; CAMPILLO; DOMÍNGUEZ-FERNANDEZ; SUMALACÁRREGUI; RODRIGUEZ; 1999).

Foi pesquisada a presença de *L. monocytogenes* em 30 amostras de mortadela comercializadas na cidade de São Paulo, observando-se uma incidência de 36,7% para *Listeria spp.* e de 26,7% para *L. monocytogenes* (BERSOT *et al.*, 2001).

Listeria spp foi pesquisada no processamento de lingüiça Frescal em três frigoríficos com inspeção sanitária estadual, em Pelotas, RS, Brasil. Foram analisadas matéria-prima utilizada no preparo da lingüiça, os equipamentos da linha de produção e o produto final. *Listeria* spp. foi isolada em 100% das 41 amostras analisadas, nos 3 estabelecimentos estudados. Dentre as diferentes espécies, *L. innocua* foi aquela isolada com maior freqüência, em 97,6% das amostras, seguida por *L. monocytogenes* em 29,3% e *L. welshimeri* em 24,4%. A presença destes microrganismos nas amostras analisadas, em especial no produto final, demonstra a necessidade de readequação nas práticas de limpeza e sanificação das plantas de processamento, bem como representa risco potencial de listeriose ao consumidor (SILVA *et al.*, 2004).

Foi verificada a ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos pela análise de 106 amostras de cinco tipos diferentes de lingüiças (de carne suína, de carne de frango, tipo calabresa, mista e tipo toscana). A presença de *Listeria* spp. foi evidenciada em 62 amostras (58,5%) e *L. monocytogenes* em 11 amostras (10,4%). A maior ocorrência de *L. monocytogenes* foi na lingüiça de carne de frango (18,2%) (LIMA; ROSSINI; POPERMAYER, (2003).

Avaliou-se a multiplicação de *L. monocytogenes* naturalmente presente em mortadelas fatiadas, embaladas a vácuo e estocadas a 5°C durante sua vida de prateleira. O teste Tukey indicou que as populações de *L. monocytogenes* nos tempos 10, 20, 30 e 40 dias diferiram significativamente ($p < 0,05$) indicando multiplicação durante o armazenamento. Em três repetições, o aumento médio foi de 1,80 ciclos log. A embalagem a vácuo e estocagem sob refrigeração não foram suficientes para o controle da multiplicação de *L. monocytogenes* em mortadelas fatiadas, indicando que as boas práticas de fabricação e um sistema HACCP implantado são fundamentais para assegurar a segurança desse produto (BERSOT, 2008).

3.8.3 Aves e ovos

Em Ottawa, Canadá, *L. monocytogenes* foi isolada em 9 de 16 (56,3%) pernas de galinha, 38 de 44 (86,4%) amostras de carnes e 6 de 30 (20%) salames fermentados (FARBER *et al.*, 1989b).

Entre junho de 1988 e maio de 1989, foram conduzidas duas grandes pesquisas para verificar a incidência de *Listeria spp.* em galinhas e em cortes frescos e semicongelados de perus obtidos em abatedouros. De acordo com os resultados obtidos nos produtos frescos, 12,5% de asas, 16% de pernas e 15% de fígados, adquiridos em três supermercados no norte da Califórnia, continham níveis detectáveis de *L. monocytogenes*. A *L. innocua* foi, duas ou mais vezes, prevalente do que *L. monocytogenes* nos tecidos, com exceção de fígado de galinha. No total, a incidência mais alta de *Listeria spp.* foi observada em pernas (54%), seguida por asas (42,5%) e fígados frescos de aves (32,5%). Em contraste, somente 10% dos produtos semi-congelados continham *Listeria spp.* (GENIGEORGIS *et al.*, 1989 e 1990).

Em um estudo realizado em 1989, no sudeste dos Estados Unidos, *Listeria spp.* foi isolada em 34 das 90 (38%) carcaças de galinhas amostradas, sendo que *L. monocytogenes* foi isolada em 21 das 90 (23%) carcaças (BAILEY *et al.*, 1989).

O isolamento de *L. monocytogenes* de ovos intactos ainda não foi documentado, porém isolou-se o patógeno nos EUA em 15 das 42 (36%) amostras congeladas de ovo cru (LEASOR; FOEGEDING, 1989).

Foram analisadas 40 amostras de carne de peru, divididas em 4 grupos de 10: blanquet inteiro, blanquet fatiado, presunto inteiro e presunto fatiado, todas produzidas sob Inspeção Federal e comercializadas em estabelecimentos varejistas da cidade de Niterói-RJ e observaram nos produtos fatiados, uma alta incidência de bactérias do gênero *Listeria*, da ordem de 80% em blanquet e de 90% em presunto, contrastando com a ausência nos inteiros. Os isolados de *L. monocytogenes* pertenciam aos sorotipos 4b, 1/2c, 1/2 b e 1/2a (ARAUJO *et al.*, 2002).

3.8.4 Pescados

Muitas espécies aquáticas, incluindo peixe, ostra, camarão, siri e lagosta são fontes potenciais de *L. monocytogenes* na dieta humana. Em 1987, nos Estados Unidos, a *L. monocytogenes* foi registrada em 5-6% da carne de siri cozida importada e comercializada (RYSER; MARTH, 1991).

Comprovou-se que a *L. monocytogenes*, inoculada em salmão defumado, refrigerado e embalado a vácuo, cresceu dentro do prazo de vida útil do produto nas condições normais de armazenamento (HUDSONI-MOTT, 1993).

Foi realizada uma avaliação quantitativa de *L. monocytogenes* em surubim (*Pseudoplatystoma* sp) fresco e processado utilizando-se a técnica do NMP. A população de *L. monocytogenes* foi estimada como < 0.012 NMP/cm² do peixe fresco e < 0.03 NMP/g do peixe minimamente processado (SOUZA *et al.*, 2008).

Avaliou-se a incidência e disseminação de *L. monocytogenes* em 415 amostras de salmão gravlax obtidas de diferentes etapas de processamento de uma indústria localizada no Estado de São Paulo. A presença de *L. monocytogenes* foi confirmada em amostras de salmão (41%), superfícies de contato (32%) e não contato (43%) e manipuladores (34%), porém não se isolou o microrganismo em nenhum ingrediente. Do total de cepas isoladas, 179 destas foram escolhidas aleatoriamente e submetidas a sorologia e tipagem por PFGE. A maioria dos isolados pertenceu ao sorogrupo 1 (73%), sendo identificados 61 pulsotipos quando se combinou os resultados de sorologia e PFGE e 6 clusters foram distribuídos em um dendrograma. O cluster A agrupou a maioria das cepas (120). Pode-se sugerir que as cepas foram introduzidas na linha de processamento por meio da matéria prima e contaminando o produto final. Estes resultados indicam que a eliminação de *L. monocytogenes* deste estabelecimento requer um grande esforço, ainda que o microrganismo não se multiplicou no produto final estocado a 4°C por 90 dias (CRUZ *et al.*, 2008).

3.8.5 Vegetais

No Reino Unido foi detectada *L. monocytogenes* em 4 de 60 saladas pré-embaladas prontas para o consumo (incluindo brotos de feijão, saladas de hortaliças mistas e saladas contendo nozes e frutas). Foi verificado também o aumento das populações de *L. monocytogenes*, naturalmente presentes em alguns tipos de salada, após 4 dias de armazenamento sob refrigeração (SIZMUR; WALKER, 1988).

A incidência de *Listeria* spp., incluindo a de *L. monocytogenes* em 10 diferentes variedades de vegetais crus não lavados (HEISICK *et al.*, 1989a) em um total de 1000 amostras obtidas em 2 supermercados da área de Mineápolis, entre outubro de 1987 e agosto de 1988, *Listeria* spp. foram detectadas em uma ou mais amostras de alface, repolho, pepino, cogumelo, batata, radite, mas não em brócolis, cenoura, couve-flor e tomate. A incidência foi: *L. monocytogenes* (5%), *L. innocua* (2,6%), *L. welshimeri* (0,8%) e *L. seeligeri* (1,3%). Os vegetais que apresentaram maior incidência de *Listeria* spp e *L. monocytogenes* foram à batata e o radite. HEISICK *et al.*, (1989b), usaram quatro procedimentos diferentes e identificaram *Listeria* spp Em 19 das 70 (27,1%) amostras de batata e em 25 das 68 (36,8%) amostras de radite, porém não detectaram em cogumelos, repolho, brócolis, couve-flor, alface, tomate e pepino obtidos nos dois supermercados de Mineápolis. Cenoura crua mostrou algum tipo de atividade antilisterial inerente, que foi eliminada com o cozimento (BEUCHAT; BRACKETT, 1990, NGUYEN-THE; LUND, 1992).

Na Irlanda do Norte, foi relatado que de 85 amostras de saladas de vegetais e saladas preparadas analisadas, 7 continham *L. monocytogenes*. Os autores sugerem que a contaminação foi devido à manipulação imprópria e não oriunda do produto “in natura” (HARVEY; GILMOUR, 1993).

Saladas de hortaliça foram examinadas nos Estados Unidos. Das 63 amostras analisadas, *L. monocytogenes* foi encontrada em 1 (1,6%) amostra de salada contendo alface americana, repolho roxo, cenouras, pepinos e tomates (LIN *et al.*, 1996).

Um estudo para avaliar a qualidade de salada de repolho foi realizado na Costa Rica. Os autores verificaram que, das 50 amostras avaliadas, *L. monocytogenes* estava presente em 10 (20%) (MONGE; ARIAS, 1996).

No Canadá, foram analisadas tanto amostras de vegetais não-processados quanto prontos para o consumo e constou uma frequência de 6,1% de *L. monocytogenes* nos produtos minimamente processados (ODUMERU *et al.*, 1997).

Um trabalho de investigação da ocorrência de *Listeria* spp. em 2 tipos (americano e europeu) de saladas de vegetais minimamente processados, embalados em polipropileno, foi realizado na Venezuela. Os resultados revelaram que *Listeria* sp. estava presente em 37,5% nas saladas do tipo europeu e em 25%, nas do tipo americano (DIAZ *et al.*, 1998).

Na Dinamarca foram examinadas 350 amostras de brotos de vegetais cortados e constaram uma alta ocorrência de *L. monocytogenes*. Segundo os limites estabelecidos naquele país, populações de *L. monocytogenes* entre 10 e 100 UFC/g são consideradas insatisfatórias e > 100 UFC/g não são aceitáveis. Dentre as amostras examinadas, 23% estavam em condições insatisfatórias (NÉORUNG *et al.*, 1999).

No Brasil, foram analisadas 101 amostras de alface e 149 amostras de outros vegetais, coletadas em diferentes épocas do ano. Os resultados revelaram baixa contaminação (3,2%) por *L. monocytogenes*, detectando-se o microrganismo em amostras de alface, salsa e agrião (PORTO; EIROA, 2001).

Em Portugal, analisaram 37 amostras de frutas e hortaliças prontas para o consumo e de hortaliças “in natura”, e não encontraram *L. monocytogenes* nas amostras (GUERRA *et al.*, (2001). Da mesma forma, nos Estados Unidos, também não foi detectada *L. monocytogenes* em amostras de vegetais comercializados frescos ou congelados (PETRAN *et al.*, 1988).

Outro estudo com resultados semelhantes foi realizado no Canadá. *Listeria* spp. não foi encontrada nas 110 amostras de vegetais “in natura”, incluindo alface, aipo, tomate e rabanete (FARBER *et al.*, 1989).

Na Índia, foram examinadas 116 amostras de vegetais diversos, não isolaram *L. monocytogenes* nas saladas analisadas prontas para o consumo (PINGULKAR *et al.*, 2001).

Na Espanha, foi pesquisada a presença de espécies de *Listeria* em 40 amostras de alface e espinafre, 20 “in natura” e 20 prontas para o consumo. Os resultados revelaram uma frequência de 30% de *L. grayi* e *ivanovii*, 20% de *L. seeligeri* e 10% de *L.*

monocytogenes nas amostras de alface “in natura”. Nas amostras de alface pronta para o consumo, verificou-se a presença de *L. grayi* em 30%; *L. ivanovii* e *L. monocytogenes* em 10%. No espinafre “in natura”, *L. grayi* foi detectada em 10% das amostras e o gênero *Listeria* não foi encontrado no produto pronto para o consumo (SORIANO *et al.*, 2001).

Na Noruega, foram avaliadas 200 amostras de diferentes tipos de alface e 100 amostras de saladas pré-cortadas. *L. monocytogenes* estava presente em 1 (0,5%) amostra de alface e, nas saladas, o microrganismo não foi encontrado. Os pesquisadores sugerem que a ausência de *L. monocytogenes* em certos produtos pode ser atribuída ao pouco contato da planta com o solo (JOHANNESSEN, *et al.*, 2002).

Amostras prontas para o consumo também foram analisadas por Sagoo *et al* (2003a,b) no Reino Unido. Os resultados nos dois estudos revelaram uma baixa ocorrência de *L. monocytogenes*, que variou entre 2,3 e 3% do total de amostras (2950 e 3852, respectivamente).

No Brasil, *L. monocytogenes* foi avaliada pelo sistema automatizado BAX System e, paralelamente, a semeadura do caldo de enriquecimento foi realizada em placas contendo ágar Palcam e Oxford, com a identificação das colônias suspeitas pelos testes bioquímicos convencionais em 181 amostras de saladas minimamente processadas, coletadas em diferentes estabelecimentos comerciais, no município de São Paulo, SP. *L. monocytogenes* estava presente em 1 (0,6%) amostra de espinafre das 181 amostras examinadas, tendo sido detectada, simultaneamente, por ambos os métodos empregados. As outras espécies de *Listeria* encontradas empregando-se a semeadura em placa foram: *L. welshimeri* (1 amostra de alface mimosa) e *L. innocua* (2 amostras de agrião) (FRÖDER, 2005).

3.9 METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA O ISOLAMENTO DE *Listeria* spp.

Os resultados dos estudos críticos de comparação auxiliaram a escolha de um método adequado para detectar *Listeria* spp. em vários alimentos (FARBER; PETERKIN, 1991).

As metodologias para o isolamento de *L. monocytogenes* ainda estão em fase de aperfeiçoamento. Estas metodologias utilizadas observam que a população do patógeno está geralmente em baixos níveis quando comparada ao da microbiota natural (HITCHINS; TRAN, 1990). Assim, a metodologia aplicada deve possibilitar a detecção de pelo menos uma célula viável de *L. monocytogenes* em produtos prontos para consumo ante o potencial de multiplicação do patógeno durante longos períodos de estocagem em temperatura de refrigeração (KNABEL, 2002).

Os métodos laboratoriais atualmente empregados para a análise microbiológica de alimentos e produtos relacionados podem ser classificados em “convencionais” e “rápidos”. Embora apresentem diferenças marcantes em vários aspectos, ambos tem as mesmas finalidades, ou seja, investigar presença ou ausência de determinados grupos de microrganismos ou de seus metabólitos de interesse ou identificar as diferentes espécies microbianas presentes. Os métodos chamados “convencionais” recebem essa denominação porque foram desenvolvidos há muitos anos, alguns há quase 100 anos, e durante muito tempo foram empregados como métodos oficiais nos laboratórios de microbiologia de alimentos. Grande parte desses métodos continua a ser empregados até hoje. Esses métodos estão descritos em publicações consideradas de referência, internacionalmente aceitas. Para a contagem de microrganismos são de dois tipos: o de semeadura em placas para contagem de colônias e o método do Número Mais Provável. Para a detecção de microrganismos patogênicos pelos métodos convencionais normalmente é empregada uma ou mais etapas de pré-enriquecimento em meio líquido não seletivo ou pouco seletivo, uma etapa de enriquecimento seletivo em meios contendo inibidores da microbiota acompanhante, semeadura em meios sólidos seletivos e diferenciais e identificação bioquímica e sorológica das colônias suspeitas. Em alguns casos, é ainda necessário a pesquisa de fatores de virulência, como por exemplo, capacidade de produzir toxinas, de invadir células, etc. Do ponto de vista laboratorial, as principais características dos métodos convencionais são a necessidade de muito material (vidraria, meios de cultura, reagentes, incubadoras, banhos, etc), muito trabalho, longo tempo para a obtenção de resultados e a grande possibilidade de erro, tanto durante a execução da análise quanto durante a leitura e interpretação dos resultados. Esses métodos requerem mão de obra especializada, com

vivência e experiência microbiológica (FRANCO; 2006). Exemplos deste procedimento são os métodos preconizados ou validados pelo “United States Department of Agriculture” (USDA), “Food and Drug Administration” (FDA), AOAC, ou “American Public Health Association” - APHA (HARMON,2002; ARAGON-ALEGRO, 2004). Assim, a pesquisa de *Listeria monocytogenes* em alimentos pode levar de cinco a dez dias, o que é muito importante particularmente para alimentos com vida pequena de prateleira, pois pode retardar a liberação dos lotes produzidos (VAZ-VELHO *et al.*, 2000) ou são freqüentemente comercializados antes que os resultados dos testes sejam obtidos (CANDRIAN; 1995). Algumas vezes, os resultados negativos não refletem a realidade, pois as células de *Listeria* presentes no alimento podem apresentar injúria subletal ou estar em números inferiores à microbiota acompanhante. Sabe-se também que o isolamento de espécies não patogênicas de *Listeria* em alimentos, não exclui a possibilidade de *Listeria monocytogenes* estar presente (CURIALE; LEWUS,1994). *Listeria innocua* multiplica-se mais rapidamente que *Listeria monocytogenes*, tanto em meio não seletivo (DUH; SCHAFFNER, 1993) como em meio de enriquecimento seletivo (PETRAN; SWANSON, 1993).

Os métodos “rápidos” surgiram a partir da década de 70, como consequência da necessidade de se abreviar o tempo para a obtenção de resultados analíticos e de se melhorar a produtividade laboratorial. Os métodos rápidos visam também à simplificação do trabalho, a redução de custos e o aumento da sensibilidade e especificidade em relação aos métodos convencionais (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

A obtenção de resultados em um curto período de tempo possibilita intervenções mais rápidas, como eventuais correções no processamento do alimento, a retirada de um lote do comércio e, para produtos frescos, uma comercialização mais rápida (BARBUTI *et al.*, 2000). Dessa forma, há a necessidade de métodos mais rápidos que forneçam informações sobre a provável presença do patógeno na matéria-prima inicial e nos produtos já prontos, tanto para o controle do processo de fabricação como para o monitoramento da limpeza e das práticas higiênicas (INGIANNI *et al.*, 2001). A área de métodos rápidos desenvolve-se rapidamente, com o surgimento constante de novos sistemas e instrumentos, com diversos graus de automação, destinados aos mais variados tipos de análise. Avaliações realizadas no Laboratório de Microbiologia de

Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo têm demonstrado que vários testes não convencionais existentes no mercado, muitas vezes, não são adequados aos produtos alimentícios brasileiros, principalmente devido a interferência da microbiota acompanhante. Dessa forma, a validação desses métodos com produtos alimentícios do país faz-se necessária, antes da sua adoção (ARAGON-ALEGRO,2004). Por razões didáticas os métodos rápidos são subdivididos em dois grandes grupos: métodos rápidos para a contagem de microrganismos e métodos rápidos para a detecção de microrganismos patogênicos e /ou metabólitos.

3.9.1 Metodologias convencionais para o isolamento e identificação de *Listeria monocytogenes*

3.9.1.1 Plaqueamento direto

As primeiras tentativas para isolar *Listeria monocytogenes* de alimentos apresentaram relativo insucesso, uma vez que utilizavam o método de plaqueamento direto em meio ágar convencional (ágar sangue) e foram utilizados alimentos com grandes populações de microflora competidora (BAYLEY *et al.*, 1990). Porém, considerou-se que o plaqueamento direto pode ser utilizado para recuperar células injuriadas ou não de *Listeria monocytogenes*, a partir de alimentos que contenham baixas populações da microflora do alimento. De qualquer forma, a maioria dos meios de isolamento que têm sido desenvolvidos para a recuperação do patógeno, envolve a combinação com um prévio procedimento de enriquecimento (GOLDEN *et al.*, 1988).

O plaqueamento direto permite quantificar *L. monocytogenes* presente no alimento. Não pode ser utilizada na detecção de baixas quantidades de microrganismos (100 UFC/g de alimento). O alimento a ser testado é homogeneizado com solução tampão, e diluições desta mistura são plaqueadas em meios seletivos. Na análise de alimentos como produtos lácteos, carnes e outros alimentos que tenham 100 UFC/g, pode-se realizar contagem de *L. monocytogenes* em Agar Oxford Modificado. As placas são incubadas por 24-48 horas a 30°C. As colônias isoladas neste meio são confirmadas utilizando uma bateria pré-estabelecida de testes (coloração de Gram,

motilidade, CAMP modificado, fermentação do manitol, ramnose e xilose) ou com provas rápidas aprovadas pelas respectivas instituições e organizações.

Vários estudos têm sido realizados com o intuito de avaliar os meios sólidos, quanto à recuperação e contagem de *L. monocytogenes* em alimentos, utilizando-se o método de plaqueamento direto. Foi observado que a eficiência dos meios de cultura depende do tipo de alimento analisado, da população de *L. monocytogenes* e da microbiota acompanhante (LOESSNER *et al.*, 1988; GOLDEN *et al.*, 1988b,c; BUCHANAN *et al.*, 1988; CASSIDAY *et al.*, 1989).

Muitos meios usados no plaqueamento direto não são satisfatórios para recuperar células de *L. monocytogenes* que sofreram danos pelo aquecimento, devido à presença de agentes seletivos (SMITH; ARCHER, 1988).

3.9.1.2 Métodos com meios de enriquecimento

Estes métodos utilizam um ou mais passos de enriquecimento e plaqueamento em um meio seletivo. Em geral, é utilizado um caldo de enriquecimento que é incubado por 24 a 48 horas ao qual segue outro passo de incubação em um caldo de enriquecimento diferente ou em um agar seletivo. A utilização da etapa de enriquecimento da amostra tem por objetivo aumentar a população-alvo do microrganismo, que pode estar em baixos níveis, injuriada ou sub-letalmente danificada (DONNELLY, 2002; SILK *et al.*, 2002). Logo, a detecção do patógeno em produtos alimentares pode ser limitada pela performance do meio de enriquecimento utilizado para a recuperação do microrganismo (SILK *et al.*, 2002).

Entre os primeiros métodos utilizados para a recuperação de *L. monocytogenes* de amostras ambientais e de alimentos está o chamado "enriquecimento a temperatura baixa (4°C)". Este método foi descrito em 1948 por Gray *et al.* (CASSIDAY; BRACKETT, 1989). Estes últimos descreveram uma técnica de enriquecimento a baixas temperaturas (4°C) que melhorou, em muito, o índice de isolamento da bactéria. Esta técnica tem comprovado sucesso na recuperação de *L. monocytogenes* em amostras com elevada carga de microrganismos nativos, tais como, espécimes biológicos e alimentos (DOYLE; SCHOENI, 1986; DOMINGUEZ *et al.*, 1984; HAYES *et al.*, 1986;

FARBER *et al.*, 1987). O método consiste na inoculação das amostras, suspeitas de contaminação, em caldo nutriente e armazenamento a 4°C. Uma porção da amostra é plaqueada em meio ágar seletivo, incubada por 24 horas. Se colônias de *Listeria* não forem isoladas, novas porções da amostra mantida em refrigeração são plaqueadas semanalmente (GRAY; KILLINGER, 1966). O método tem como fundamento a natureza psicrófila da bactéria e inoculação desta em caldo nutriente. Apesar de eficiente, este procedimento tem a desvantagem de requerer um período de incubação prolongado (podendo chegar a 3 meses, não sendo adequado para situações onde se necessita de resultados rápidos, como investigações epidemiológicas de surtos, análise de alimentos suspeitos, e monitoramento de rotina de alimentos perecíveis e não-perecíveis (SWAMINATHAN *et al.*, 1988).

Mais recentemente, a incorporação de agentes seletivos e diferenciais aos meios de enriquecimento, os quais devem inibir o crescimento de outros microrganismos que não a *Listeria* spp. mostrou-se vantajosa em relação ao enriquecimento a temperaturas baixas, já que o período de enriquecimento pode ser reduzido há poucos dias e a temperatura de incubação pode ser a ótima de crescimento do microrganismo. Durante as diversas etapas no processamento de alimentos, visando à eliminação de *Listeria monocytogenes*, como tratamento térmico, congelamento, descongelamento, desidratação, irradiação, sanitização ou uso de aditivos alimentares como ácidos orgânicos ou seus sais, pode não haver a eliminação total do patógeno, resultando em células injuriadas (WARBURTON *et al.*, 1992; SMITH; ARCHER, 1988; KNABEL, 2002; DONNELL Y, 2002; SILK *et al.*, 2002). Entretanto, microrganismos sub-letalmente danificados ou injuriados, incluindo *L. monocytogenes*, são sensíveis a agentes seletivos, podendo não ser detectados em metodologias que utilizem etapa de enriquecimento seletivo que possuam esses compostos em suas formulações (SILK *et al.* 2002),. Experimentos demonstram que uma significativa fração de células sobreviventes são danificadas após aquecimento inferior a 54°C, acidificação, congelamento e secagem (BUCHANAN *et al.*, 1988; BAYLEY *et al.*, 1990b) Desta forma, o “enriquecimento seletivo” não está livre de limitações, já que é possível que os agentes seletivos presentes nos meios de enriquecimento venham a promover alguma

atividade inibitória contra *L. monocytogenes*, caso o microrganismo esteja estressado (LOVETT, 1988a; GOLDEN *et al.*; 1988b; CASSIDAY; BRACKETT, 1989).

Nesses métodos, são utilizados caldos de enriquecimento formulados com agentes seletivos que inibem a multiplicação da microbiota contaminante e, simultaneamente, permitem a proliferação de *Listeria* spp. (LOVETT, 1988a; DONNELLY, 2002; SILK *et al.*, 2002). Entre os agentes seletivos comumente usados estão acriflavina, ácido nalidíxico, cloreto de lítio, moxalactam, cicloheximida, nitrofurazona, tiocianato de potássio e feniletanol (BUCHANAN, 1990; BEUMER *et al.*, 1996; DONNELLY, 2002; FLANDER DONNELLY, 1994; SCHUCHAT *et al.*, 1991). Entre os agentes diferenciais, estão a esculina e o telurito de potássio.

Em 1987, Lovett desenvolveu o procedimento conhecido como “método do FDA” U. S. (Food and Drug Administration), o qual foi posteriormente revisado em 1988 por Lovett e Hitchins. O método é indicado para o isolamento de *L. monocytogenes* a partir de leite e derivados, utilizando-se de um caldo de enriquecimento (EB) que contém ácido nalidíxico, acriflavina e cicloheximida como agentes seletivos. O plaqueamento é feito em ágar McBride modificado (MMA) que contém os agentes seletivos feniletanol, anidrido glicínico, cloreto de lítio e cicloheximida; e em ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LPM), o qual se diferencia do MMA não só pela quantidade maior de cloreto de lítio e ausência de cicloheximida, mas pela presença do moxalactam, que apresenta um amplo espectro de atividade (LEE; MCCLAIN, 1986).

Um método foi indicado para o isolamento de *L. monocytogenes* a partir de produtos cárneos, o qual ficou conhecido como método do USDA - FSIS (United States Department of Agriculture - Food Safety and Inspection Service) (MCCLAIN; LEE, 1988). São utilizados dois caldos de enriquecimento, primário (LEB 1) e secundário (LEB 2) contendo ácido nalidíxico e acriflavina, e plaqueamento em LPM. Em 1989, McClain e Lee revisaram o método, sendo que o caldo de enriquecimento secundário passou a ser o caldo Fraser (FRASER; SPERBER, 1988). Este último é uma modificação do caldo original do USDA pela adição de citrato férrico e cloreto de lítio; e o plaqueamento feito em meio OXFORD modificado, originalmente descrito por CURTIS *et al.* (1989), que contém como agentes seletivos cloreto de lítio, colistina e moxalactam.

A Tabela 01 demonstra a relação entre as etapas de subcultura, condições de incubação e meios de cultura utilizados na análise de *Listeria* spp. em alimentos pelos métodos recomendados por diferentes órgãos reguladores.

TABELA 01 - ETAPAS DE SUBCULTURA, CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO E MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA ANÁLISE DE *Listeria* spp. EM ALIMENTOS PELOS MÉTODOS RECOMENDADOS POR DIFERENTES ÓRGÃOS REGULADORES

ÓRGÃO REGULADOR	PRIMEIRO ENRIQUECIMENTO	SEGUNDO ENRIQUECIMENTO	PLAQUEAMENTO DIFERENCIAL
FDA	LEB – 30°C/ 24 e 48 h	-	OXA – 35°C/24 e 48 h LPM – 30°C/24 e 48 h
USDA	UVM – 30°C / 24 h	Fraser – 35°C/ 24 e 48 h	MOX – 35°C/ 24 e 48 h

FONTE: SILVA, JUNQUEIRA, 1995

LEB = Caldo de Enriquecimento de *Listeria*
 UVM = Caldo Universidade de Vermont
 OXA = Placas de Ágar Oxford
 LPM = Placas de Ágar Cloreto de Lítio Feniletanol Moxalactam
 MOX = Placas de Ágar Oxford Modificado

Outros procedimentos de enriquecimento têm sido usados como, o caldo de enriquecimento para *Listeria* da Merck (MERCK, 1982), o caldo de enriquecimento para *Listeria* (LEB) de Donnelly e Baigent (1986), contendo ácido nalidíxico e acriflavina como agentes seletivos, o caldo triptose adicionado de 2% de citrato de sódio, utilizado por YOUSEF *et al.*, (1988) para a análise de amostras de queijo; o caldo de enriquecimento L-PALCAMY contendo os agentes seletivos polimixina B, cloreto de lítio, acriflavina e moxalactam (ou ceftazidima ou latamoxef) (LUND *et al.*, 1991).

A literatura ainda relata o desenvolvimento de vários outros meios sólidos para a recuperação de *L. monocytogenes* dos alimentos, além dos já citados nas metodologias da FDA e USDA-FSIS. Tais formulações incluem o ágar Vogel Johnson modificado (MVJ), contendo como agentes seletivos ácido nalidíxico, bacitracina, moxalactam e telurito de potássio, e o ágar McBride modificado ARS (ARS-MMA), contendo feniletanol, cloreto de lítio, anidrido glicínico, cicloheximida, ácido nalidíxico, moxalactam e bacitracina, ambos os meios desenvolvidos por BUCHANAN *et al.*, (1987); o ágar RAPAMY, contendo ácido nalidíxico e acriflavina como agentes seletivos, e o ágar PALCAM, contendo polimixina B, acriflavina, cloreto de lítio e moxalactam (ou

cefazidima ou latamoxef), desenvolvidos por Netten *et al.* (1988b); o ágar ALPAMY, o qual é uma modificação do ágar RAPAMY pela retirada do ácido nalidíxico e adição de cloreto de lítio (VAN NETTEN *et al.*, 1988a).

O método de número mais provável (MNP) para enumerar *L. monocytogenes* envolve diluições das amostras em uma série de tubos contendo um meio de enriquecimento. Após incubação, os caldos são plaqueados em um meio seletivo apropriado, incubados e observados para a presença de *L. monocytogenes*. Para calcular o número de *Listeria* por g ou ml de amostra utiliza-se a tabela de Número Mais Provável (NMP) (WATKINS; SLEATH, 1981)

As metodologias mais adequadas para detectar *Listeria monocytogenes*, dependendo do grau de contaminação do alimento, são aquelas que empregam um ou dois estágios de enriquecimento anterior ao plaqueamento BAILEY *et al.*, (1990),

3.9.2 Métodos rápidos utilizados para detecção de *Listeria monocytogenes*

A grande maioria dos métodos, atualmente em uso, detecta todas as espécies de *Listeria*. Entretanto, *Listeria monocytogenes* é considerada um patógeno clássico e sob muitas circunstâncias a capacidade de detectar somente esta espécie poderia ser útil (VARNAM; EVANS, 1991).

Sistemas elétricos têm sido desenvolvidos, tais como o Bactometer© e Malthus©, que avaliam o crescimento microbiano de espécies de *Listeria* pela variação da transmissão da corrente elétrica no meio (alteração das impedâncias ou condutância). Os métodos que se baseiam em impedância–condutância partem do princípio que os microrganismos são capazes de alterar a transmissão da corrente elétrica através de um meio de cultura. Essas alterações ocorrem como consequência da mudança da composição química desse meio devido à atividade metabólica dos microrganismos presentes. Durante a multiplicação microbiana, moléculas grandes (proteínas, lipídeos, carboidratos) são transformados em moléculas menores (aminoácidos, ácidos graxos, ácidos orgânicos), quimicamente mais ativas. As formações de acúmulo desses metabólitos finais resultam em alterações mensuráveis na condutância e na impedância elétrica dos meios. A quantidade de microrganismos

presentes é definida pela determinação do “tempo de detecção”, ou seja, o tempo necessário para que o aparelho detecte o início das alterações na impedância ou na condutância. A detecção ocorre quando a concentração microbiana atinge 10^6 a 10^7 microrganismos por mL. O tempo de detecção é inversamente proporcional à quantidade de microrganismos presentes. Através de curva-padrão é, portanto, possível determinar o número de microrganismos presentes em determinado produto (FRANCO, 2006).

As membranas filtrantes ISO-GRID são também uma alternativa interessante como método rápido de contagem de vários grupos de microrganismos incluindo *Listeria* sp. e *Listeria monocytogenes*. As amostras de alimentos (líquidos ou então fluidificados pelo tratamento enzimático apropriado) são filtradas através dessas membranas, que são transferidas para a superfície de meio de cultura formulado especialmente para essa finalidade. Essas membranas são quadradas e contém impressa em sua superfície uma grade hidrofóbica, com 1600 quadradinhos. Cada colônia que vier a se formar durante a incubação fica retida dentro de um quadrado da grade. Os quadrados preenchidos com colônias são enumerados, manual ou automaticamente, determinando-se pela tabela fornecida pelo fabricante, o UFC/g de produto.

A metodologia da imuno-separação magnética foi incorporada no desenvolvimento de dois sistemas para detecção rápida de *Listeria* em alimentos, denominados “Verify” e “Listertest”, ambos da Vicam. Nesses sistemas, os patógenos são removidos do produto por “immunobeads” recobertos de anticorpos específicos, e após uma etapa de incubação para multiplicação dos microrganismos capturados, a mistura é semeada em meios de cultura sólidos apropriados. Reações de aglutinação em lâmina, efetuados com as colônias suspeitas, dão resultados imediatos, com redução substancial no tempo total de análise (FRANCO, 2006).

Recentes avanços no campo da imunologia e da genética microbiana têm levado ao desenvolvimento de novas metodologias para detectar *Listeria* spp (Tabela 02) (FRANCO; LANDGRAF, 2005; Potencial Food Safety Hazard, 1997).

Existem também provas imunológicas e de detecção de DNA que pode realizar-se diretamente dos caldos de enriquecimento, o qual tem acelerado a identificação de amostras positivas para *Listeria*. Entre os métodos de ELISA aprovados pela AOAC se

encontram, por exemplo, *Listeria*-Tek (Organon Teknika), Assurance *Listeria* (BioControl Systems, Inc., Bothell, WA) e o VIDAS *Listeria* ensaio (Biomerieux Vitek). Entre os métodos de detecção de DNA que utilizam sondas não radioativas se encontra o Gene-Trak Colorimetric *Listeria* Assay (Gene-Trak Systems, Framingham, MA). Qualicon (Wilmington, DE) tem desenvolvido dois sistemas de identificação do DNA: o riboprinter Microbisal Characterization System, que utiliza análise de ribotipos para identificar *L. monocytogenes* e o método de identificação baseado na reação de cadeia da polimerase (PCR).

TABELA 02 - TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS E GENÉTICAS UTILIZADAS NA DETECÇÃO DE *Listeria* spp.

TÉCNICAS	PRINCIPIOS	TESTES
Técnicas Imunoenzimáticas	A reação é baseada na ligação do antígeno com o anticorpo específico, preso a uma matriz fixa. E ao antígeno fixo se liga outro anticorpo específico marcado por uma enzima	Assurance <i>Listeria</i> <i>Listeria</i> – TeK <i>Listeria</i> Visual Immunoassay <i>Listeria</i> Rapid Test (Clearview) <i>Listeria</i> VIA VIDAS LIS VIDAS LMO
Técnica de Imunocaptura (isolamento)	Baseada na capacidade dos microrganismos aderirem às superfícies de partículas metálicas superparamagnéticas revestidas de anticorpos específicos	<i>Listeria</i> Test <i>Listeria</i> Screen
Testes de Imunoprecipitação (isolamento)	Baseada na capacidade do microrganismo aderir às superfícies revestidas de anticorpos específicos que posteriormente precipitam	<i>Listeria</i> VIP
Testes de Hibridização (detecção)	São realizados com sondas genéticas específicas, que são segmentos de DNA de fita simples, capazes de reconhecer e formar híbridos com fitas complementares de DNA ou RNA. Os sistemas comerciais trabalham com sondas de DNA sintéticas, oligonucleotídicas, marcadas com enzimas, e baseiam-se em reações de hibridização em base líquida.	Genetrak Accuprobe <i>L. monocytogenes</i>
Técnica PCR Reação de Polimerase em Cadeia	Baseada na multiplicação exponencial de DNA, através da ação de uma enzima (DNA polimerase) que, tendo um segmento de DNA de fita simples como molde, é capaz de construir a fita complementar a esse segmento, através da polimerização de nucleotídios adicionados ao sistema.	

FONTE: FRANCO; LANDGRAF, 2005; Potential Food Safety Hazard, 1997

O método imunológico é à base da maioria dos sistemas de triagem para microrganismos patogênicos em alimentos e as técnicas mais utilizadas são imunoenzimática, imunocaptura, imunoimobilização, imunoprecipitação, co-aglutinação e de imunofluorescência. É importante ressaltar que todos eles são destinados à triagem apenas. Todo resultado positivo, ou suspeito de positividade, deve ser confirmado por métodos de cultivo convencionais. Destas técnicas a imunoenzimática, imunocaptura e de imunoprecipitação apresentam testes de detecção para *Listeria* (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Uma variedade de testes não convencionais que utilizam técnicas imunoenzimáticas (ELISA) tem sido desenvolvida para a identificação rápida de *Listeria*, tanto em níveis de gênero como de espécie. Esses testes têm acelerado significativamente a identificação de amostras positivas para *Listeria* (RYSER; DONNELLY, 2001).

Entre os vários tipos de testes imunoenzimáticos (ELISA) existentes, o tipo não competitivo (tipo sanduíche) é o mais empregado nos sistemas de triagem de microrganismos patogênicos em alimentos. Neste tipo de método, os patógenos investigados, se presentes no produto em teste, são capturados por anticorpos específicos adsorvidos à superfície de uma matriz sólida, que, dependendo do sistema, podem ser esferas de poliestireno, placas de microtitulação, partículas metálicas, papel e outras. Na etapa seguinte, o complexo antígeno-anticorpo assim formado reage com o chamado conjugado correspondente a um novo anticorpo específico para o microrganismo em teste, porém ligado a uma enzima cromogênica ou fluorogênica. As enzimas mais utilizadas nesses testes são a fosfatase alcalina e a peroxidase. Em seguida, o sanduíche formado reage com o substrato da enzima, resultando em desenvolvimento de cor ou de fluorescência cuja intensidade pode ser verificada a olho nu ou medida por espectrofotômetro (ROBISON, 1997).

Testes imunoenzimáticos são amplamente utilizados e apresentam diversas vantagens: simplicidade, sensibilidade, especificidade e conveniência como método de triagem. Em princípio, todo microrganismo pode ser utilizado para produção de anticorpos específicos, assim como qualquer metabólito, desde que imunogênico (natural ou artificialmente). Antes de utilizar qualquer desses sistemas disponíveis no

mercado brasileiro é sempre necessário fazer pelo menos uma etapa de enriquecimento da amostra a ser analisada. Entre os sistemas imunoenzimáticos disponíveis para *Listeria* spp destaca-se o *Listeria* Visual Immunoassay (LisVIA), produzido pela Tecra® Diagnostics (Austrália); o Tecra Unique *Listeria*, da Tecra; o EIA para *Listeria*; o Visual Immunoprecipitate Assay (VIP®), da BioControl Systems (EUA).

No sistema Lis VIA, a fase sólida é composta por pequenos recipientes plásticos. O fundo é revestido por anticorpos policlonais específicos para *Listeria*. É composto por uma placa com 96 cavidades que contêm os anticorpos policlonais adsorvidos em suas paredes. Esses recipientes encaixam-se em carreiras em um suporte plástico, que lembra uma placa de microtitulação. A amostra enriquecida é adicionada na cavidade, e o antígeno, se estiver presente, liga-se aos anticorpos. Após incubação, as cavidades são lavadas, para eliminar os antígenos que não se ligaram. O conjugado (anticorpo específico para *Listeria* ligado à enzima cromogênica) é adicionado e liga-se ao antígeno presente. Por último, adiciona-se o substrato, que é convertido pela enzima cromogênica em um produto de coloração esverdeada, quando ocorrer a ligação do antígeno com o conjugado. A cor gerada é comparada com um cartão de cor que acompanha o sistema reagente ou pode ser lida em um leitor de microplacas. Todos os reagentes do teste imunoenzimático vêm prontos. Os tempos totais de detecção, incluindo a etapa de pré-enriquecimento, é de 48 a 50 horas para *Listeria*. O teste é considerado positivo se a coloração observada for verde ou verde-escura; se for verde muito claro ou transparente, o teste é negativo (ARAGON-ALEGRO, 2004).

O sistema UNIQUE *Listeria*, de Tecra utiliza-se a imunocaptura, baseada na utilização de anticorpos para “separar” o antígeno de interesse da amostra. Esses anticorpos específicos recobrem a superfície de bastões de plástico (“dipsticks”) e, quando colocados em contato com uma mistura de antígenos, o antígeno alvo ligar-se-á ao anticorpo imobilizado e poderá ser isolado pela remoção do bastão. Uma vez separado fisicamente da microbiota competidora, o organismo é submetido a um enriquecimento seletivo. Isso ocorre em um módulo individual, onde todos os reagentes necessários já estão pré-distribuídos. O sistema reagente é constituído por módulos plásticos formados por tubos contendo os reagentes do teste imunoenzimático

previamente distribuído. A fase sólida é um bastão de plástico que deve ser inserido nos tubos, em seqüência. A leitura é feita visualmente pela formação de uma banda colorida no bastão. O tempo total requerido para esse sistema é de 32 horas (FRANCO; LANDGRAF, 2005; ARAGON-ALEGRO,2004).

O Visual Immunoprecipitate Assay (VIP®), da BioControl Systems, é um teste que utiliza anticorpos altamente específicos para *Listeria*, estando parte deles ligada à superfície de pequenas partículas móveis de látex, coradas de azul, e outra parte imobilizada. Apresenta-se como um aparato de uso único com 3 janelas: uma , onde se coloca a amostra enriquecida; outra, onde aparece o resultado do teste; a última é do controle. A amostra enriquecida é adicionada na janela da amostra e, por capilaridade, migra até as janelas de resultado e de controle. Na primeira, se *Listeria* estiver presente, o complexo antígeno-anticorpo-partículas de látex formado liga-se a anticorpos imobilizados na membrana. O excesso de látex carregando ou não o antígeno continuará a migrar até encontrar uma linha de anticorpos policlonais, formando uma linha azul controle. A BioControl não informa que anticorpos estão imobilizados nas janelas de resultado e de controle. Num teste com formato semelhante (Clearview, Oxoid), o anticorpo ligado ao látex e o imobilizado é a antíflagelina Ab, e na janela de controle é anti-IgG de camundongo. Se a linha na janela de resultados não aparecer, a amostra é considerada negativa. O tempo total para obtenção de resultado é de 52 horas (ARAGON-ALEGRO, 2004).

Segundo Oxoid, o método rápido Clearview Tm é um kit idealizado para detecção de *Listeria spp*, em alimentos e em amostras ambientais em 43 horas. O teste envolve dois passos de enriquecimento seletivo. Seguido por um imunoensaio de fase sólida, denominada de Clearview TM. Esta fase sólida é composta por uma fita de papel de filtro, colocada no interior de um dispositivo plástico com três orifícios. O papel filtro contém anticorpos policlonais anti-anticorpo flagelar imobilizados na cavidade controle. Na presença de antígeno flagelar B, este irá se fixar aos anticorpos específicos, movendo-se para a cavidade resultado, formando o clássico sanduíche (anticorpo + antígeno + anticorpo), onde se visualiza uma linha azul. Os anticorpos restantes continuam migrando para a cavidade controle, fixando-se aos anticorpos policlonais anti-anticorpo flagelar B, formando outra linha azul que é o controle da prova. Este método

apresenta o resultado de presença ou ausência do gênero *Listeria*, pela presença de uma linha azul, na cavidade designada para tal, em vinte minutos após adição da amostra devidamente preparada, conforme descrição realizada. Os anticorpos utilizados no dispositivo Clearview Tm foram testados quanto à reatividade cruzada contra um painel de vinte dois microrganismos listados abaixo. A concentração mínima utilizada foi de 1×10^8 por mililitro e não foi constatado reatividade cruzada com nenhum deles:

Microrganismos:

- *Acinetobacter anitratus*
- *Aerococcus viridans*
- *Arizona sp.*
- *Bacillus cereus*
- *Bacillus circulans*
- *Bacillus licheniformis*
- *Bacillus macerans*
- *Bacillus subtilis*
- *Citrobacter diversus*
- *Citrobacter koseri*
- *Edwardsiella tarda*
- *Enterobacter aerogenes*
- *Enterobacter cloacae*
- *Enterococcus faecalis*
- *Escherichia coli*
- *Hafnia alvei*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Proteus stuartii*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Salmonella sp.*
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus faecalis*

O método rápido Clearview TM detecta todas as espécies de *Listeria*, o que não pode ser considerado uma desvantagem, pois se alguma espécie de *Listeria* estiver presente no alimento existe o risco de *Listeria monocytogenes* também estar presente (ROGBERTS, 1994). O mesmo tem sido amplamente avaliado em uma grande variedade de alimentos incluindo carnes, vegetais e queijos, comparando o resultado do dispositivo Clearview TM com o plaqueamento em ágar Oxford a partir do caldo de enriquecimento secundário, onde se obteve em mais de 1000 testes uma correlação superior a 99% (HOLBROOK, *et al.*, 1994).

Segundo o manual do fabricante, o método rápido Clearview TM possui algumas limitações, sendo recomendado somente à utilização de caldos de enriquecimento e suplementos da empresa Oxoid. Dispositivos úmidos ou que tenham sido removidos da embalagem dias antes da análise não devem ser utilizados. Podem ocorrer resultados falso-negativos nas seguintes situações:

1. se o antígeno extraído estiver abaixo da sensibilidade mínima do teste,
2. se a incubação ocorrer em temperaturas acima de 30°C;
3. se o material testado estiver contaminado com leveduras, o que pode ser amenizado com o aumento do tempo de incubação para 24 – 26 horas nos dois caldos de enriquecimento.

Características do método rápido Clearview TM segundo Oxoid, 1998

- Sensibilidade: superior a 99%
- Especificidade: 100%
- Apresentação: kit para 50 testes, contendo ampolas do suplemento do caldo Fraser
- Armazenamento : 2 a 8°C
- Validade: 18 meses a partir da data de fabricação
- Área de atuação: Indústria Alimentícia (frigoríficos, laticínios), Universidades, Institutos de Pesquisa, onde se tenha interesse pela pesquisa de *Listeria spp.*

No sistema Assurance EIA para *Listeria* da BioControl a fase sólida é composta por placas de microtitulação, com os anticorpos aderidos ao fundo dos recipientes. Todos os reagentes são liofilizados. A leitura pode ser feita visualmente ou com o auxílio de um espectrofotômetro leitor de microplacas.

Atualmente, esses métodos enzimáticos são passíveis de automação. O sistema mais conhecido é o VIDAS, da bioMérieux que pode ser utilizado para pesquisa de *Listeria*. Trata-se de um aparelho totalmente automatizado, que desenvolve o teste imunoenzimático em galerias plásticas descartáveis, que contém câmaras com os reagentes necessários para o teste. A fase sólida é constituída por uma ponteira plástica, que entra e sai seqüencialmente de cada uma dessas câmaras. Após a adição da cultura enriquecida a primeira câmara e introdução da galeria no aparelho, todas as

etapas do teste são executadas automaticamente, inclusive a leitura dos resultados. O tempo total de teste é de 60 minutos, após o enriquecimento.

3.9.3 Sistemas para identificação de colônias isoladas

3.9.3.1 Método convencional para identificação das colônias isoladas e diferenciação de espécies de *Listeria*

Os métodos convencionais para identificação das colônias isoladas e a diferenciação das espécies de *Listeria* são realizados pelo exame de morfologia colonial e celular, coloração de Gram, provas bioquímicas, produção de hemolisina em ágar sangue e teste CAMP (LOVETT, 1987).

A atividade hemolítica é um caráter distintivo importante, estritamente associado com a patogenicidade em *L. monocytogenes*, e essencial para a sua diferenciação de *L. innocua*, não patogênica, comumente presente em alimentos e com perfil bioquímico semelhante a *L. monocytogenes* (FUJISAWA; MORI, 1994; RALOVICH, 1993; HITCHINS, 1995). No entanto, muitos problemas foram descritos na interpretação das reações hemolíticas produzidas por *L. monocytogenes* em meios de cultura (SKALKA *et al.*, 1982; VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 1990; McKELLAR, 1994; McLAUCHLIN, 1997, DOYLE, 2001), pois estas reações têm intensidade variável, e algumas amostras produzem tão pouca hemólise que esta habilidade pode passar sem ser notada. Além disso, há ainda amostras que podem não exibir atividade hemolítica (FARBER; PETERKIN, 1991; FUJISAWA e MORI, 1994). Por outro lado, *L. innocua* pode induzir reações falso-positivas de hemólise quando se desenvolve em meio com glicose (COX *et al.*, 1991; SKALKA *et al.*, 1983).

A importância da identificação correta de todas as amostras de *L. monocytogenes*, mesmo as pouco hemolíticas, está no fato de estas amostras não serem necessariamente menos virulentas que aquelas com hemólise francamente visível. Este fato vem de encontro ao que se pensava até há pouco tempo atrás quando amostras isoladas de meio ambiente ou de alimentos, não positivas nas técnicas rotineiras para caracterização das atividades hemolíticas e de lecitinase, eram simplesmente caracterizadas como *L. innocua* ou *L. monocytogenes* não virulentas e

desconsideradas quanto à sua periculosidade (KATHARIOUS *et al.*, 1988; ROCOURT, 1996).

As reações de CAMP com *Staphylococcus aureus* e com *Rhodococcus equi* foram propostas como método para distinguir amostras de *Listeria* spp. com hemólise questionável em ágar sangue (SKALKA *et al.*, 1982 a e b ; ROCOURT *et al.*, 1983; MAC FADDIN, 2000) . Embora a princípio estas duas reações tenham sido aceitas como critério fundamental de identificação (SEELIGER; JONES, 1994), informações posteriores sugerindo a possibilidade de resultados falso-negativos, ou dificuldades na interpretação do teste de CAMP com *S.aureus*, que poderiam ser subjetivos ou inconclusivos (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 1990), assim como relatos mostrando discrepâncias nos resultados padronizados do teste com *R. equi* (FERNÁNDEZ-GARAYZABAL *et al.*, 1996) levaram alguns autores a procurarem outras formas de evidenciar as características hemolíticas de *L. monocytogenes* , e/ou outras maneiras de diferenciar as espécies (COX *et al.*, 1991; FERNÁNDEZ-GARAYZABAL *et al.*, 1992; FUJISAWA; MORI, 1994; BEUMER *et al.*, 1997). Foram também sugeridos testes enzimáticos para substituir o teste de CAMP, como a reação de alanil peptidase (CLARK; MCLAUCHLIN, 1970) e sistemas de identificação utilizando critérios quimiotaxonômicos, que funcionam bem, mas produzem ocasionalmente resultados discrepantes (McLAUCHLIN, 1997); além do que testes baseados em enzimas sem correlação com virulência podem não ser aceitáveis (McKELLAR, 1994).

Testes utilizando outros fatores de virulência conhecidos foram propostos como alternativos às provas de hemólise. Em 1991, NOTERMANS *et al.*, sugeriram que a atividade de uma fosfolipase C fosfatidilinositol-específica (PI-PLC) produzida por *L. monocytogenes* poderia ser usada como um marcador para distinguir entre espécies patogênicas e não patogênicas de *Listeria* (além de *L. monocytogenes*, somente *L. ivanovii* seria positiva para PI-PLC). Uma degradação distinta da lecitina do ovo só é evidente em *L. monocytogenes*, e não nas outras espécies de *Listeria*. Esta degradação seria devida à atividade de uma fosfolipase C de amplo espectro, uma leticinase. Desta forma, o teste de atividade da lecitinase poderia funcionar como um marcador diferencial não só entre *L. monocytogenes* e *L. innocua*, como também entre *L. monocytogenes* e as outras espécies do gênero. No entanto, tanto os testes baseados na produção de PI-

PLC como na de lecitinase mostraram muita variação nos resultados entre as diferentes amostras (KARPÍSKOVÀ *et al.*, 2000; NOTERMANS *et al.*, 1991; PAZIAK-DOMANSKA *et al.*, 1999; NUNES; HOFER, 1994; RIPIO *et al.*, 1996).

3.9.3.2 Sistemas alternativos para a identificação das colônias isoladas e diferenciação de espécies de *Listeria*

Durante décadas, os métodos utilizados para identificação de microrganismos isolados em meios de cultura sólidos foram baseados no comportamento bioquímico frente aos mais variados substratos. Os testes chamados “convencionais” para caracterização de um determinado microrganismo são baseados na observação da capacidade desse microrganismo realizar determinadas reações bioquímicas. Estes testes são trabalhosos, de custo bastante elevado e sujeito a diversas variáveis que podem interferir nos resultados.

Hoje o microbiologista tem à sua disposição diversos sistemas alternativos para identificação de microrganismos. Os primeiros sistemas foram idealizados para identificação de enterobactérias, mas atualmente já são comercializados para identificação de vários outros grupos de microrganismos. Os sistemas comerciais são, na maioria miniaturizados, isto é, os testes são executados em recipientes pequenos, contendo pequenos volumes de meios de cultura (FRANCO, 2006). O uso de técnicas miniaturizadas para identificação rápida de microrganismos teve início em 1940, (RYSER ; MARTH, 1991)

Entre as provas listadas pelo FDA que não necessitam de outra prova pode-se citar: 20S (*Analytical Products, Planiview, NY*), API SYM (*Analytical Products*), Cartões de Identificação para Gram Positivos tipo Vitek (*Biomerieux Vitek, Hazelwood, MO*) e *Listeria* API (*Biomerieux Vitek*). Também se pode utilizar o Micri-ID (Organon teknika Corp., Durham, NC) mas somente depois de conhecer o resultado do teste CAMP. A AOAC tem adotado como métodos de confirmação a Vitek Autmicrobic System e a Micro-ID. Dependendo do que se necessite, pode-se também utilizar métodos alternativos como as placas de microScan para Gram positivo (Dade-MicroScan, Sacramento, CA). Recentes avanços no campo da imunologia e da genética microbiana

têm levado ao desenvolvimento de novas metodologias para detectar *Listeria spp* (Tabela 02) (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Um dos sistemas amplamente utilizado para identificar *L. monocytogenes* é o API Listeria (Analytab Products INC.) da bioMérieux, que consiste de dez microtubos contendo substratos desidratados, os quais permitem realizar testes enzimáticos e de fermentação de açúcares. A diferenciação entre *L. monocytogenes* e *L. innocua* é baseada na presença ou ausência de arylamidase (teste DIM), hidrólise da esculina, presença de α -manosidase, e fermentação de *D*-arabitol, *D*-xilose, *L*-ramnose, α - metil-*D*-glicose, *D*-ribose, glicose-1- fosfato e *D*- tagatose. Através deste kit os testes de testes de atividade hemolítica e ou reação de CAMP podem ser omitidos, reduzindo-se assim, consideravelmente, o tempo necessário para a identificação, uma vez que os resultados estão disponíveis com 18 a 24 horas (BILLE *et al.* 1992; BEUMER, *et al.*, 1996).

3.9.4 Métodos moleculares utilizados para a detecção de *Listeria monocytogenes*

Produtos alimentícios associados à listerioses epidêmicas demonstram a necessidade de metodologias rápidas e sensíveis para monitorar a incidência de *L. monocytogenes*. Nas últimas décadas, vários trabalhos descrevem a aplicação de métodos de amplificação de DNA baseados na reação em cadeia da ligase (LCR, “Ligase Chain Reaction”) e mostram o sucesso da reação em cadeia da polimerase (PCR, “Polymerase Chain Reaction”) na detecção e identificação de *L. monocytogenes* em amostras clínicas, ambientais e de alimentos (BESSENEEN *et al.*, 1990; WERNARS *et al.*, 1991; JATON *et al.*; 1992; WIEDMANN *et al.*; 1993).

Salienta-se que para a utilização de muitas das técnicas moleculares é necessária informação dos genes alvo característicos de cada espécie, assim como, da sua freqüência na população. Para tal é essencial um conhecimento um tanto exaustivo dos microrganismos patogênicos mais preocupantes para a saúde pública e uma base de dados, tipo *GenBank*, que contenha essa informação e possua dados sobre a variação genética existente entre a população de interesse. As técnicas moleculares

têm, portanto, vindo a adquirir cada vez mais interesse na medida em que facilitou a detecção precisa e rápida de microrganismos indesejáveis em alimentos.

A PCR é um método de amplificação de DNA, aumentando o número de cópias do segmento alvo. Este procedimento conceitualmente simples foi descrito por Kary Mullis no início da década de 80, e em 1993 recebeu o Prêmio Nobel de Química por este trabalho. A PCR baseia-se na amplificação de um segmento de DNA flanqueado por dois *primers*, oligonucleotídeos iniciadores com a extremidade 3'OH livre, que hibridizam com as regiões flangeadoras da seqüência alvo permitindo o início da amplificação pela enzima DNA polimerase. Atualmente, são utilizadas DNA polimerases termoestáveis, que resistem à alta temperatura necessária para desnaturação da dupla-fita do DNA. Ciclos repetidos de desnaturação do DNA, hibridização dos *primers* e síntese enzimática resultam numa amplificação exponencial da seqüência alvo.

A PCR é um procedimento rápido, eficaz e sensível para a detecção e identificação de microrganismos. Diversos autores relatam a utilização o sucesso da PCR na análise microbiológica, mesmo quando o microrganismo pesquisado encontra-se sob estresse ou em quantidades mínimas, tornando difícil ou impossível o isolamento em meio de cultura (FUNGARO, 1998).

Tipicamente amplifica fragmentos de DNA superiores a 10 kilopares de base (kb), no entanto, algumas técnicas permitem a amplificação de fragmentos acima dos 40 kb. Salienta-se que, quanto maior o fragmento maior é a probabilidade de ocorrência de erros.

A maioria dos ensaios de amplificação da literatura envolve a identificação de genes alvos associados ao processo de patogênese de *Listeria* e, mais especificamente, *L. monocytogenes*. Exemplo típico é o gene *iap*, que tem sido utilizado como alvo para desenvolvimento de ensaios para detecção genérica de *Listeria* e específica de *L. monocytogenes* (FURRER *et al.*; 1991; JATON *et al.*; 1992; BUBERT *et al.*, 1999). Entretanto, o gene alvo mais reportado para diagnóstico específico de *L. monocytogenes* é o *hlyA* (THOMAS *et al.*, 1991; BSAT e BATT, 1993; WIEDMANN *et al.*, 1993; COORAY *et al.*, 1994).

O gene *iap* codifica a proteína p60, encontrada em todas as espécies de *Listeria*. Análises da seqüência de DNA demonstram que este gene apresenta regiões

conservadas entre as espécies, e regiões espécie-específicas. Em *L. monocytogenes*, o gene *iap* codifica o domínio extracelular da proteína p60, que atua como uma *murein-hidrolase* necessária para a separação do septo ao final da divisão celular (MANZANO *et al*, 1997a); (MANZANO *et al*, 1997b); (MANZANO *et al*, 1998). Estudos demonstram que a proteína p60 de *L. monocytogenes* está associada com o processo invasivo do patógeno, consistindo num fator de virulência (MANZANO *et al*, 1997a); (BUBERT *et al*, 1999).

A seqüência da região polimórfica do gene *iap* foi analisada em 25 cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de queijo no Estado do Rio Grande do Sul e comparadas com cepas referências. Esta investigação distinguiu *L. monocytogenes* em dois grupos: I (20 cepas) e II (5 cepas) (MELLO, 2008).

Foram desenvolvidos *primers* a partir de seqüências conservadas do gene *iap* em *L. monocytogenes*. Estes *primers*, Mar1 e Mar2, estão localizados nas posições 635 até 653pb e 1069 até 1085pb respectivamente, que permitem a amplificação de um fragmento com 453pb exclusivo de *L. monocytogenes* (MANZANO *et al.*, 1997a).

As cepas patogênicas de *L. monocytogenes* são reconhecidamente hemolíticas. A listeriolisina O, uma hemolisina *sulphydryl-activated*, é um importante fator de virulência do patógeno. O gene *hlyA*, que codifica esta proteína, foi identificado e seqüenciado permitindo o desenvolvimento de *primers* para a detecção de *L. monocytogenes* por PCR (BESSESEN *et al*, 1990).

Também foram desenvolvidos *primers* a partir do gene *hlyA* que permitem a amplificação de um fragmento de 417pb, exclusivo de *L. monocytogenes* (FITTER *et al.*, 1992). Diversos trabalhos relatam a detecção molecular de *L. monocytogenes* a partir da seqüência do gene *hlyA* (NIEDERHAUSER *et al.*, 1992; BANSAL, 1996; SOOD; KAUR, 1996). Utilizou-se também uma seqüência conservada a jusante do gene *hlyA* para o desenvolvimento de *primers*. A amplificação desta região demonstrou ser específica para *L. monocytogenes* (ROSSEN *et al.*, 1991)

Outros genes também têm sido empregados na obtenção de marcadores moleculares para a detecção de *L. monocytogenes*. Segmentos do gene *inIA* são específicos de *L. monocytogenes*, não sendo amplificados em outras espécies de listeria (ALMEIDA; ALMEIDA, 2000). O gene *inIB* foi utilizado para a detecção de *L.*

monocytogenes em diferentes amostras alimentares (KACLIKOVÁ *et al.*, 2002). Cepas de *L. monocytogenes* foram isoladas de pacientes originários de diferentes localidades no período de 1983 a 1998. Foi identificada a presença dos genes *inlA*, *inlB*, *hlyA*, *plcA* e *plcB*, que estão associados com a virulência do microrganismo, em todas as cepas patogênicas investigadas (JARADAT; SCHUTZE; BHUNIA, 2002). Utilizou-se com sucesso *primers* para amplificar um segmento do gene *Dth18* para a detecção de *L. monocytogenes* isoladas em amostras de queijo (WERNARS *et al.*, 1991). Empregou-se *primers* para amplificar segmentos dos genes *hlyA*, *Dth18* e *iap*, detectando com sucesso *L. monocytogenes* em diferentes amostras alimentares (SOOD; KAUR, 1996).

A PCR é uma técnica altamente sensível que permite a detecção de células não cultiváveis ou estressadas. Contudo, a presença de células mortas do patógeno pode levar a um resultado falso positivo de contaminação da amostra investigada. A RT-PCR (transcrição reversa por PCR) é utilizada para amplificar o RNAm dos genes *hlyA*, *prfA* e *iap*, permitindo a detecção apenas de células viáveis de *L. monocytogenes* (KLEIN; JUNEJA, 1997). RT-PCR foi utilizada para amplificar o RNAm do gene *hlyA*, possibilitando a determinação das células viáveis mas não cultiváveis de *L. monocytogenes*, após a pasteurização de amostras de queijo. (HERMAM, 1997).

Em análise de alimentos por PCR, a fim de evitar falsos resultados positivos, diversos autores sugerem uma etapa de enriquecimento da amostra para recuperação apenas das células viáveis (MAKINO; OKADA; MARUYAMA, 1995; MANZANO *et al.*, 1997a). Foram comparados dois procedimentos (A e B) de enriquecimento para a análise por PCR de amostras alimentares. O procedimento A detectou a presença de *L. monocytogenes* em 13 das 330 amostras analisadas, confirmando os resultados obtidos com as técnicas clássicas de cultivo. Porém, com o procedimento B foram detectadas 14 amostras contaminadas, demonstrando um aumento da sensibilidade na análise por PCR (NIEDERHAUSER *et al.*, 1992). Foi utilizado o caldo de enriquecimento (LEB) para *L. monocytogenes* antes da análise por PCR de amostras alimentares, aumentando a sensibilidade da análise (ROSSEN *et al.*, 1991). Foi demonstrado que uma etapa de enriquecimento em caldo LB (Luria Broth) das amostras contaminadas aumentou a sensibilidade da análise por PCR (INGIANNI *et al.*, 2001). Utilizou-se uma etapa de pré-enriquecimento universal, resultando em um aumento na eficiência da PCR para

detecção dos patógenos *Escherichia coli*, *Salmonella Thyphimurium* e *L. monocytogenes* presentes em amostras de carne (BHADURI; COTTRELL, 2001). Demonstrou-se ainda que amostras analisadas por PCR submetidas previamente a um enriquecimento seletivo e um curto pós-enriquecimento apresentaram os mesmos resultados quando analisadas pelos métodos convencionais EN ISO 11290-1 e ISO 10560 na detecção *L. monocytogenes* (KACLIKOVÁ *et al.*, 2002).

As técnicas moleculares têm sido aplicadas com sucesso na detecção de *L. monocytogenes* em diferentes tipos de alimentos, como carnes, laticínios, vegetais, entre outros (MANZANO *et al.*, 1997b; STWART; GENDEL, 1998; WANG; HONG, 1999; DUFFY *et al.*, 1999; AL-SOUD; RADSTROM, 2000; KACLIKOVÁ *et al.*, 2000; LAMPEL; ORLANDI; KORNEGAY, 2000).

Contudo, diversos autores relatam a dificuldade na utilização da PCR para a detecção de microrganismos em amostras de queijo, especialmente em amostras contaminadas naturalmente, devido à composição complexa de inibidores da PCR presentes neste tipo de alimento como Cálcio, gorduras, proteínas, compostos orgânicos e fenólicos (WERNARS *et al.*, 1991 ; MANZANO *et al.*, 1997a ; MANZANO *et al.*, 1998 ; WANG *et al.*, 1997). Foram testados três procedimentos para a extração de DNA de amostras de queijo. O procedimento utilizando iodeto de sódio e precipitação com etanol absoluto eliminou os inibidores da PCR, permitindo a análise das amostras de queijo por esta técnica (MAKINO; OKADA; MARUYAMA, 1995). Foi realizada uma diluição de (1:99) do caldo de enriquecimento das amostras de queijo çabpratproaç,emte contaminadas, eliminando a interferência dos inibidores da PCR. Foram investigados componentes presentes em amostras de queijo, na flora microbiana e nos caldos de enriquecimento. Neste trabalho foi demonstrado que componentes presentes no queijo, foram os responsáveis pela inibição da PCR (WAGNER *et al.*, 1999; MANZANO *et al.*, 1998).

Outro fator importante nas técnicas de biologia molecular para identificação de *L. monocytogenes* é o procedimento de análise dos produtos amplificados. As duas alternativas mais relatadas em trabalhos envolvendo esta bactéria são eletroforese em gel de agarose e hibridização em fase sólida (BSAT e BATT, 1993; COORAY *et al.*, 1994). Mais recentemente, foi desenvolvida a técnica de TaqMan[™] PCR (Applied

Biosystems Inc., Foster City, CA, EUA) tornando desnecessária a realização destas etapas. Esta técnica baseia-se no princípio da atividade exonucleásica 5' – 3' da Taq DNA polimerase para a digestão de uma sonda marcada com dois corantes fluorescentes. A fluorescência emitida pode ser lida em espectrofotômetro após a amplificação. Equipamentos mais modernos, que apresentam na mesma unidade um termociclador a um espectrofômetro, permitem a análise da fluorescência emitida durante a amplificação, ou em tempo real (“real time”) (BASSLER *et al.*, 1995).

Estudos recentes têm demonstrado outras vantagens do uso de TaqMan™ PCR, tais como a quantificação de DNA de *L. monocytogenes*, podendo inferir o número de bactérias, e a detecção apenas das células viáveis, pelo procedimento de análise de mRNA (BASSLER *et al.*, 1995, NORTON; BATT, 1999).

No ano de 2000 foi otimizado o procedimento de análise para uso em rotina da técnica de TaqMAN™ PCR para detecção de *Listeria monocytogenes*, permitindo a sua detecção com alta sensibilidade e especificidade, além de possibilitar a obtenção automática dos resultados após a amplificação. Os experimentos objetivando otimizar a técnica mostraram que, entre os vários fatores moleculares envolvidos, uma menor distância entre o iniciador (*primer forward*) e a sonda apresentou o efeito mais significativo no aumento do índice de hidrólise desta. Outras informações obtidas foram à menor efetividade de ensaios que utilizam sondas com “G” no final 5' e / ou amplificam fragmentos grandes (maiores de 500 pares de bases). Os parâmetros estabelecidos permitiram o desenvolvimento de técnica com alta reprodutibilidade para detecção e quantificação de *Listeria monocytogenes* (LUNGE, 2000).

Técnicas mais sofisticadas tais como “multilocus enzyme electrophoresis”, “ribotyping”, RFLP - “restriction fragment length polymorphism analysis”, pulsed-field gel electrophoresis” e RAPD - “randomly amplified polymorphic DNA analysis” podem distinguir *L. monocytogenes* de *L. innocua* a nível molecular, mas estes métodos também são complexos para a rotina de laboratório (JOHNSON; LATTUADA, 1993).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Área de abrangência do estudo

A área de estudo considerou a divisão administrativa intermediária constituída pelas Regionais de Saúde da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná/ Instituto de Saúde do Paraná (Figura 3) As Regionais de Saúde, em número de 22, englobam os 399 municípios do Estado do Paraná e apresentam como município sede as seguintes cidades: Paranaguá (1ª RS), Curitiba (Metropolitana - 2ª RS), Ponta Grossa (3ª RS), Irati (4ª RS), Guarapuava (5ª RS), União da Vitória (6ª RS), Pato Branco (7ª RS), Francisco Beltrão (8ª RS), Foz do Iguaçu (9ª RS), Cascavel (10ª RS), Campo Mourão (11ª RS), Umuarama (12ª RS), Cianorte (13ª RS), Paranavaí (14ª RS), Maringá (15ª RS), Apucarana (16ª RS), Londrina (17ª RS), Cornélio Procópio (18ª RS), Jacarezinho (19ª RS), Toledo (20ª RS), Telêmaco Borba (21ª RS) e Ivaiporã (22ª RS).

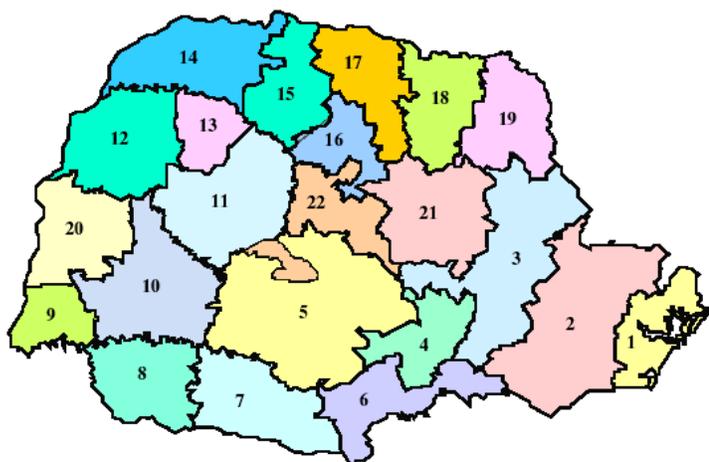


FIGURA 3 - DIVISÃO ADMINISTRATIVA DA SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ SEGUNDO AS REGIONAIS DE SAÚDE - 2008

FONTE: PARANÁ, 2004

Pelas 22s Regionais de Saúde, o Estado exerce o papel de apoio, cooperação técnica e investimentos nos municípios e nos consórcios municipais. Secundariamente, exerce ações e serviços de saúde. Os municípios, isoladamente ou aglutinados em módulos intermunicipais, devem assumir todas as ações e serviços que possam por eles ser absorvido. À Regional de Saúde cabe desenvolver a inteligência necessária para apoiar o município em todas as áreas e para influenciar na gestão das questões regionais, promovendo a busca contínua e crescente da eficiência com qualidade.

Esse trabalho teve como base territorial 16 Regionais de Saúde que abrangem 283 municípios. Sendo 72,72% das RS do Estado do Paraná envolvidas, as quais foram selecionadas pela busca randômica no www.randomizer.org. As coletas foram realizadas em 29 pontos diferentes, conforme Tabela 3, a seguir.

TABELA 3 - REGIONAIS DE SAÚDE - COLETAS

Regional de Saúde	Município Sede
2 ^a	Curitiba
4 ^a	Irati
5 ^a	Guarapuava
7 ^a	Pato Branco
8 ^a	Francisco Beltrão
9 ^a	Foz do Iguaçu
10 ^a	Cascavel
12 ^a	Umuarama
13 ^a	Cianorte
14 ^a	Paranavaí
15 ^a	Maringá
16 ^a	Apucarana
17 ^a	Londrina
18 ^a	Cornélio Procópio
20 ^a	Toledo
22 ^a	Ivaiporã

Fonte: VISA/SESA.2002.

4.1.2. Produtos lácteos (queijos)

Foram coletadas pela Vigilância Sanitária do Estado do Paraná 90 amostras de diferentes tipos de queijos, nos estabelecimentos que comercializam alimentos em diferentes regiões do Estado do Paraná, no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2002. Foram também coletadas, no mesmo período, 10 amostras de queijos envolvidos em surtos de Doença Transmitida por Alimentos (DTA) a partir do local de investigação

do surto. As amostras foram embaladas em sacos plásticos de primeiro uso, identificadas e mantidas sob refrigeração durante o transporte para o laboratório e analisadas imediatamente e estão descritas na Tabela 4.

TABELA 4 DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS ANALISADAS

Amostra	Produto	Tipo de registro	RS	Local de coleta
1.	Queijo Montanhês (fatiado pela empresa)	SIF	15	Marinã - Supermercado
2.	Queijo Minas Frescal Light	SIF	4	Irati - Supermercado
3.	Queijo Colonial	SIM	8	Francisco Beltrão - Produtor
4.	Queijo Mussarela Fatiado	SIF	PMC	Cascavel - Supermercado
5.	Queijo Colonial	SIM	8	Francisco Beltrão - Produtor
6.	Queijo Tipo Mussarela	SIP	8	Francisco Beltrão- Produtor
7.	Queijo tipo Gouda	SESA	8	Bom Jesus do Sul - Produtor
8.	Queijo tipo Mussarela	SESA	8	Dois Vizinhos - Produtor
9.	Queijo Minas Frescal Light	SIF	4	Mallet - Supermercado
10.	Queijo Minas Magro	SESA	4	Santa Maria do Oeste - Produtor
11.	Queijo Minas Frescal Light	SIF	4	Irati - Supermercado
12.	Queijo Tipo Minas Magro	SIP	12	Pérola - Laticínios
13.	Queijo Tipo Colonial	SIP	7	Mariópolis Laticínio
14.	Queijo Minas frescal Light	SIF	15	Supermercado
15.	Queijo Tipo Colonial	SIM	8	Francisco Beltrão -Produto
16.	Queijo Colonial	SIM	8	Francisco Beltrão - Produtor
17.	Queijo Colonial Condimentado	SIP	8	Bom Jesus do Sul - Produtor
18.	Queijo Colonial	NC (DTA)	17	Consumidor
19.	Queijo Minas Frescal	SIP	15	Dr. Camargo -Comércio
20.	Queijo Colonial	NC (DTA)	8	Francisco Beltrão -consumidor
21.	Queijo Colonial	SIP	7	Mariópolis -Supermercado
22.	Queijo Colonial	SESA	8	Bom Jesus do Sul - Laticínio
23.	Queijo Colonial	SESA	9	Matelândia -Supermercado
24.	Queijo Colonial	SIM	8	Francisco Beltrão - Produtor
25.	Queijo Prato fatiado	NC	PMC	Curitiba- Supermercado
26.	Queijo Colonial	NC (DTA)	5	Lanchonete
27.	Queijo Prato	SIF	PMC	Curitiba - Supermercado
28.	Queijo Mussarela	SIF	PMC	Curitiba – Distribuidor de Alimentos
29.	Queijo Colonial	NC (DTA)	22	Ivaiporã - Consumidor
30.	Queijo Mussarela	SIF	5	Guarapuava
31.	Queijo Lanche fatiado	SIP	PMC	Curitiba
32.	Queijo Mussarela (Holandês)	SIP	16	Apucarana
33.	Queijo Mussarela Fatiado	N C	PMC	Curitiba – Distribuidor de Alimentos
34.	Queijo Minas Padrão	SIF	18	Cornélio Procópio
35.	Queijo Minas Frescal Light	SIF	17	Cambe
36.	Queijo Minas Frescal	SIP	14	Paranavaí
37.	Queijo Colonial	SIM	8	Francisco Beltrão
38.	Queijo Mussarela	SIP	PMC	Curitiba
39.	Queijo Colonial	SIM (DTA)	8	Francisco Beltrão
40.	Queijo Minas Frescal	SIP	10	Cascavel
41.	Queijo Colonial	NC (DTA)	9	Salto da Lontra
42.	Queijo Provolone	SIF	PMC	Curitiba
43.	Queijo Prato	SIF	PMC	Curitiba
44.	Queijo Prato Light	SIF	PMC	Curitiba
45.	Queijo Mussarela Holandês	SIP	16	Apucarana
46.	Queijo Mussarela	SIP	16	Apucarana
47.	Queijo Mussarela	SIP	18	Cornélio Procópio
48.	Queijo Minas Frescal Magro	SIP	PMC	Curitiba
49.	Queijo Mussarela	SIF	10	Cascavel
50.	Queijo Colonial	NC (DTA)	10	Cascavel
51.	Queijo Caseiro	NC (DTA)	20	Toledo
52.	Queijo Minas Magro	SIF	10	Cascavel
53.	Queijo Tipo Colonial	SIF	10	Cascavel
54.	Queijo Mussarela	NC	PMC	Curitiba
55.	Queijo Mussarela	SIF	4	Imbituva
56.	Queijo Mussarela	SIF	5	Palmital
57.	Queijo Mussarela	SIF	4	Imbituva
58.	Ricota Fresca	SIF	PMC	Curitiba
59.	Queijo Tipo Mussarela	SIM	5	Laranjeiras do Sul
60.	Queijo	SR (DTA)	17	Londrina
61.	Queijo	SR (DTA)	13	Cianorte
62.	Queijo Montanhês (fatiado)	SIF	14	Paraíso do Norte
63.	Queijo Tipo Mussarela	SIP	16	Apucarana
64.	Queijo Prato Lanche	SIF	PMC	Curitiba

65.	Queijo Colonial (com casca)	SR	PMC	Curitiba – Mercado Municipal
66.	Queijo tipo Colonial	SR	PMC	Curitiba- Mercado Municipal
67.	Queijo Tipo Minas Frescal	SIF	PMC	Curitiba – Mercado Municipal
68.	Queijo Colonial	SR	PMC	Curitiba – Mercado Municipal
69.	Queijo Colonial	SR	PMC	Curitiba – Ambulante
70.	Queijo tipo Minas Frescal	SIF	PMC	Curitiba – Mercado Municipal
71.	Queijo tipo Minas Frescal	SIF	PMC	Curitiba – Mercado Municipal
72.	Ricota	SIF	PMC	Curitiba- Supermercado
73.	Ricota Fresca	SIF	PMC	Curitiba- Supermercado
74.	Ricota Fresca	SIF	PMC	Curitiba- Supermercado
75.	Queijo Fatiado Mussarela	SR	PMC	Curitiba – Supermercado
76.	Ricota Fresca	SIF	PMC	Curitiba – Feira Livre
77.	Ricota Fresca	SIF	PMC	Curitiba – Feira Livre
78.	Queijo Minas Frescal Light	SIF	PMC	Curitiba- Feira Livre
79.	Ricota Fresca Prensada	SIF	PMC	Curitiba – Feira Livre
80.	Queijo Minas Light	SIF	PMC	Curitiba – Feira Livre
81.	Queijo Colonial	SR	PMC	Curitiba – Feira Livre
82.	Queijo Minas Frescal	SIF	PMC	Curitiba – Produtor
83.	Queijo Minas Light	SIF	PMC	Curitiba – Produtor
84.	Queijo Minas Frescal Magro	SIF	PMC	Curitiba- Produtor
85.	Queijo Minas Frescal	SIF	PMC	Curitiba- Produtor
86.	Requeijão	SR	PMC	Curitiba – Feira de Produtores
87.	Queijo Minas Frescal	SR	PMC	Curitiba – Feira de Produtores
88.	Queijo Colonial	SR	PMC	Curitiba - Feira Livre
89.	Queijo Colonial	SR	PMC	Curitiba – Feira Livre
90.	Queijo Colonial	SR	PMC	Curitiba – Feira Livre
91.	Queijo Colonial	SR	PMC	Curitiba – Feira Livre
92.	Ricota Prensada	SIF	PMC	Curitiba – Feira Livre
93.	Queijo Colonial	SESA	8	Francisco Beltrão
94.	Queijo Minas Magro	SIF	PMC	Curitiba
95.	Ricota Fresca Prensada	SIF	PMC	Curitiba
96.	Ricota Fresca	SIF	PMC	Curitiba
97.	Ricota Fresca	SIF	PMC	Curitiba
98.	Queijo Colonial	SIF	7	Mariópolis
99.	Queijo Minas	SIF	PMC	Curitiba – Feira Livre
100.	Queijo Branco	SIF	PMC	Curitiba – Feira Livre

Nota:

SIF - Serviço de Inspeção Federal (Ministério da Agricultura)

SIP - Serviço de Inspeção do Paraná (Secretaria de Estado da Agricultura)

SIM - Serviço de Inspeção Municipal (Secretaria de Estado da Saúde - Vigilância Sanitária)

SESA - Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Paraná - Vigilância Sanitária

PMC – Prefeitura Municipal de Curitiba

SR - Sem registro

NC - Não Consta

4.1.3.Cepas padrões de referência

Os microrganismos, cepas padrões de referência, utilizados, nos testes do presente trabalho, foram fornecidas pelo Dr. Ernesto Hofer, do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz), Estado do Rio de Janeiro, pela Dra. Dilma Scala Gelli, do Instituto Adolfo Lutz (IAL), Estado de São Paulo, em ágar conservação e pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) em ampola liofilizada. As cepas disponibilizadas foram as seguintes:

Listeria innocua CIP 12612

Listeria monocytogenes L 46 - F 4555 CDC

Listeria ivanovii ATCC 19199

Listeria seeligheri CIP 9529

Listeria welshimeri CIP 11633

Listeria monocytogenes L 1/2a ATCC 19111-1
Listeria monocytogenes cepa padrão O7F7G
Staphylococcus aureus CIP 5710
Escherichia coli ATCC 12229
Enterobacter aerogenes ATCC 13048
Bacillus cereus ATCC 45.798
S. aureus ATCC 12.600
S. epidermidis ATCC 14.990

4.1.4.Meios de cultura, soluções, reagentes, insumos e diversos

4.1.4.1.Meios de cultura

Utilizaram-se meios de cultura formulados conforme Food and Drug Administratios (FDA), 1995 e disponíveis comercialmente dos Laboratórios Difco Ltda, Oxoid e Merck na forma desidratada.

a) Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

- Ágar tripticase soja sangue de carneiro (TSA)
- Caldo de enriquecimento para *Listeria* de acôrdo com o FDA (LEB)
- Caldo Fraser base
- Caldo Fraser base modificado
- Caldo de enriquecimento de *Listeria* tamponado (BLED)
- Agar cloreto de lítio feniletanol moxalactam seletivo para *Listéria*, formulado segundo LOVETT & HITCHINS (1988) e suplementado com esculina 1 g/l, citrato férrico amoniacal 0,5 g/l (LPM modificado)
- Ágar Oxford seletivo para *Listéria* (OXA)
- Ágar Palcam (PAL)
- Ágar tripticase de soja suplementado com 0,6 % de extrato de levedura (TSA - YE)
- Caldo tripticase de soja suplementado com 0,6 % de extrato de levedura (TSB - YE)
- Ágar infusão cérebro coração (BHI agar)
- Ágar sulfito indol motilidade com adição de 0,05% de cloreto de trifeniltetrazolium (SIM modificado)

- Caldo vermelho de metila/ Voges-Proskauer (Caldo VM / VP)
- Ágar tríplice açúcar ferro (TSI)
- Ágar sangue n° 2 suplementado com sangue desfibrinado de carneiro / cavalo
- Caldo nitrato
- Caldo púrpura de bromocresol para carboidratos
- Caldo púrpura de bromocresol com 0,5 % de rhamnose
- Caldo púrpura de bromocresol com 0,5 % de manitol
- Caldo púrpura de bromocresol com 0,5 % de xilose
- Ágar bile esculina inclinado
- VIP para Listéria (Biocontrol 600120)

b) Pesquisa de *Salmonella* spp.

- Água peptonada tamponada - APT (frasco de boca larga com 225 mL);
- Caldo Selenito-Cistina – SC (10 mL em tubos 16x160 com tampa de aço-inox);
- Caldo Rappaport-Vassiliadis Modificado - RV (10 mL em tubos 16x160 com tampa de aço-inox);
- Placas com ágar Salmonella -Shiguelia (SS);
- Placas com Ágar entérico de Hektoen (He);
- Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) (tubos 15 x 150 com tampa de baquelite)
- Agar lisina ferro (LIA) (tubos 15 x 150 com tampa de baquelite)

c) Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 45°C e *E. coli*

- Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST),
- Caldo Lactosado Verde Brilhante Bile 2% (VB)
- Caldo *Escherichia coli* (EC),
- Agar Eosina Azul de Metileno (EAM)
- Kit para identificação de entereobactérias (Newprov, 2002), contendo cinco tubos com os seguintes meios de cultura: Escola Paulista de Medicina Agar (EPM), Meio de Motilidade Indol Lisina (MILI), Meio de Motilidade, Indol e Ornitina (MIO), meio de citrato de Simmons, caldo Rhamnose.

d) Contagem de estafilococos coagulase positiva e *S. aureus*

- Frascos com 225 mL de água Peptonada 0,1% (diluyente);
- Tubos com 9 mL de água Peptonada 0,1% (diluyente)
- Placas com Ágar Baird-Parker (BP);
- Tubos de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI);
- Tubos com agar tripticase de Soja (TSA) inclinados
- Placas com agar Azul de Toluidina DNA

e) Contagem de *Bacillus cereus*

- Frascos com 225 mL de água Peptonada 0,1% (diluyente) ;
- Tubos com 9 mL de água Peptonada 0,1% (diluyente)
- Placas de Agar manitol gema de Ovo Polimixina (MYP) ou placas de Agar Base Seletivo para *Bacillus cereus* (ABC)
- Tubos de Ágar Nutriente (NA) inclinado
- Tubos de Caldo Vermelho de Fenol com 1% de glicose
- Tubos de Caldo VP modificado
- Tubos de Caldo Nitrato
- Tubos de Agar Motilidade para *Bacillus cereus*
- Placas de Agar Nutriente (NA)
- Agar tripticase de Soja (TSA) suplemento com Sangue de Carneiro
- Tubos de Agar Tirosina.

f) Contagem de Clostrídios sulfito redutores a 46° C e de *Clostridium perfringens*

- Frascos com 225 mL de água Peptonada 0,1% (diluyente) ;
- Tubos com 9 mL de água Peptonada 0,1% (diluyente)
- Ágar triptose Sulfato Cicloserina (TSC);
- Tubos de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI);
- Tubos com meio de Tioglicolato;
- Tubos com meio de Lactose Gelatina;
- Tubos de Ágar Nitrato Motilidade;

4.1.4.2 Soluções, reagentes, insumos e diversos

a) Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

- Reagentes para redução de nitrato
(Sol. A): ácido sulfanílico 0,8 % em ácido acético 5 N.
(Sol. B): alfa naftol 0,5 % em ácido acético 5 N
- Zinco em pó livre de nitrato ou nitrito
- Reagente de Barrit para prova de Voges-Proskauer: sol. alcoólica a 5 % de alfa naftol
- Solução de KOH a 40 %
- Creatina em cristais
- Solução desinfetante de álcool iodado
- Peróxido de hidrogênio a 3 %
- Etanol a 70 %
- Água destilada estéril.
- Solução salina tamponada a p H 7,2
- Cloreto de Lítio solução 8 M
- MOPS Ácido Livre Sigma M –1254 (3 – [N-Morpholino] propanesulfonic acid]
- MOPS sal sódico Sigma M – 9381 (3 – [N-Morpholino] propanesulfonic acid sodium salt]
- Tampão TBE 10 x : Tris 54,0 g; Ácido bórico (H₃BO₃) 27,5 g; EDTA 4,65 g; H₂O deionizada q.s.p. 500 mL . O pH final foi ajustado para 8,0. Diluir 10 vezes no momento do uso.
- Gel de Agarose 1,5% com Brometo de Etídeo : Agarose 0,75g; Tampão TBE 1x q.s.p. 50mL ; Brometo de Etídeo 5µL.
- Água ultrapura
- Proteinase K (500 µg/µL)
- Etanol absoluto
- Tampão PCR 1x,
- *Taq* DNA polimerase 2,5 Unidades,

- *primer*,
 - dNTP,
 - Cloreto de magnésio (MgCl₂) PA
- b) Pesquisa de *Salmonella* spp.
- Soro polivalente somático;
 - Soro fisiológico 0,85%
- c) Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 45°C e *E. coli*
- Reativo de Kovacs
- d) Número Mais Provável (NMP) de estafilococos coagulase positiva e *S. aureus*
- coagulase plasma-EDTA
 - Peróxido de hidrogênio 3%
- e) Contagem de *Bacillus cereus*
- Vaselina líquida ou óleo mineral estéril
 - Metanol p.a.
 - Reagente de Barrit para teste de VP
 - Reagentes para Teste de Nitrato
 - Pó de zinco livres de nitrito e nitrato
 - Solução aquosa 0,5% de fucsina básica
- f) Contagem de *Clostridium* sulfito redutor a 45° C
- Sistema gerador de anaerobiose
 - Solução 4% de *D*-cicloserina
 - Reagentes para Teste de Nitrato (Solução 0,8% de ácido sulfanílico, solução 0,5% de alfa- naftol);
 - Pó de zinco livre de nitrato e nitrito;
 - Peróxido de Hidrogênio 3%;

4.2. MÉTODO

As amostras coletadas nos pontos de comercialização foram avaliadas conforme os parâmetros preconizados na RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001

(contagem de estafilococos coagulase positiva, NMP de coliformes a 45°C e Pesquisa de *Salmonella* spp em 25 g), a Pesquisa de *Listeria* spp. e a determinação de umidade em estufa a vácuo até peso constante com o objetivo de enquadrar a amostra de queijo na classificação quanto a umidade segundo RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. De acordo com esta Resolução da Agencia de Vigilância Sanitária / Ministério da Saúde, os queijos são classificados com baixo, médio, alto e muito alto teor de umidade o que faz variar o padrão microbiológico e conseqüentemente a sua avaliação. Esta resolução determina os padrões microbiológicos para os produtos expostos à venda no comércio ou, de alguma forma, destinados ao consumo e estabelece zero tolerância para *Listeria monocytogenes* apenas para queijos de média umidade (Danbo, pategrás, sandwich, prato, tandil, tilsit, tybo, mussarela curado e similares e de queijo ralado e em pó, quartirol, cremoso, crioll, mussarela e similares; de alta e muita alta umidade, com bactérias lácticas abundantes e viáveis, incluindo o Minas frescal correspondente; de muita alta umidade incluindo os queijos de coalho com umidade correspondente, Minas frescal, mussarela e outros, elaborados por coagulação enzimática, sem a ação de bactérias lácticas.

Para as amostras relacionadas a evento de DTA não foi realizada a avaliação da umidade e as mesmas foram submetidas à análise microbiológica objetivando a pesquisa do possível agente causador do surto de DTA procedendo-se às metodologias de contagem de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, Clostrídios sulfito redutores a 46°C, NMP de *Escherichia coli* e pesquisa de *Salmonella* spp.

Para a detecção, isolamento e identificação de contaminantes microbianos utilizou-se metodologia básica descrita no Bacteriological Analytical Manual (BAM), elaborado pelo Food and Drug Administration (FDA), 1995; Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, (1992) utilizando critério de contagens por grama e pesquisa em 25 gramas da amostra.

A pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi realizada pelo método convencional com modificações, descrita no Bacteriological Analytical Manual (BAM) elaborado pelo Food and Drug Administration (FDA), 1995 e pelo rápido ensaio visual de imunoprecipitação (VIP) método AOAC 997.03 utilizando critério de presença e ausência em 25 gramas da amostra.

4.2.1 Recepção e preparação das amostras para análise

Na recepção das amostras coletadas nos pontos de comercialização foram observadas as condições de integridade das embalagens e as condições em que foi feito o transporte da amostra (se as amostras se mantinham sob refrigeração), antes de ser aceita para análise. A preparação das amostras para análise envolveu duas etapas: (a) a retirada da fração para análise que foi feita de forma a garantir que a porção removida representasse o conteúdo da unidade de amostra. As frações para análise, porções de 25 g das amostras, foram retiradas assepticamente em cabine de segurança biológica, e colocadas em sacos plásticos estéreis, próprios para o Stomacher.

(b) a preparação do homogeneizado e das correspondentes diluições decimais seriadas da unidade analítica, para inoculação nos meios de cultura. A primeira diluição (10^{-1}) foi obtida pela homogeneização da unidade analítica (25 g), por dispersão em “Stomacher” durante 30 segundos com 225 mL de água peptonada 1,0%. Para a preparação da segunda diluição (10^{-2}), transferiu-se assepticamente 1,0 mL da diluição 10^{-1} para 9,0 mL de diluente. As diluições subsequentes foram obtidas de maneira similar, transferindo-se 1,0 mL da diluição anterior para 9,0 mL de diluente. O número de diluições realizadas foi em função do limite microbiológico estabelecido na RDC 12 de 02/01/2001 para os parâmetros NMP de coliformes a 45°C e contagem de estafilococos coagulase positiva. Para os queijos envolvidos em DTA procedeu-se aos ensaios de contagem de *S. aureus*, *B. cereus*, Clostrídios sulfito redutores a 46°C, NMP de *Escherichia coli* realizou-se diluição de até 10^{-5} . Para a pesquisa de *Salmonella* spp. e *Listeria* spp foram retiradas novas alíquotas de 25 g para cada método e adicionados os diluentes específicos conforme metodologia seguida.

4.2.2 Método convencional para pesquisa de *Listeria monocytogenes*

A pesquisa de *Listeria monocytogenes* pelo método convencional (Figura 4) constituiu-se de enriquecimento em caldo de enriquecimento para *Listeria* (LEB) por 24 e 48 horas a 30°C e estriamento na superfície dos meios seletivos Ágar cloreto de lítio feniletano moxalactam modificado (LPM), Ágar Oxford seletivo para *Listéria* (OXA) e Ágar Palcam

(PAL). Foram selecionadas 5 colônias suspeitas e isoladas para os testes de identificação em nível de gênero: crescimento em forma de “guarda-chuva” em meio semi-sólido sulfito-indol motilidade com adição de 0,05% de TTC (cloreto de trifeniltetrazolium); produção de catalase; produção de ácido a partir de glicose, lactose e sacarose em ágar triptice açúcar ferro (TSI); reação ao teste de vermelho de metila e Voges-Proskauer e a prova de bile-esculina. Os testes bioquímicos em nível de espécie envolveram: redução de nitrato; produção de hemolisina em ágar sangue com base de Columbia suplementado com sangue de carneiro; fermentação de xilose, ramnose e manitol em meio básico de púrpura de bromocresol e teste da hemólise sinérgica do fator CAMP (Christie–Atkins–Munch-Peterson teste) em ágar sangue de carneiro. A partir do cultivo do microrganismo a 30°C por 18-24 horas em ágar nutriente realizou-se soroglutinação rápida com anti-soro homólogo somático. Os isolados obtidos a partir dos testes de identificação foram enviados ao Instituto Adolfo Lutz para confirmação e caracterização bioquímica e sorológica complementar.

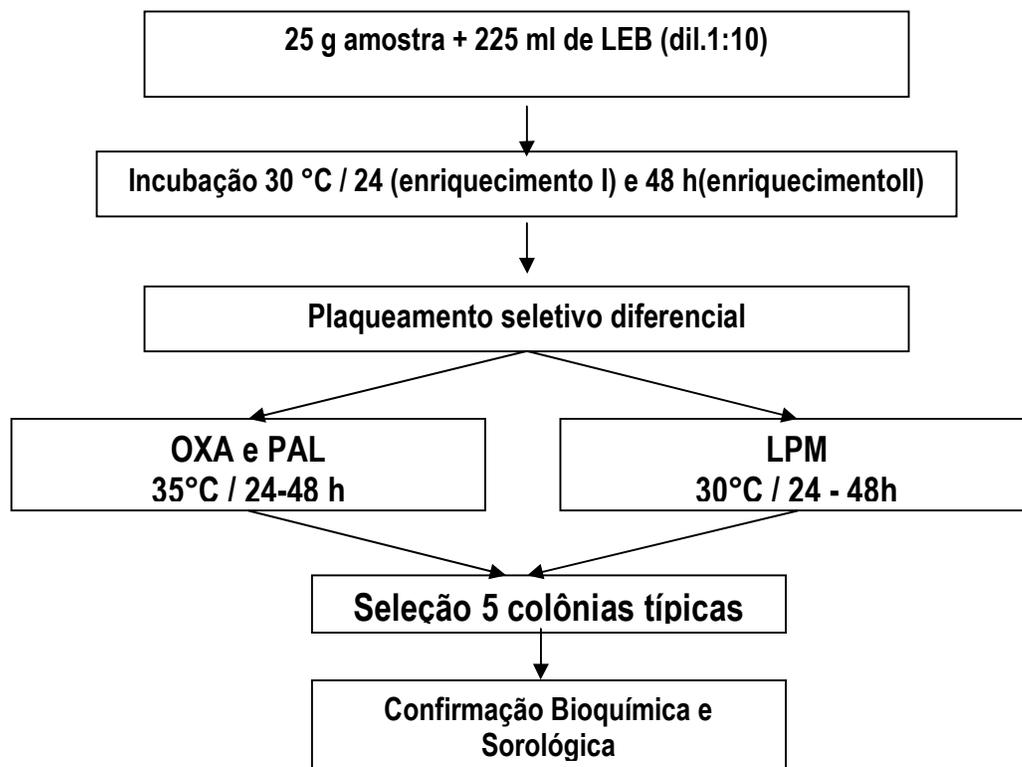


FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DE ETAPAS PARA A DETECÇÃO DE *Listeria* spp PELO MÉTODO CONVENCIONAL

FONTE: FDA, 1995.

4.2.2.1 Enriquecimento seletivo

Vinte e cinco gramas de cada amostra de queijo (alíquota da superfície) foram pesadas assepticamente em sacos plásticos estéreis para "Stomacher" e acrescidos de 225 mL do caldo de enriquecimento para *Listeria* (LEB), homogeneizados a seguir por 2 minutos em "Stomacher" por 30 segundos e incubados a 30°C por 24 horas (enriquecimento I).

A partir do LEB, submeteu-se ao plaqueamento em meios seletivos e re-incubação do LEB a 30 ° C por mais 24 horas (enriquecimento II) para posterior plaqueamento nos meios seletivos.

4.2.2.2 Plaqueamento seletivo diferencial

Os frascos de enriquecimento seletivo (I e II enriquecimentos) foram agitados cuidadosamente e estriados utilizando uma alça de níquel–cromo por esgotamento na superfície das placas de Petri contendo Ágar Oxa, Ágar LPM modificado. As placas de Ágar OXA e PAL foram incubadas a 35°C por 24 - 48 horas e de Ágar LPM modificado a 30°C por 24- 48 horas.

Após a incubação das placas de Ágar OXA, Ágar PAL e Ágar LPM modificado por 24 horas foram observadas a presença de colônias típicas e, em caso negativo re-incubadas as placas nas respectivas temperaturas e as placas foram observadas novamente após 48 horas de incubação.

As colônias típicas de *Listeria* spp em Ágar OXA, Ágar PAL e Ágar LPM modificado apresentaram-se como esféricas, pretas, rodeadas por um halo preto de hidrólise da esculina. Foram selecionadas 5 colônias de cada placa contendo colônias típicas para posterior confirmação.

4.2.2.3 Confirmação das colônias típicas

A confirmação das colônias típicas seguiu o esquema da Figura 5. Sendo que cada colônia selecionada foi estriada por esgotamento em placas de ágar Trypticase de Soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSA- YE), e incubada a 30°C/24-48 horas, tendo como objetivo sua purificação. Observou-se sob luz oblíqua e foram selecionadas colônias azuladas típicas.

Com o auxílio de uma alça de inoculação, foram transferidas as colônias selecionadas para um tubo de TSA–YE inclinado e um tubo de TSB–YE. A incubação dos tubos foi realizada a 30° C por 24 horas. Foi usado a cultura em ágar ou caldo para a realização das provas bioquímicas. Os tubos de TSB–YE a 4°C foram mantidos por vários dias e utilizados repetidamente como inóculo quando fossem necessários.

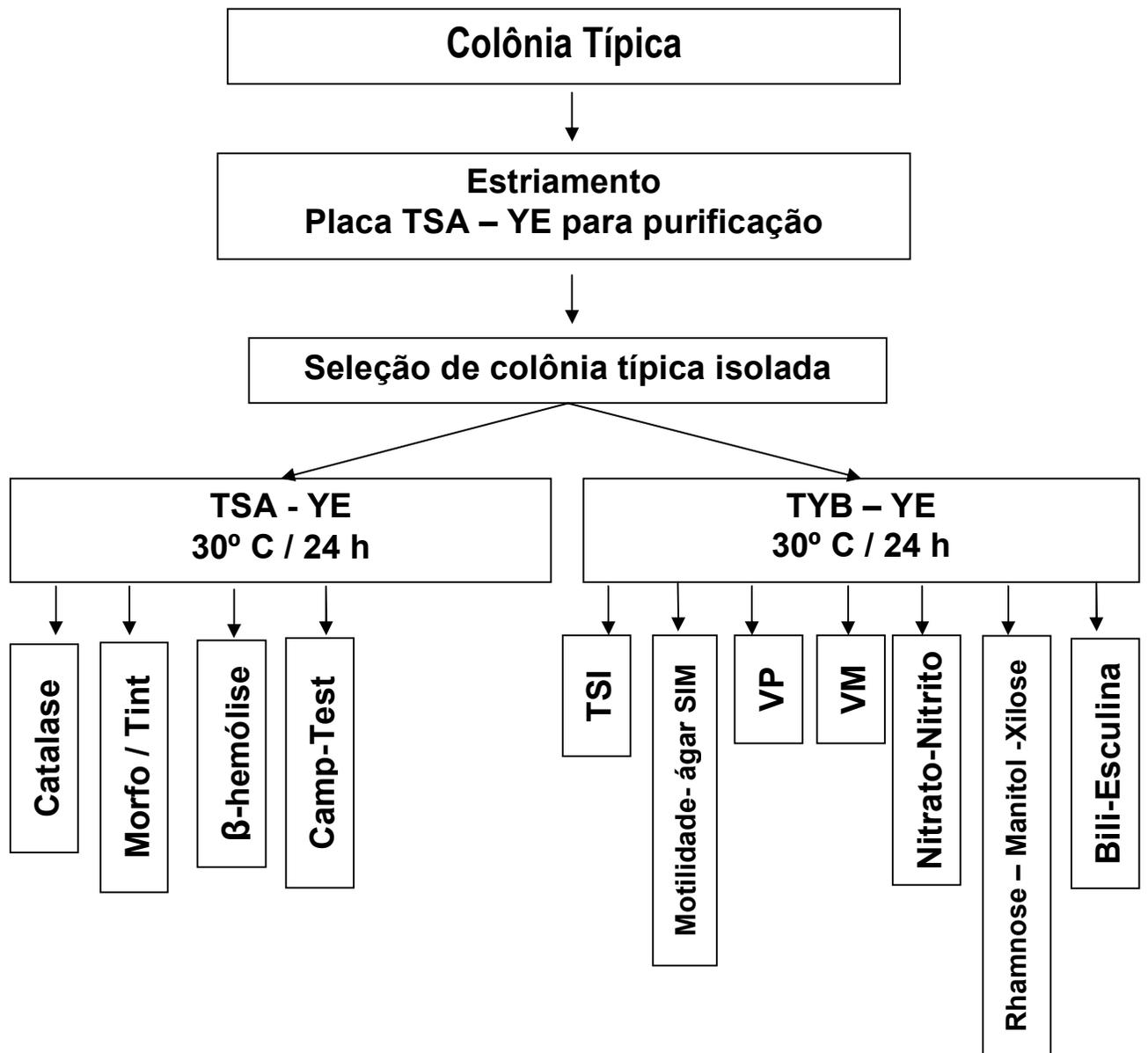


FIGURA 5 - DIAGRAMA DAS ETAPAS PARA A CONFIRMAÇÃO DAS COLÔNIAS TÍPICAS DE *Listeria* spp

FONTE: FDA, 1995.

A - Reação de catalase (MAC FADDIN, 1976; LOVETT, 1987)

A partir do tubo de TSA-YE, foi transferida uma alçada da cultura para uma lâmina de microscopia, e esta foi coberta com uma gota de peróxido de hidrogênio 3%

sendo observado a ocorrência de borbulhamento imediato (teste positivo) ou não borbulhamento (teste negativo). As cepas de *Listeria* são catalase positivas.

B - Propriedades morfológicas e tinturiais

A partir do tubo de TSA-YE, transferiu-se uma alçada da cultura para uma lâmina de microscopia contendo uma gota de água estéril e procedeu-se à coloração de Gram. *Listeria* spp apresentam-se como bastonetes curtos ou em forma cocóide Gram positivos.

C - Beta-Hemólise

Foi realizada em placa de ágar sangue com base de Columbia suplementado com sangue de carneiro e previamente seca e demarcada com uma caneta de retroprojektor de 4 a 25 setores no fundo. A partir dos tubos de TSA-YE, cada um das culturas suspeitas foi inoculado por picada, em um dos setores demarcados bem como controles positivo e negativo (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. innocua*). As placas foram incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas ± 2 horas e observadas a formação de um halo transparente de hemólise ao redor das colônias.

As cepas de *Listeria monocytogenes* formam halos discretos que não se estendem muito para fora da região da colônia, enquanto a *Listeria ivanovii* forma halos grandes e bem definidos e a *Listeria innocua* não apresenta hemólise.

D - Prova do comportamento em tríplice açúcar ferro (MAC FADDIN, 1976; LOVETT, 1987)

A partir dos tubos de TSB-YE cada cultura foi inoculada em um tubo de TSI por picada em profundidade e estrias na rampa. A incubação dos tubos foi realizada a 35°C / 24 horas com a tampa ligeiramente afrouxada objetivando a manutenção de condições aeróbias e prevenindo reações ácidas errôneas na rampa. Após período de incubação, foi efetuada a leitura dos resultados e observada a ocorrência de reação típica de

Listeria. Os tubos foram re-incubados por mais 24 horas quando não eram observadas reações típicas nas primeiras 24 horas. *Listeria monocytogenes* apresenta rampa e fundos ácidos (amarelos) sem produção de H₂S (não escurecimento do ágar).

E - Prova da motilidade (MAC FADDIN, 1976; LOVETT, 1987)

A partir dos tubos de TSB-YE foram inoculados cada cultura suspeita em um tubo de ágar SIM, por picada no centro do meio de cultura até uma distância de 1 cm do fundo. Os tubos foram incubados a 25°C/7 dias, e observando diariamente.

As cepas de *Listerias* são móveis e desenvolvem uma zona de migração típica, espalhando-se na parte superior do meio e mantendo-se restritas a picada no fundo do tubo. Esse tipo de migração produz uma massa de crescimento característico lembrando um guarda-chuva.

F - Prova do Camp-test: Christie-Atkins-Munch-Peterson teste (McCLAIN; LEE, 1988)

De forma paralela e ao longo da linha média de uma placa de ágar sangue de carneiro, foram inoculadas com alça de níquel-cromo, uma cultura de 18 –24 horas de *Staphylococcus aureus* hemolíticos, cultivado em caldo infuso de cérebro coração, e uma cultura de *Rodococcus equi*. Em seguida, as cepas de identificação foram semeadas perpendicularmente aos inóculos de *S. aureus* e *R. equi*, porém, sem tocá-los formando ângulos reto. Após a inoculação, as placas foram colocadas em jarra “GasPak” em ambiente de microaerofilia e mantidas em incubadora tipo B.O.D a 30°C 48 a 72 horas. O teste foi considerado positivo para *Listeria monocytogenes* quando a cultura produziu zonas de hemólise próximo ao crescimento de *Staphylococcus aureus*, mas não *R. equi*.

G - Teste de Voges-Proskauer - “VP” (MAC FADDIN, 1976; LOVETT, 1987)

A partir da cultura pura em TSB-YE foi transferida uma alçada para tubo contendo caldo VM-VP, e incubado a 35°C/48 horas. Após período de incubação foi

adicionado 3,0 mL de solução alcoólica de alfa-naftol a 5% e 1,0 mL de solução aquosa de hidróxido de potássio a 40% e procedeu-se a agitação. Os tubos foram deixados em repouso por 1 a 2 horas. O aparecimento da cor vermelha escura indica reação VP positiva. *Listeria monocytogenes* apresenta reação VP positiva.

H - Teste de vermelho de metila - "VM" (MAC FADDIN, 1976; LOVETT, 1987)

A partir da cultura pura em TSB-YE foi transferida uma alçada para outro tubo contendo caldo VM-VP, e incubado a 35°C por 4 dias. Após incubação foi adicionado 2 a 3 gotas de solução alcoólica de vermelho de metila. O aparecimento da cor vermelha indica reação VM positiva. *Listeria monocytogenes* apresenta reação VM positiva.

I - Redução do nitrato a nitrito (MAC FADDIN, 1976; LOVETT, 1987)

A partir da cultura pura em TSB-YE foi transferida uma alçada para tubo contendo 5 mL de caldo nitrato e incubado a 35°C por 5 dias. Após incubação foi adicionado 0,2 mL do reagente A (ácido sulfanílico 0,8% em ácido acético 5N) e a seguir 0,2 mL do reagente B (alfa-naftol 0,5 em ácido acético 5N) .

O aparecimento de cor vermelha indica reação positiva pela redução de nitrato a nitrito. Quando não ocorreu desenvolvimento de cor vermelha foi adicionado ao meio pó de zinco. O aparecimento de coloração vermelha indica reação negativa. *Listeria monocytogenes* não reduz nitrato a nitrito.

J - Prova de fermentação da rhamnose, manitol e xilose (COSTA; HOFER, 1976; MACFADDIN, 1976)

A partir da cultura em caldo TSB-YE foram semeados tubos de caldo púrpura de bromocresol contendo 0,5% de rhamnose, 0,5% de manitol e 0,5% de xilose e incubados a 35°C por sete dias. A fermentação do carboidrato é constatada pela mudança de coloração do indicador púrpura de bromocresol para amarelo e a produção de gás é observada no tubo de Durham. Quando as espécies de *Listeria* fermentam o

carboidrato, produzem ácido sem formação de gás. *Listeria monocytogenes* fermenta a rhamnose e a xilose e não fermenta o manitol

K - Bile esculina (COSTA; HOFER, 1976; MACFADDIN, 1976)

A partir da cultura pura em TSB-YE foi repicado com agulha em tubos contendo ágar bile esculina e incubados a 35°C por 24-48 horas. O aparecimento de coloração negra em todo o tubo, indica bile esculina positiva. *Listeria monocytogenes* é bile-esculina positiva.

4.2.2.4 Teste sorológico – soroaglutinação rápida

A partir do cultivo de 18-24 horas do microrganismo a 30°C em Agar TSA-YE, em tubo inclinado procedeu-se a lavagem da cultura com 1 mL de solução salina tamponada a pH 7,2. Em lâmina de vidro misturou-se uma gota da suspensão com uma gota de anti-soro. Aguardou-se de 1 a 2 minutos. Simultaneamente foi misturada uma gota da suspensão com salina tamponada para controle.

A ocorrência de reação antígeno-anticorpo, foi visualizada pela ocorrência de aglutinação na lâmina com o antisoro homólogo e ausência de aglutinação na lâmina com salina tamponada.

4.2.3 Metodologia VIP para pesquisa de *Listeria* spp.

4.2.3.1 Enriquecimento seletivo primário

Vinte e cinco gramas de cada amostra de queijo (alíquotas da superfície) foram pesadas assepticamente em sacos plásticos estéreis para “Stomacher” e acrescidos de 225 mL do caldo Fraser Modificado com Cloreto de Lítio 8 M, homogeneizado a seguir em “Stomacher “ por 30 segundos e incubados à 30°C por 28 horas (enriquecimento primário)

4.2.3.2 Enriquecimento seletivo secundário

Agitou-se delicadamente o frasco contendo o enriquecimento seletivo primário e transferiu-se 1 mL deste homogeneizado para um tubo de ensaio com 9 mL de Caldo de enriquecimento de listeria tamponado (BLED) , incubando-se a 30°C por 24 horas.

4.2.3.3 Inoculação do sistema reagente

Conforme recomendação do manual do fabricante, foram transferido 1 mL do caldo BLED para tubo de ensaio e colocou-se em aquecimento em banho-maria a 100°C por 5 minutos com a finalidade de liberar o antígeno somático. Após resfriamento em temperatura ambiente, foi transferida uma alíquota de 0,2 mL para a área com formato circular onde se adiciona a amostra.

4.2.3.4 Leitura do sistema reagente

Após 10 minutos, foi observada a presença de uma linha cinza na cavidade de resultado (B) do kit, a qual indica a presença de antígenos flagelares de *Listeria* spp., e portanto, considerado como resultado positivo. A ausência da linha cinza indica resultado negativo.

O aparecimento de uma linha cinza em vinte minutos na cavidade controle (C), indica o correto funcionamento do dispositivo, caso contrário, deve-se repetir o teste com outro dispositivo. A diferença de intensidade da coloração azul, tanto na cavidade de resultado como de controle, não afeta a interpretação dos resultados, a não ser que ocorra uma linha muito forte na cavidade de resultado, e ausência da linha na cavidade controle. Neste caso, ocorre um excesso de antígenos flagelares havendo necessidade de diluir a amostra. As possíveis leituras do sistema reagente VIP estão apresentadas na figura 6.



0,1 mL amostra em eluição



O eluato reage com a zona de interface de reagentes. Se estiverem presentes os antígenos, estes formam um complexo antígeno/anticorpo



A eluição continua pela zona de detecção. Após alguns minutos à temperatura ambiente, uma linha se forma na janela teste (positivo)



A eluição continua pela zona de verificação. Outra linha irá se formar indicando a finalização do teste.

FIGURA 6 - LEITURA DO SISTEMA VIP

FONTE: Biosystem, 2008.

4.2.3.5 Plaqueamento seletivo diferencial e identificação bioquímica e sorológica preliminar

As amostras positivas foram submetidas a partir do BLED ao plaqueamento seletivo diferencial em Agar PAL, Agar LPM e Agar OXA e posterior purificação e identificação pela seleção de cinco colônias suspeitas por placa, a testes de identificação a nível de gênero, espécie e sorologia conforme descrição realizada no método anterior. O procedimento para a detecção de *Listeria* spp pelo método VIP está apresentada na figura 7.

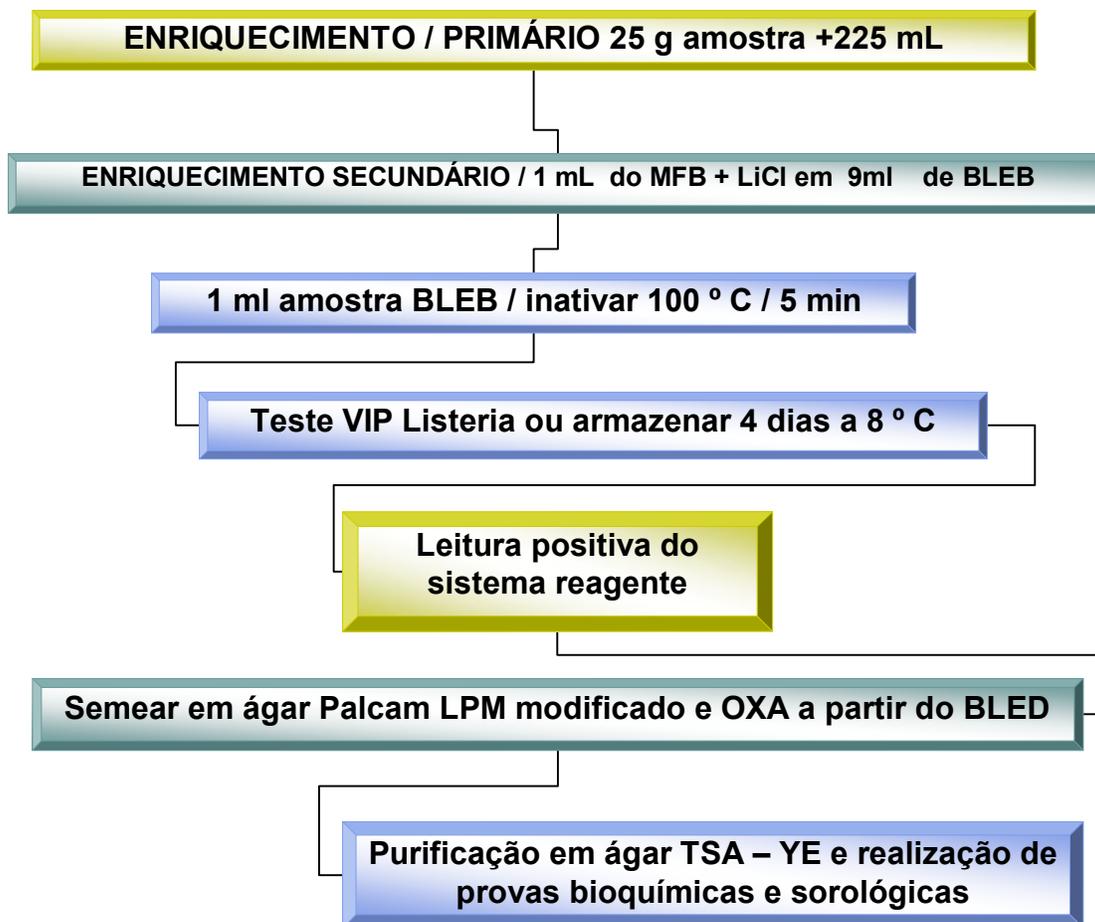


FIGURA 7 - PROCEDIMENTO DE DETECÇÃO DE *Listeria* spp. PELO VIP

FONTE: Biossystem, 2008.

4.2.4 Caracterização bioquímica, sorológica complementar e genotipagem dos isolados de *Listeria* spp.

A caracterização das cepas de *Listeria* foi realizada na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, na cidade de São Paulo, na qual foi utilizado uma bateria de testes para verificar o perfil bioquímico conforme LOVETT(1988) e a técnica de soroglutinação em lâmina, utilizando-se antissoros policlonais absorvidos (antissoros de fatores somáticos “O” e flagelares “H”).

Para enfatizar a importância do ponto de vista de saúde pública foi realizado em 2005 ensaios complementares sorológicos e genotipagem.

A sorotipagem foi realizada com apoio do laboratório de Zoonoses do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ - RJ).

A genotipagem dos isolados de *Listeria monocytogenes* foi realizada pela técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) no Serviço de Ciências Bioquímicas / Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Ezequiel Dias - FUNED. Foram utilizados quatro diferentes iniciadores aleatórios (OPA 1 GTT GGT GGC T; OPA 4 GGG AAC GTG T; OPA 6 GGT GGT CAA G e OPA 7 AGG GTC GTT C) com o seguinte programa de PCR :

1. 95°C 5 minutos;
2. 30°C 2 minutos
3. 72°C 1 minuto
4. 95°C 30 segundos
5. repetir 1x a partir do passo 2
6. 37°C 2 minutos
7. 72°C 1 minuto
8. 95°C 30 segundos
9. repetir 32x a partir do passo 6
10. 37°C 1 minuto
11. 72°C 5 minutos
12. 4°C por tempo indeterminado
13. FIM

A árvore filogenética foi constituída a partir do método UPGMA / programa Treeconw.

4.2.5 Indicadores usados para avaliação das metodologias utilizadas na pesquisa de *Listeria* spp. (método convencional e VIP)

A sensibilidade (S) de um método está relacionada com a sua capacidade de não apresentar resultados falso-negativos (FN) e, a especificidade (E), com sua capacidade de não apresentar resultados falso-positivos (FP).

Neste experimento foram considerados verdadeiros positivos, os resultados identificados como *Listeria*, em nível de espécie, pelos testes bioquímicos convencionais e o resultado obtido pelo Instituto Adolfo Lutz. Foram considerados falso-negativos quando uma mesma amostra apresentou resultado positivo para *Listeria* spp. em uma metodologia e negativo em outra metodologia. Sensibilidade e especificidade dos métodos foram avaliadas pelas seguintes equações (Figura 8) (BEUMER *et al.*, 1991):

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}} \times 100$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}} \times 100$$

Onde:

VP = verdadeiramente positivo

VN = verdadeiramente negativo

FP = falso-positivo

FN = falso-negativo

FIGURA 8 - FÓRMULA PARA AVALIAÇÃO DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DE MÉTODOS DE DETECÇÃO

4.2.6 Análise Estatística dos Dados

Foram aplicados testes estatísticos não-paramétricos para análise dos dados pelo coeficiente de concordância de Kappa utilizando o programa Epi Info versão 6.04d.

4.2.7 Pesquisa de *Salmonella* spp.

A - Pré-enriquecimento em caldo não seletivo

O esquema de análise para detecção da *Salmonella* spp. em alimentos está apresentado na figura 9. Vinte e cinco gramas da amostra foram pesadas

asépticamente e adicionadas de 225 mL de caldo de pré-enriquecimento (APT) com homogeneização em “Stomacher”. Os frascos foram incubados a $35 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ em estufa bacteriológica por 24 horas, com as tampas ligeiramente afrouxadas.

B-Enriquecimento em caldo seletivo

Após incubação, o frasco com o caldo de pré-enriquecimento foi agitado delicadamente e foi transferido deste 1,0 mL para 10,0 mL de Caldo Selenito Cistina (SC) e 0,1 mL para 10,0 mL de Caldo Rappaport -Vassiliadis Soja Peptona (RVS) os quais foram incubados em estufa bacteriológica a $42 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

C - Plaqueamento seletivo diferencial

Os enriquecimentos em caldo seletivo foram estriados na superfície de placas de Ágar Salmonella - Shiguelia (SS) e Agar Hectoen (HE) que foram posteriormente incubadas de forma invertidas a $35 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Após período de incubação foi verificado o desenvolvimento de colônias típicas de *Salmonella*.

Em HE as colônias típicas apresentam-se transparentes, verde-azuladas, com ou sem centro preto. As cepas fortemente produtoras de H_2S podem produzir colônias inteiramente pretas. Em SS as colônias típicas apresentam-se transparentes geralmente com centro negro.

D - Confirmação bioquímica e sorológica

Quando da ocorrência de colônias típicas foram selecionadas duas colônias típicas de cada placa para confirmação preliminar nos tubos de Ágar Lisina Ferro (LIA) e Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI). Com o auxílio de uma agulha de inoculação, foi removida uma porção da massa de células, do centro da colônia típica e inoculada em tubos inclinados de Ágar LIA e Ágar TSI. A inoculação foi feita por picada e estrias na rampa, foi utilizada a mesma alçada para inocular ambos os tubos. Não é necessário nem recomendado flambar a agulha e retirar outra porção da colônia, entre um tubo e

outro. Os tubos foram incubados a $35 \pm 0,2^\circ\text{C}$ por 24 horas e foi observada a ocorrência de reação típica de *Salmonella*:

Reação típica de *Salmonella* spp. em TSI: rampa alcalina (vermelha) e fundo ácido (amarelo), com ou sem produção de H_2S (escurecimento do ágar). Reação atípica e, TSI, que não deve ser descartada se as demais reações em LIA se apresentarem típicas: rampa e fundo ácidos (amarelos), com ou sem produção de H_2S .

Reação típica de *Salmonella* spp. em LIA: fundo e rampa alcalinos (púrpura, sem alteração da cor do meio), com ou sem produção de H_2S (escurecimento do meio). Reação atípica em LIA, que não deve ser descartada se as demais reações em TSI se apresentarem típicas: fundo amarelado com rampa alcalina, com ou sem produção de H_2S . Quando as placas de HE ou SS apresentaram colônias típicas, porém não isoladas de *Salmonella*, foi estriada uma alçada da colônia, tomada no centro e sem tocar nas colônias adjacentes, em placas de HE e SS, para purificação da cultura. Somente então, a partir da cultura pura, foi inoculado os tubos de LIA e TSI.

Os tubos de TSI utilizados foram inclinados com fundo de no mínimo 2,5 cm e incubados com a tampa ligeiramente afrouxada, para manter condições aeróbicas. Este cuidado objetivou prevenir a excessiva produção de H_2S e reações ácidas errôneas na rampa. Se ainda assim, ocorrendo excessiva produção de H_2S , mascarando a reação ácida do fundo, assumiu-se a reação como típica. Os tubos de LIA utilizados foram inclinados com fundo de no mínimo 2,5 cm e incubados com a tampa bem fechada, porque a reação de descarboxilação da lisina ocorre em anaerobiose. A exclusão do ar previne falsos resultados positivos resultantes da desaminação oxidativa das peptonas do meio de cultura. A partir da cultura de 24 horas em TSI com reação suspeita de *Salmonella* foi realizado o teste sorológico somático polivalente em lâmina de vidro ou placa de Kline. Em dois quadrados foram colocadas duas gotas de soro fisiológico e uma alçada do microrganismo a partir o Agar TSI. A cultura foi bem emulsionada. Sobre um dos quadrados foi adicionada uma gota de anti-soro polivalente anti-*Salmonella* e foi bem emulsionado. Segurando a lâmina contra um fundo preto bem iluminado, foram feitos delicados movimentos de inclinação e rotação da lâmina, para movimentar a emulsão, por um minuto, foi então observado a ocorrência de aglutinação no quadrado com o anti-soro (prova positiva). Foi comparado com a aparência da emulsão no

quadrado com salina (controle negativo), para não confundir a aparência turva da emulsão com a reação de aglutinação. Eventualmente pode ocorrer aglutinação em ambos os quadrados (reação inespecífica), provavelmente causada por cepas rugosas e auto-aglutináveis.

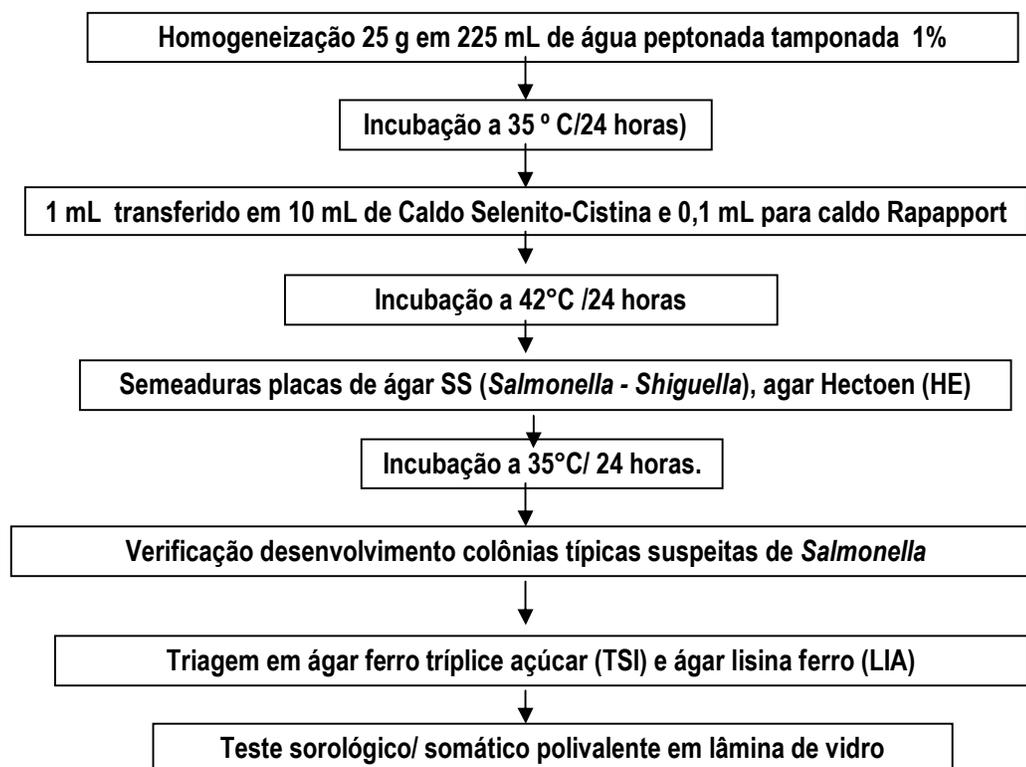


FIGURA 9 - ESQUEMA DE ANÁLISE PARA DETECÇÃO DE *Salmonella* spp. EM ALIMENTOS
FONTE: FDA, 1995.

4.2.8 Número mais provável de coliformes a 45°C

Foi usada a técnica dos tubos múltiplos, com três séries de três tubos em cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) Foi utilizado como meio presuntivo o Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), com incubação a 35 °C (24 - 48 horas). Após, leitura, os tubos positivos, que apresentaram gás foram repicados para Caldo *Escherichia coli* (EC), os quais foram incubados a 35° C (24 - 48 horas) e a 45,0° C (24-48 horas) em Banho–Maria rotativo marca Marconi conforme Figura 10. A determinação do número mais provável de

coliformes a 45°C por grama da amostra (NMP/g) foi feita pela Tabela de Hoskins (VANDERZANT; SPLITTSTOESSER, 1992).

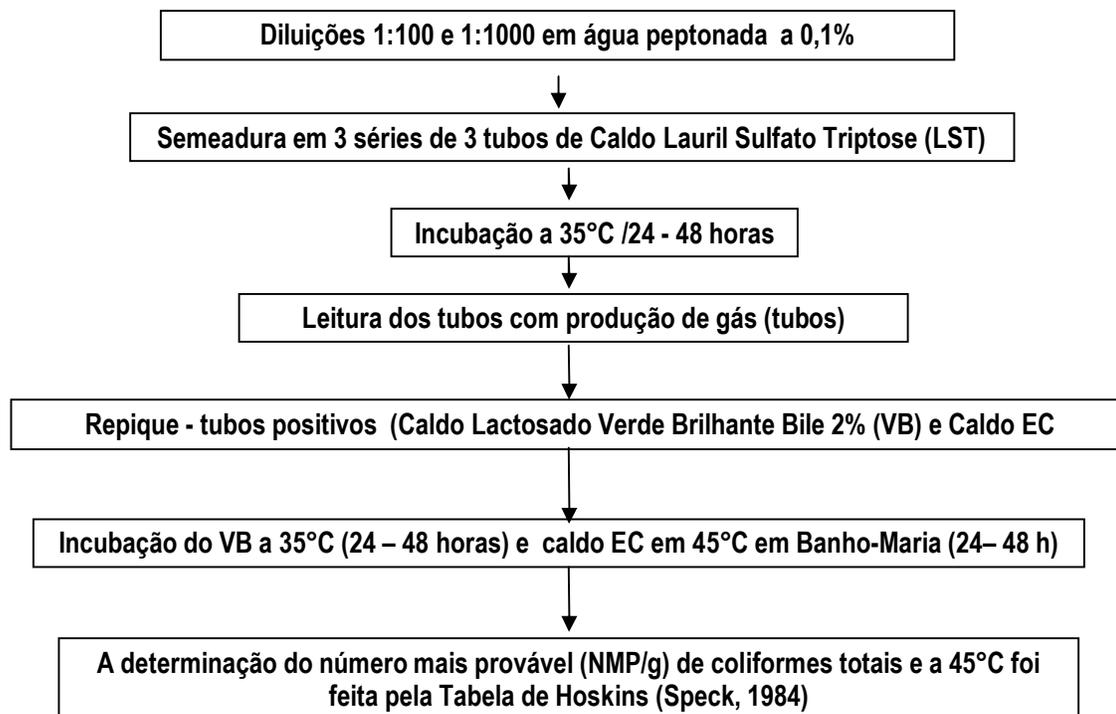


FIGURA 10- ESQUEMA DEMONSTRADO A TÉCNICA DE NMP DE COLIFORMES A 45° C e *E.coli*

FONTE: FDA, 1995.

4.2.9 Número mais provável de *Escherichia coli*

Uma alíquota dos tubos contendo caldo EC, que apresentavam turbidez com gás no interior do tubo de Durham, foi semeada em placas de petri contendo Ágar Eosina Azul de Metileno (EAM) e incubada a 35° C por 24 horas. As colônias suspeitas de *Escherichia coli* foram repicadas em Ágar padrão (PCA) inclinado e incubado a 35°C por 24 horas. A partir das culturas puras em PCA foram inoculadas em sistema de identificação de entereobactérias contendo cinco tubos com os seguintes meios de cultura: EPM (Meios da Escola Paulista de Medicina para determinação da urease,

produção de H₂S, gás, desaminação do triptofano), MILI (Meio de motilidade, produção de indol e descarboxilação da lisina), MIO (Meio de motilidade, descarboxilação da ornitina e indol), citrato de Simmons (meio para prova de utilização do substrato) e Rhamnose (Meio com rhamnose para verificar se o Bacilo Gram Negativo fermenta ou não este açúcar).

4.2.10 Contagem de estafilococos coagulase positiva e *S. aureus*

Foram inoculadas em placas previamente preparadas e secas, 0,1 mL das diluições selecionadas de amostra em ágar Baird-Parker suplementadas com emulsão de gema de ovo a 20% em solução fisiológica e solução de telurito de potássio a 1% em água, conforme recomendação do fabricante. As placas foram espalhadas com alça de Drigalski até completa absorção da maior para as de menor diluição. Estas foram incubadas a 35 ±1°C por 24 a 48 horas. Após incubação foram selecionadas as placas que continham entre 20 e 200 colônias, com as seguintes características: pretas, brilhantes, convexas e com uma borda branca (1 a 1,5 mm de diâmetro após 24 horas e 1,5 a 2,0 mm após 48 horas) apresentando ao seu redor uma zona clara ou parcialmente opaca. Eventualmente foram observadas a presença de placas com colônias atípicas que são cinzentas, sem um ou ambos os halos típicos.

Foram selecionadas cinco colônias típicas, para teste de coagulase, e quando ocorreu a presença de menos de cinco, foram selecionadas todas. Nos casos em que a placa apresentou colônias suspeitas de mais de um tipo, típicas e atípicas, selecionou-se cinco de cada tipo, ou um número proporcional à distribuição dos diferentes tipos na placas. Cada colônia foi transferida para um tubo de Caldo Infusão Cérebro-Coração (BHI), a massa de células com o caldo foi bem emulsionada e transferido uma alçada para um tubo com Agar Trypticase de Soja (TSA) inclinado. Ambos os tubos foram incubados a 35°C/24 horas para realizar provas de identificação e observar as características típicas de *S. aureus* conforme tabela 05. O esquema demonstrando a técnica de contagem de estafilococos coagulase positiva e *Staphylococcus aureus* pelo método de plaqueamento direto em superfície está apresentado na Figura 12.

TABELA 05 - CARACTERÍSTICAS TÍPICAS DE *S. aureus*, *S. epidermidis* e *Micrococci*^a

<i>Características</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Micrococci</i>
Atividade da catalase	+	+	+
Produção de coagulase	+	-	-
Produção de termonuclease	+	-	-
Sensibilidade a lysostatina	+	+	-
Utilização anaeróbica da glucose	+	+	-
Utilização anaeróbica do manitol	+	-	-

.a + A maioria das cepas são positiva (90% ou mais)

.a - A maioria das cepas são negativas (90% ou mais)

A - Teste de coagulase:

Foram transferidos 0,2 mL de cada cultura obtida em BHI, para um tubo de 10x100mm. Foi adicionado aos 0,2 mL de cultura 0,5 mL de Coagulase Plasma- EDTA (plasma de coelho com EDTA) misturando com movimentos de rotação, sem agitar os tubos para não interferir na coagulação. Os tubos foram incubados a 35° C e foram observados a formação de coágulo a cada hora pelo período de 6 horas. O esquema da formação do coágulo na reação de coagulase de *S. aureus* está apresentado na Figura 10. Reações positivas de nível 3 ou 4 são consideradas confirmativas da presença de *S. aureus*. Culturas com reações positivas de nível 1 ou 2 foram submetidas a testes adicionais (termonuclease, catalase, coloração de Gram) para poderem ser caracterizadas como *S. aureus* (Figura 11).

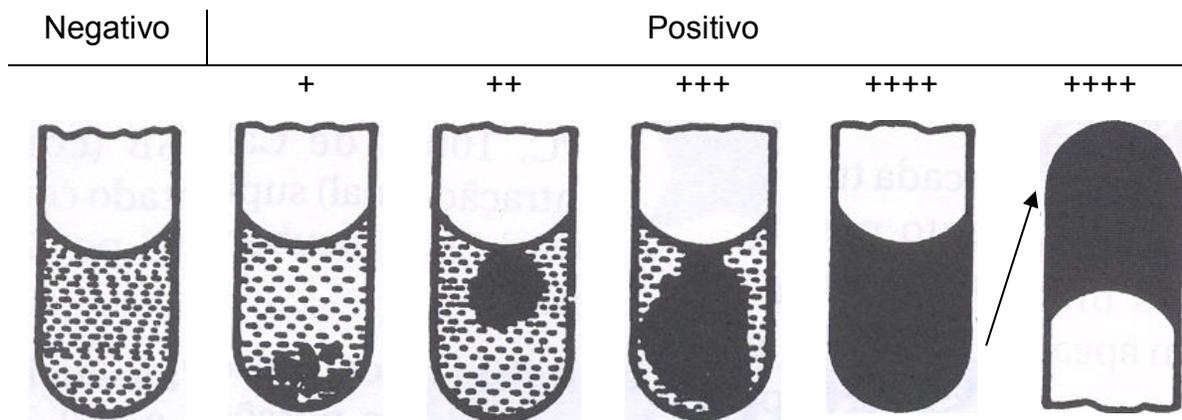


FIGURA 11- ESQUEMA DA FORMAÇÃO DO COÁGULO NA REAÇÃO DE COAGULASE DE *S. aureus*
 FONTE: MANUAL DE MÉTODOS DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS

B - Teste de termonuclease:

A partir do caldo BHI, foi transferido uma porção da cultura para um tubo de 10 x 100 mm que foi fervido em banho - Maria por 15 minutos. Com pipeta de Pasteur o u alça de platina foram feitos seis orifícios eqüidistantes, com ± 2 mm de diâmetros, no agar azul de toluidina DNA, em placas previamente preparadas. Foi semeada nos orifícios uma gota (0,03 mL) do cultivo de BHI previamente fervido. A placa foi incubada a 37°C por 4 horas, em câmara úmida. Utilizou-se *S. aureus* ATCC 12.600 como cepa padrão termonuclease positiva e *S. epidermidis* ATCC 14.990 como cepa-padrão negativa. Após incubação foi observado a formação de um halo róseo, estendendo-se por cerca de 1 mm em redor das perfurações inoculadas (teste positivo), ou a ausência desse halo, indicando teste negativo.

C - Teste de catalase:

Foram adicionados 1,0 mL de água oxigenada (peróxido de hidrogênio 3%) à cultura na rampa dos tubos de TSA. Observou-se se ocorreu borbulhamento imediato (teste positivo) ou não (teste negativo). Antes de utilizar a cultura em TSA para o teste

de catalase, foi preparado um esfregaço para coloração de Gram e foi repicado uma alçada em caldo BHI , para repetições, se necessárias.

D- Cálculo de Resultados:

O calculo do número de UFC/g de Estafilococos coagulase positiva foi determinado em função do número de colônias típicas contadas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas na prova de plasmocoagulase. O cálculo do número de UFC/g de *Staphylococcus aureus* foi determinado em função do número de colônias típicas contadas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas na prova de plasmocoagulase reação nível 3 e 4 ou plasmocoagulase 1 e 2 complementadas com o perfil de *S. aureus* nas provas adicionais (reações de termonuclease e catalase positivas, coloração de Gram positiva e forma de cocos em cachos). Exemplo: diluição 1:100, 30 colônias típicas, 5 foram submetidas à confirmação, sendo 3 confirmadas (60%). $\text{UFC/g de } S. aureus = 30 \times 10^2 \times 10 \times 0,6 = 1,8 \times 10^4 \text{ UFC/g ou mL.}$

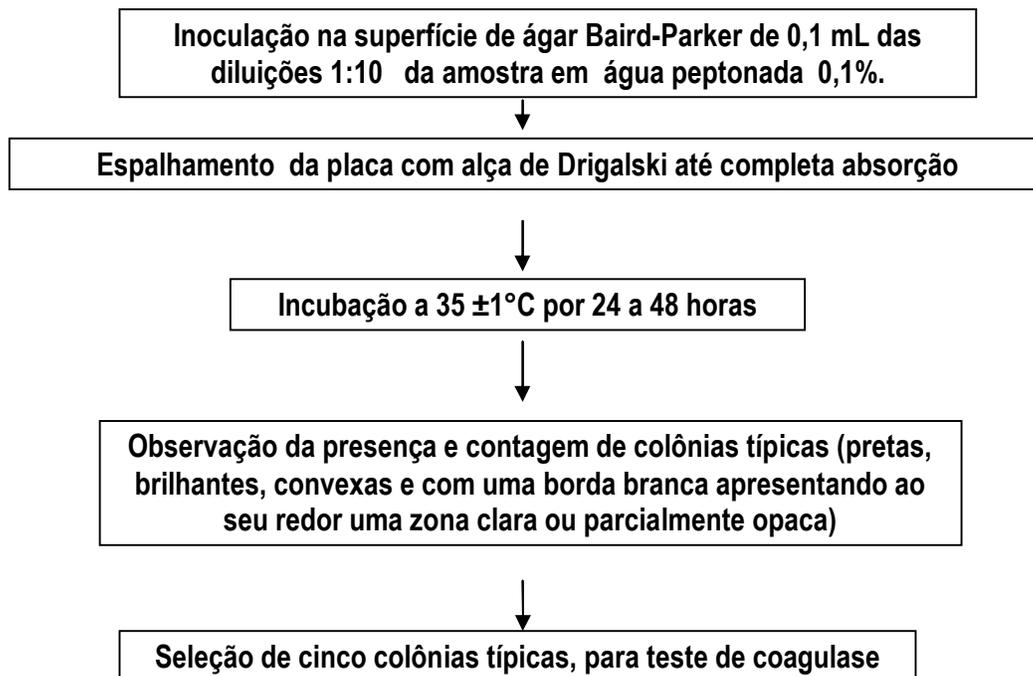


FIGURA 12 - ESQUEMA DEMONSTRANDO A TÉCNICA DE CONTAGEM DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA E *Staphylococcus aureus* POR PLAQUEAMENTO EM SUPERFÍCIE

FONTE: FDA, 1995.

4.2.11 Contagem de *Bacillus cereus*

A - Preparo das diluições seriadas e semeadura

A partir da diluição inicial (1:10) foram preparadas 4 diluições decimais usando o mesmo diluente seguido da inoculação de 0,1 mL de cada uma delas na superfície de placas de Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina (MYP), previamente preparadas e secas. Foi realizado o espalhamento do inóculo com bastão de vidro em L estéril ou alça de Drigalski, até que toda a alíquota fosse absorvida pelo meio de cultura. Foi aguardada a secagem completa das placas e estas foram incubadas na posição invertida a 30°C por 24 horas.

B - Contagem das colônias presuntivas:

Foram selecionadas para a contagem placas com 10 a 100 colônias, contendo não mais do que 30 colônias típicas de *B. cereus*, pois estas colônias são grandes e os halos característicos podem confundir-se em placas muito cheias. As colônias típicas de *B. cereus* no Agar MYP são esféricas, com bordas perfeitas, planas, secas e serosas, rodeadas por um grande halo de precipitação, devido à reação com a gema de ovo. Toda a região do meio ao redor das colônias apresenta uma coloração rósea (típica da não fermentação do manitol) que, combinada com o material precipitado da reação com a gema de ovo, adquire uma aparência rósea leitosa. Caso a coloração rósea em MYP e / ou o halo de precipitação não foram evidentes com 24 horas de incubação, as placas foram re-incubadas por 24 horas adicionais.

C-Confirmação das colônias

Foram selecionadas pelo menos 5 colônias típicas bem isoladas, que foram inoculadas em tubos de Ágar Nutriente inclinado e incubadas a 30°C por 24 horas, para obtenção do inóculo a ser utilizado nos testes de confirmação. Quando não ocorreu o desenvolvimento de colônias isoladas, foi realizada a purificação das colônias suspeitas antes da realização dos testes bioquímicos. Para a purificação, foi inoculado uma alçada da cultura, tomada bem no centro da colônia, em placas de MYP, sem estriar. Este inóculo foi simplesmente depositado em um ponto da superfície do meio. As placas foram incubadas a 30°C por 24 a 48 horas.

O Agar MYP pode permitir o crescimento de *B. anthracis*, patogênico, com colônias indistinguíveis das colônias de *B. cereus*. Por esse motivo, o manuseio dessas culturas foi feito com extremo cuidado, para prevenir riscos de contaminação do analista e do laboratório.

As culturas obtidas em NA ou purificadas em MYP foram utilizadas para inocular os meios para o teste de confirmação.

D - Testes de confirmação

a) Teste de utilização anaeróbia da glicose (Caldo Vermelho de Fenol 1% Glicose)

Foi inoculada uma alçada da cultura em NA ou purificada em MYP no meio previamente desaerado (fervura por 15 minutos em banho-maria, com as tampas afrouxadas, seguida do imediato resfriamento em banho de gelo). A superfície do meio foi coberta com óleo mineral estéril e incubado a 35⁰C por 24 horas. Foi observada a ocorrência de viragem ácida do indicador, alterando a cor do meio de vermelho para amarelo (teste positivo) ou se o meio permaneceu com a cor inalterada (teste negativo). As cepas de *B. cereus* utilizam a glicose em anaerobiose.

b) Teste de Voges-Proskauer (Caldo VP Modificado)

Foi inoculado uma alçada da cultura em NA ou purificada em MYP nos tubos de Caldo VP Modificado e incubado a 35⁰C por 48 horas. Para cada 1,0 mL de cultura foi adicionado 0,6 mL de solução de alfa nafloil 5% e 0,2 mL de solução de KOH a 40%. O tubo foi agitado vigorosamente e depois foi deixado descansar e observado periodicamente por até 1 hora. O desenvolvimento de uma cor róseo-violeta ou vermelha no meio de cultura indicou teste positivo. A permanência do meio na cor amarelada dos reagentes indicou teste negativo. As cepas de *B. cereus* são VP positivas.

c) Teste de redução do nitrato (Caldo Nitrato)

Foi inoculada uma alçada da cultura em NA ou purificada em MYP em tubos de Caldo Nitrato os quais foram incubados a 35⁰C por 24 horas. Após a incubação, foi adicionado aos tubos de cultura 0,25 mL de cada um dos reagentes para teste de nitrato (Reagente A: Solução de ácido sulfanílico a 0,8%; Reagente B: Solução de alfa-naftol a 0,5%). Foi observado o desenvolvimento de uma cor vermelha no meio de cultura que indica teste positivo para redução do nitrato.

Em caso negativo, foi adicionada uma alíquota de pó de zinco e observado se o

meio permaneceu com a cor inalterada, indicando teste positivo pois o nitrato foi decomposto em outros produtos que não o nitrito.

Se o meio ficou vermelho o teste é considerado negativo, indicando que o nitrato não foi reduzido.

A maioria das cepas de *B. cereus* reduz o nitrato, sendo poucas as cepas negativas para essa característica.

d) Teste de decomposição da tirosina (ágar tirosina)

Foi estriada uma alçada da cultura em NA ou purificada em MYP na rampa dos tubos de Ágar Tirosina inclinado que foi incubado a 35° C por até 10 dias. Foi observado periodicamente se há desenvolvimento de uma zona clara e transparente de decomposição e dissolução dos cristais de tirosina, na região abaixo da rampa (teste positivo), ou a não formação dessa zona, mantendo o meio opaco inalterado (teste negativo). As cepas de *B. cereus* decompõem a tirosina rapidamente, formando uma zona de 3 a 4 mm de profundidade em 48-72 h. Observação: É comum o escurecimento do meio ao longo da região de crescimento, com desenvolvimento de uma coloração castanha.

e) Motilidade

A partir da cultura em NA ou purificadas em MYP foi inoculado tubos de Ágar Motilidade por picada, no centro do meio de cultura até a profundidade de 1 cm do fundo do tubo. Foi incubado a 30°C por 24 horas e observado a ocorrência de migração das células para as regiões fora da linha de inoculação indicando prova de motilidade positiva. Quando o crescimento restringiu-se à linha da picada indicou motilidade negativa. As cepas de *B. cereus* e *B. thuringjensis* geralmente são móveis, enquanto as cepas de *B. anthracis* e *B. cereus* var. *mycoides* são imóveis. Algumas poucas cepas de *B. cereus* var. *mycoides* são móveis (FDA, 1995). O esquema demonstrando a técnica de contagem de *B. cereus* pelo método de plaqueamento direto em superfície está apresentado na Figura 13.

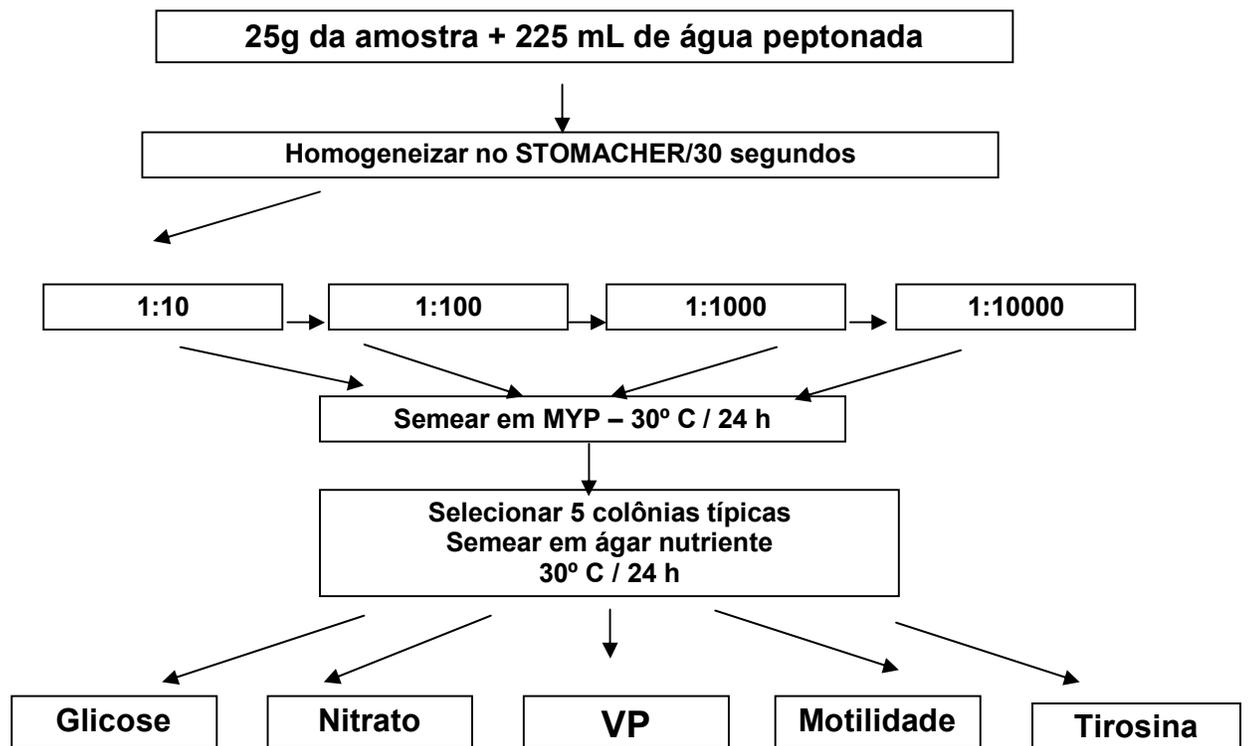


FIGURA 13 - ESQUEMA DEMONSTRANDO A TÉCNICA DE CONTAGEM DE *B. cereus* PELO MÉTODO DE PLAQUEAMENTO DIRETO
 FONTE: FDA, 1995.

Provas diferenciais complementares - identificação de *Bacillus cereus* (Figura 14):

a) Verificação de crescimento rizóide em placas de Agar Nutriente

Foi depositada uma alçada da cultura no centro da superfície do meio de cultura, sem espalhar, e foi incubado a 30°C por 24 a 48 horas. Foi observado na colônia o desenvolvimento de crescimento rizóide, que é característico das cepas da variedade *mycoides*. O crescimento rizóide é caracterizado pela produção de colônias com estruturas parecidas com raízes, que podem se estender por vários centímetros a partir do sitio de inoculação (FDA, 1995).

b) Verificação de atividade hemolítica em ágar tripticase de soja suplementado com sangue de carneiro

Foi inoculado até seis culturas em uma mesma placa de TSA-Sangue. O inóculo foi transferido para um único ponto do meio de cultura, por simples contato. Foi incubado a 35^oC por 24 horas e observado a formação de um halo claro de hemólise ao redor das colônias indicando teste positivo. As cepas de *B. cereus* costumam ser fortemente hemolíticas, produzindo halos grandes e bem nítidos, com uma área de 2 a 4 mm de completa beta hemólise ao redor do crescimento (FDA, 1995).

B. cereus var. *mycoides* e *B. thuringiensis* são fracamente hemolíticos, produzindo halos menores ou, eventualmente, zona de hemólise restrita à região sob a colônia. As cepas de *B. anthracis* geralmente não são hemolíticas.

c) Teste da Motilidade

Foi utilizado o resultado obtido quando do teste de motilidade realizado nas provas de confirmação.

d) Teste da presença de cristais de toxina intracelulares

Foi inoculada uma alçada da cultura na rampa de um tubo de NA inclinado e incubado a 30^oC por 24 horas. O tubo foi mantido à temperatura ambiente, por três dias para envelhecer a cultura e permitir a formação de esporos e a lise dos esporângios. Foi preparado um esfregaço da cultura fixado levemente pelo calor. O esfregaço foi coberto com metanol por 30 segundos e descartado o excesso de álcool. A lâmina foi deixada secar ao ar. Em seguida o esfregaço foi coberto com uma solução aquosa 0,5% de fucsina básica, foi em seguida aquecida delicadamente à chama até a emissão de vapores, foram aguardados dois minutos e foi aquecido novamente até nova emissão de vapores. Foi aguardado 30 segundos, e depois a lâmina foi lavada em água corrente, seca sendo depois observada ao microscópio sob imersão. As cepas de *B. thuringiensis* apresentam esporos livres e uma grande quantidade de cristais tetragonais corados de vermelho. As cepas de *B. cereus* não produzem cristais.

Cálculo dos resultados

O número de UFC/g de alimento foi calculado em função do número de colônias típicas contadas e percentagem de colônias confirmadas, multiplicando por dez (para levar em conta o volume dez vezes menor inoculado no plaqueamento em superfície) e pelo inverso da diluição inoculada. Exemplo: Diluição 1:10, foram observadas 6 colônias típicas, todas (6) submetidas a confirmação, sendo 3 confirmadas (50%). $\text{UFC/g ou mL} = 6 \times 10 \times 10 \times 0,5 = 300 \text{ UFC/g ou mL}$.

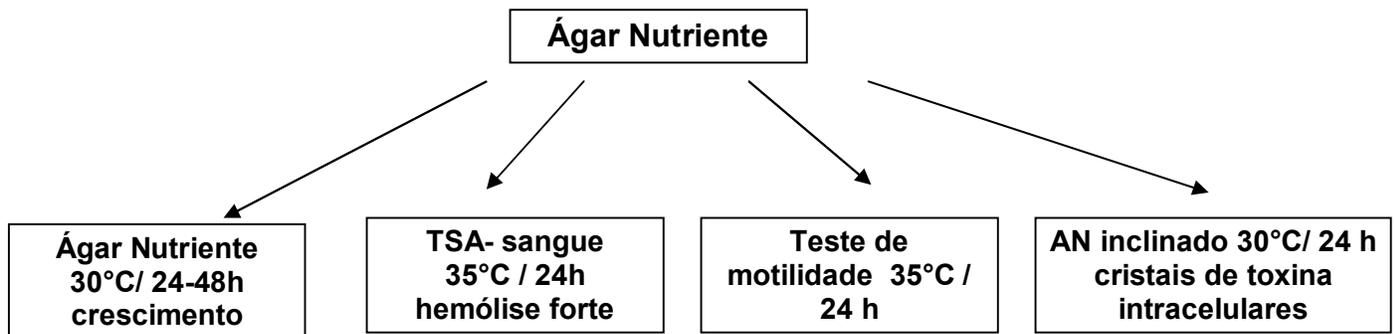


FIGURA 14 ESQUEMA DEMONSTRANDO AS PROVAS DIFERENCIAIS COMPLEMENTARES PARA *B. cereus*

FONTE: FDA, 1995.

4.2.12 Contagem de *Clostridium perfringens*

Foram inoculadas placas de Petri com 1 mL das diluições decimais da amostra. Foi vertido aproximadamente 15 mL de Ágar Triptose Sulfito Cicloserina (TSC) previamente fundido e resfriado a 45° C e suplementado com solução a 4% de D-Cicloserina. A amostra foi homogeneizada em movimentos em oito com o meio de cultura. Foi aguardado que as placas secassem e a superfície destas foram cobertas com uma sobre-camada de TSC.

Aguardou-se a completa solidificação da sobre-camada e as placas foram incubadas invertidas a 46° C por 18 a 24 horas, em atmosfera anaeróbica. Para a obtenção da condição de anaerobiose atmosférica, as placas foram incubadas em jarras de anaerobiose com sistemas geradores de anaerobiose disponíveis comercialmente.

Foram selecionadas placas com 20 a 200 colônias e foi realizada a contagem das colônias pretas, típicas de clostrídios sulfito redutores e de *C. perfringens* em Ágar TSC.

A- Confirmação das colônias típicas de *C. perfringens*

Selecionou-se 5 colônias típicas e foram transferidas para o meio de Tioglicolato previamente desaerado. O meio de Tioglicolato foi incubado a 35°C/24 horas. A cultura obtida foi inoculada nos meios de Lactose Gelatina e Nitrato Motilidade, para realização das provas bioquímicas de confirmação.

No caso da presença de colônias não isoladas estas foram previamente purificadas por estrias em ágar TSC, antes da transferência para o meio de Tioglicolato e realização das provas bioquímicas.

Teste de fermentação da lactose e hidrólise da gelatina (Meio de Lactose Gelatina)

Foi inoculada uma alçada da cultura em tubos de meios de lactose gelatina previamente desaerados e posteriormente foram incubados a 35° C/24 a 48 horas. Foi observada a formação de bolhas e a viragem ácida do indicador vermelho de fenol, alterando a cor do meio de vermelho para amarelo (fermentação da lactose positiva), ou se o meio permaneceu com a cor inalterada (fermentação da lactose negativa). Os tubos foram transferidos para uma geladeira e mantidos sob refrigeração por 2 horas. Foi observado em seguida se o meio permaneceu líquido, (hidrólise da gelatina positiva), ou se adquiriu uma resistência firme (hidrólise da gelatina negativa). As cepas de *C. perfringens* hidrolisam a gelatina e fermentam a lactose (Figura 15).

Teste de redução do nitrato e teste de motilidade (Ágar Nitrato Motilidade)

Com o auxílio de uma agulha de inoculação, foi inoculado a cultura por picada, no centro do Ágar Nitrato Motilidade previamente desaerado, até uma profundidade distante de 1 cm do fundo do tubo. Foi incubado a 35° C / 24horas e foi realizado a leitura do teste de motilidade, observando se houve migração de células para regiões fora da linha de inoculação (motilidade positiva), ou se o crescimento restringiu-se a região da picada (motilidade negativa). As cepas de *C. perfringens* são imóveis.

Para a realização do teste de redução de nitrato, foi adicionado aos tubos de cultura 0,1 mL de cada um dos reagentes para o teste de nitrato (Reagente A= 0,8% de ácido sulfanílico; Reagente B = solução 0,5% alfa-naftol). Foi observado se há o desenvolvimento de uma cor vermelha no meio de cultura (teste positivo para a redução do nitrato) e em caso negativo, foi adicionado uma pitada de pó de zinco e foi observado se o meio permanece com a cor inalterada, indicando teste positivo (pois o nitrato foi decomposto em outros produtos que não o nitrito) e se o meio tornou-se vermelho o teste é considerado negativo, indicando que o nitrato não foi reduzido. As cepas de *C. perfringens* reduzem o nitrato.

Foram considerados como *C. perfringens* todas as culturas com as seguintes características: fermentação da lactose (+), hidrólise da gelatina (+), redução do nitrato (+), motilidade (-).

Cálculo da contagem de *Clostridium perfringens*

Calculou-se o número de unidades formadoras de colônias por grama ou mililitro (UFC/g ou mL) em função do número de colônias típicas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas. Exemplo: Plaqueamento em profundidade, diluição 1:100, observação de 25 colônias típicas, 10 colônias foram submetidas à confirmação, sendo 8 colônias confirmadas (80%). $UFC/g = 25 \times 10^2 \times 0,8 = 10^3 = 1000$ UFC/g ou mL.

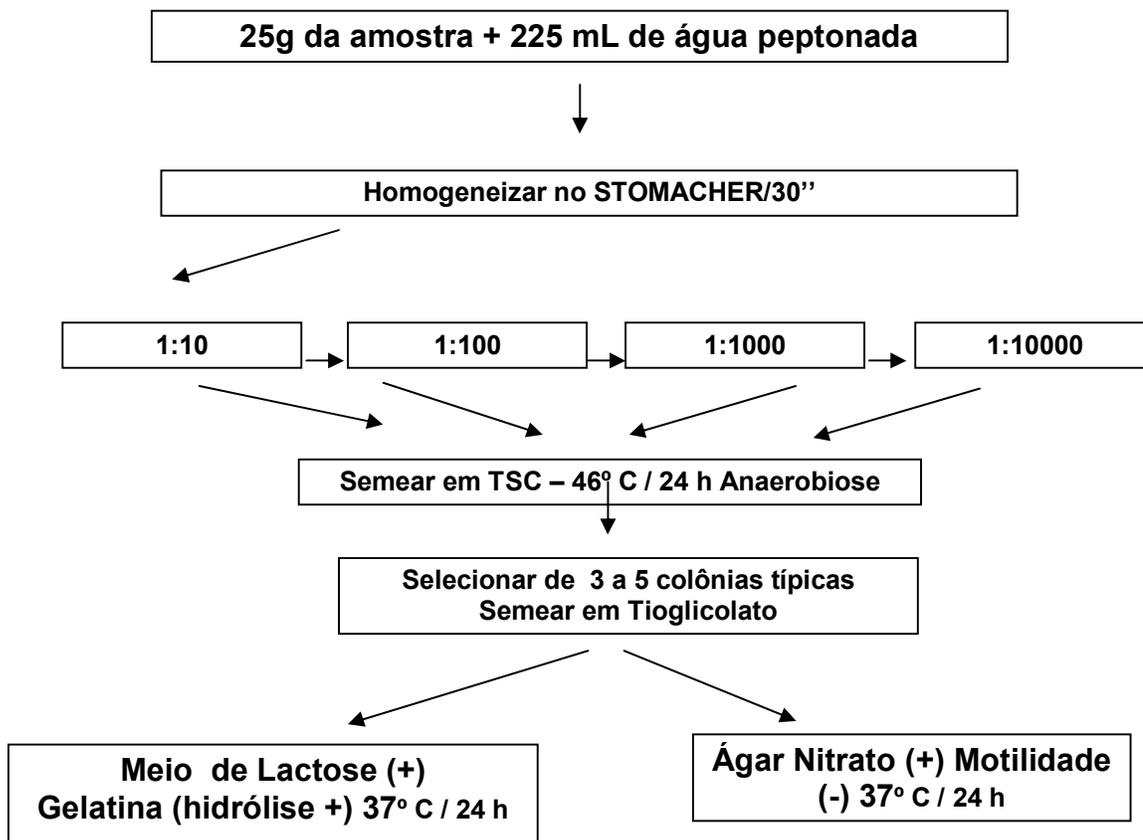


FIGURA 15 - ESQUEMA DEMONSTRANDO A TÉCNICA DE CONTAGEM DE *Clostridium perfringens* PELO MÉTODO DE SEMEADURA EM PROFUNDIDADE
 FONTE: FDA, 1995.

4.2.13 Determinação da umidade

A determinação da umidade foi realizada em estufa de pressão reduzida (100 mm de mercúrio) a 85°C, marca Fabbe-Primar Industrial Ltda. No preparo da amostra foi removida a crosta ou casca do queijo e foram tomadas diferentes porções do queijo em diferentes pontos da amostra. Os queijos moles foram homogeneizados em gral. A determinação da umidade foi realizada imediatamente com a utilização de 5,0 g da amostra que foi levada à estufa a vácuo a 85°C em cápsula de inox de fundo chato até peso constante em balança analítica de precisão marca Ohaus. Os queijos foram

classificados da seguinte forma: queijo de baixa umidade quando o teor de umidade determinado estava abaixo de 36%, média umidade quando o teor estava entre 36 e 46%, alta umidade quando o teor estava entre 46 e 55%, e muito alta umidade quando o teor estava acima de 55%.

4.2.14 Método de biologia molecular para pesquisa de *Listeria monocytogenes*

A detecção de *L. monocytogenes* por biologia molecular foi realizada pela técnica da PCR e foi desenvolvida em algumas etapas:

- Realização da Caracterização molecular de cepa padrão 07F7G de *L. monocytogenes*;
- Testes de comparação do crescimento da cepa padrão 07F7G de *L. monocytogenes* cultivada em diferentes caldos de enriquecimento e dois períodos de incubação;
- Realização de Testes com o DNA extraído do caldo de enriquecimento de amostras de queijo contaminadas naturalmente obtidas durante a fase de avaliação da qualidade microbiológica dos queijos comercializados no Paraná.

Para evitar contaminação nos procedimentos da PCR (preparação do *master mix*, extração do DNA, amplificação e detecção) estes foram realizados em salas separadas. Os procedimentos referentes ao preparo do *master mix* e extração do DNA foram realizados em Cabines de Segurança Biológica tipo II, em suas respectivas salas. Para validar os resultados da PCR, todas as análises foram realizadas com controles negativos e positivos. Como controles negativos foram utilizados caldos de enriquecimento de amostras de queijos não contaminadas com *Listeria* e água destilada. Como controle positivo da reação foi utilizado o DNA extraído da cepa padrão 07F7G de *L. monocytogenes*.

Para a detecção do patógeno empregando a PCR, foram utilizados marcadores moleculares obtidos a partir da amplificação de segmentos dos genes *Dth18*, *hlyA* e *iap*. Todos os primers, assim como os demais componentes do *Master Mix* foram sintetizados pela Gibco-BRL Life Technologies, São Paulo, Brasil. As amplificações

foram realizadas no termociclador Perkin-Elmer 9600® (Perkin Elmer, Cetus, Norwalk, EUA)

4.2.14.1. Realização da caracterização molecular de cepa padrão 07F7G de *L. monocytogenes*

A cepa padrão 07F7G foi cultivada em ágar nutriente e teve seu DNA extraído pelo método convencional da Proteinase K e posterior amplificação dos genes *Dth18*, *hlyA* e *iap*. O esquema da Técnica Convencional de Extração do DNA pela proteinase K, está apresentado na figura 16.

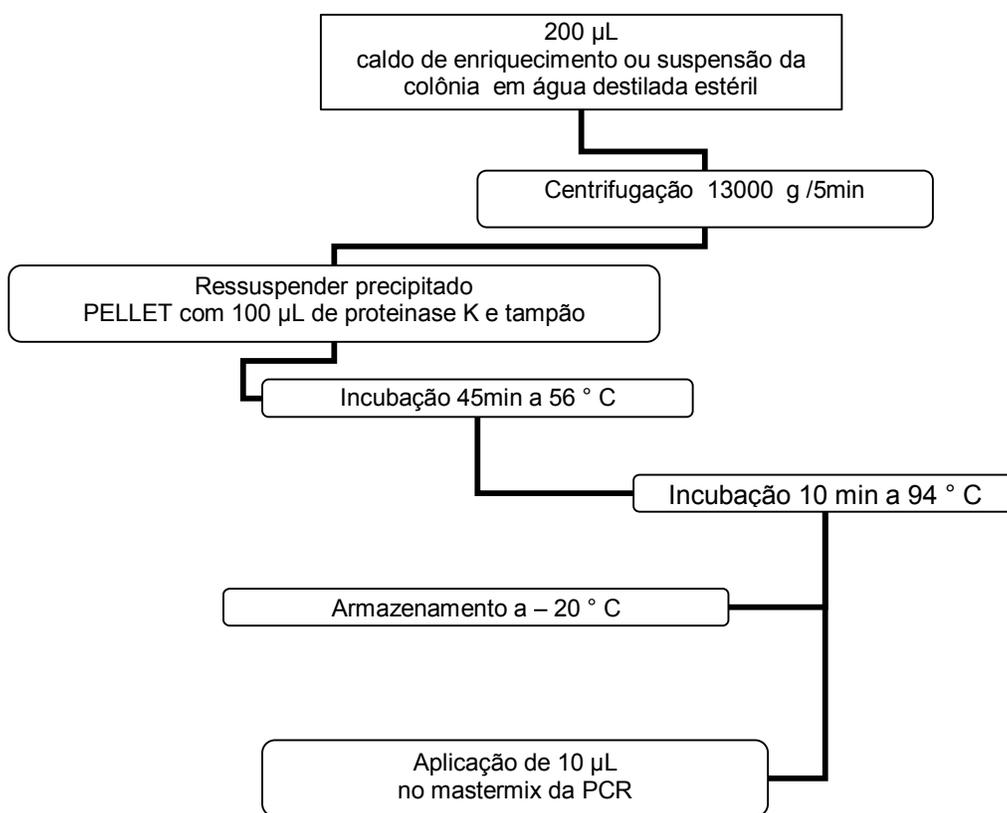


FIGURA 16 - ESQUEMA DA TÉCNICA CONVENCIONAL DE EXTRAÇÃO DO DNA PELA PROTEINASE K

4.2.14.2 Testes de comparação do crescimento de *L. monocytogenes* em diferentes caldos de enriquecimento e períodos de incubação.

A cepa 07F7G de *L. monocytogenes* foi inoculada em diferentes caldos de enriquecimento: LEB, TSB-Y, Fraiser e Fraiser Modificado, e amostras destes cultivos foram coletadas após 24 e 48 horas de incubação. O DNA das amostras coletadas foi extraído pela técnica de proteinase K e foi submetido à análise por PCR para amplificação dos genes *Dth18*, *hlyA* e *iap*.

4.2.14.3. Modificações da técnica de extração de DNA utilizando proteinase K

Foi necessário também desenvolver um método de extração de DNA a partir de meios de enriquecimento. Modificações da técnica de extração de DNA utilizando Proteinase K. Foi adicionada 225 mL de Caldo Fraiser Modificado em 25 g de amostra de queijo, de acordo com as recomendações da Health Protection Branch of Canadá, 1991. Este caldo de cultivo foi incubado por 48h à 30°C. Após esta etapa de enriquecimento, 1500µL do caldo de cultivo foram centrifugados a 13.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em 1500 (L de água ultrapura e centrifugado a 13000 g por 10 minutos, descartando o sobrenadante. Este procedimento foi repetido duas vezes. Após a última centrifugação, o precipitado foi ressuspenso em 300(L de Proteinase K (500 (g/(L) e incubado à 56°C por 45 minutos, e a seguir à 94°C por 10 minutos. Após as incubações, a mistura foi centrifugada a 8.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi separado, adicionado 2 volumes de etanol absoluto, e incubado à -20°C overnight. Após este período, a solução foi centrifugada a 16.000g por 25 minutos. O sobrenadante, com auxílio de uma micropipeta, foi cuidadosamente separado e descartado. O precipitado foi lavado com 200 (L de etanol 70% gelado. O sobrenadante foi cuidadosamente separado e descartado. O precipitado foi secado por evaporação e ressuspenso em água ultra pura (Figura 17). O DNA extraído foi quantificado e sua pureza verificada por leitura em biofotômetro Ultra Violeta (UV) 1101 WPA (Linton Cambridge, UK) com leituras realizadas em 260 nm, utilizando-se cubetas de quartzo e o branco com água ultrapura.

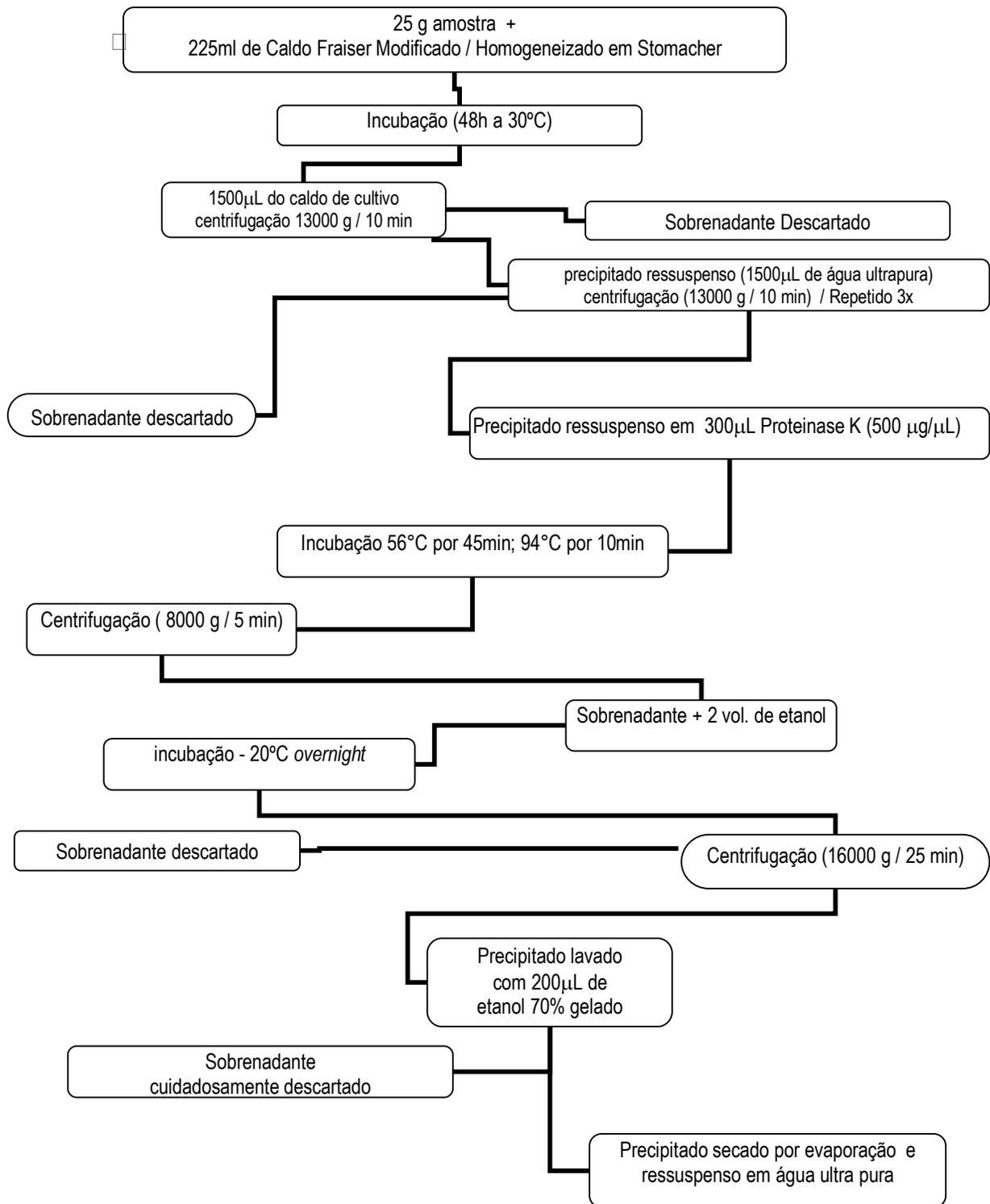


FIGURA 17 - ESQUEMA DE ETAPAS PARA A EXTRAÇÃO DE DNA PELA TÉCNICA DE PROTEINASE K MODIFICADA

4.2.14.4 Realização de testes com o DNA extraído do caldo de enriquecimento de amostras de queijo contaminadas naturalmente.

Foram utilizadas amostras F1 e F6 (queijo Minas frescal), obtidas durante a fase de avaliação da qualidade microbiológica dos queijos comercializados no Paraná. Nestas amostras foi detectado previamente *Listeria monocytogenes* pela metodologia convencional e/ ou pelo método VIP. Vinte e cinco gramas de cada amostra de queijo (alíquotas da superfície) foram pesadas assepticamente em sacos plásticos estéreis para “Stomacher” e acrescidos de 225 mL do caldo Fraser Modificado com Cloreto de Lítio 8 M, homogeneizado a seguir em “Stomacher” por 30 segundos e incubados à 30°C por 48 horas. Após etapa de enriquecimento foi realizada a extração de DNA pelo método de Proteinase K modificado e foi submetido à análise por PCR para Amplificação dos genes *Dth18*, *hlyA* e *iap*.

4.2.14.5 Amplificação do Gene *Dth18*

A amplificação foi realizada utilizando tampão PCR 1x, 1U de *Taq* polimerase, 0,5µM de cada *primer*, 0,2 mM de cada dNTP, 3,0 mM MgCl₂, 5 µL da amostra, e volume final de 50µL. A seqüência dos primers A1 e A2 está na Tabela 06.

A amplificação foi realizada de acordo com as seguintes etapas: desnaturação inicial a 92°C por 1 minuto; 35 ciclos de 1 minuto a 92°C/2 minutos a 54°C/2 minutos a 72°C; extensão final de 3 minutos a 72°C.

4.2.14.6 Amplificação do gene *hlyA*

A amplificação foi realizada utilizando tampão PCR 1x, 1U de *Taq* polimerase, 0,5µM de cada primer, 0,2mM de cada dNTP, 2,5mM MgCl₂, 5µL da amostra, e volume final de 50µL. A seqüência dos primers 234 e 319 está na Tabela 06.

A amplificação foi realizada de acordo com as seguintes etapas: desnaturação inicial a 92°C por 1 minuto; 35 ciclos de 1 minuto a 92°C/45 segundos a 62°C / 2 minutos a 72°C; extensão final de 3 minutos a 72°C.

4.2.14.7 Amplificação do gene *iap*

A amplificação foi realizada utilizando tampão PCR 1x, 1U de Taq polimerase, 0,5µM de cada primer, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5mM MgCl₂, 5µL da amostra, e volume final de 50µL. A seqüência dos primers Mar1 e Mar2 está na Tabela 06.

A amplificação foi realizada de acordo com as seguintes etapas: desnaturação inicial a 92°C por 1 minuto; 35 ciclos de 1 minuto a 92°C/1 minuto a 46°C/2 minutos a 72°C; extensão final de 3 minutos a 72C.

TABELA 06 – SEQUÊNCIA DOS PRIMERS UTILIZADOS NA DETECÇÃO DE *L. monocytogenes*

Gene	Primer	Seqüência
<i>Dth18</i>	A1 ¹	5' CCGGGAGCTGCTAAAGCGGT 3'
<i>Dth18</i>	A2 ¹	5' GCCAAACCACCGAAAAGACC 3'
<i>hlyA</i>	234 ²	5' CATCGACGGCAACCTCGGAGA 3'
<i>hlyA</i>	319 ²	5' ATCAATTACCGTTCTCCACCATTTC 3'
<i>iap</i>	Mar1 ³	5' GGGCTTTATCCATAAAATA 3'
<i>iap</i>	Mar2 ³	5' TTGGAAGAACCTTGATTA 3'

1 Wernars *et al.*, 1991 2 Fitter *et al.*, 1992 3 Manzano *et al.*., 1997

4.2.14.8 Visualização dos marcadores moleculares

Os produtos amplificados por PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose com brometo de etídeo numa concentração final de 0,5 µg/ mL em tampão TBE (tris-borato EDTA). Para cada poço do gel de agarose foram colocadas as respectivas amostras com 10 µL do DNA amplificado com 2 µL de corante azul de bromofenol 0,2% e o marcador de peso molecular foi preparado da seguinte forma: 4 µL do marcador de peso molecular, 6 µL de água milli-Q e 2 mL do corante azul de bromofenol. A eletroforese foi corrida a 170 volts, por 30 minutos. A visualização das bandas foi realizada em um transiluminador ultravioleta (Uniscience, Brasil). Foi utilizado como marcador de peso molecular o DNA *ladder* 100 pb (*gibco-BRL*[®], *Life Technologies*). A

visualização de bandas correspondentes aos respectivos fragmentos amplificados que possuíam o tamanho esperado e igual ao controle positivo foi critério para diagnosticar os resultados da PCR das amostras. A fotodocumentação foi realizada por câmara digital (*Kodak Digital Science-Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 Rochester, NY USA*).

O experimento foi realizado nas Secções de Microbiologia de Alimentos e Biologia Molecular do Laboratório Central do Estado e no Laboratório de Controle de Qualidade II do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os queijos analisados foram produzidos no Estado do Paraná e coletados em estabelecimentos que comercializam alimentos em diferentes regiões (90 amostras). Segundo critérios da Associação Brasileira da Indústria de Queijos essas 90 amostras foram classificadas em: mussarela (19); prato (6); requeijão (1); frescos de massa crua subdivididos em: Minas frescal (25) e ricotas (11); queijos artesanais subdivididos em colonial (23), montanhês (2), Minas padrão (1), gouda (1) e provolone (1) e estavam dentro do prazo de validade. As regiões onde foram coletadas as amostras correspondem às regiões produtoras de leite do Estado. Os queijos envolvidos em surto de DTA (10 amostras) apresentaram características de queijo colonial. A distribuição das amostras segundo regional de saúde e local de coleta está apresentada na Tabela 07.

5.1 AVALIAÇÕES DA QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA DOS QUEIJOS COMERCIALIZADOS NO ESTADO DO PARANÁ

5.1.1 Classificação dos queijos de acordo com o teor de umidade

Os queijos foram analisados quanto ao teor de umidade com o objetivo de enquadrar a amostra na classificação quanto a umidade segundo RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 (Brasil, 2001). Os resultados dessa análise encontram-se na Figura 18.

TABELA 07- DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS SEGUNDO REGIONAL DE SAÚDE, LOCAL DE COLETA E NÚMERO DE AMOSTRAS

RS	Município Sede	Número de amostras	
		Comércio	Local de surto de DTA
2 ^a	Curitiba	48	0
4 ^a	Irati	6	0
5 ^a	Guarapuava	3	1
7 ^a	Pato Branco	3	0
8 ^a	Francisco Beltrão	12	2
9 ^a	Foz do Iguaçu	1	1
10 ^a	Cascavel	4	1
12 ^a	Umuarama	1	0
13 ^a	Cianorte	0	1
14 ^a	Paranavaí	2	0
15 ^a	Maringá	3	0
16 ^a	Apucarana	4	0
17 ^a	Londrina	1	2
18 ^a	Cornélio Procopio	2	0
20 ^a	Toledo	0	1
22 ^a	Ivaiporã	0	1
	Total Parcial	90	10
Total de mostras		100	

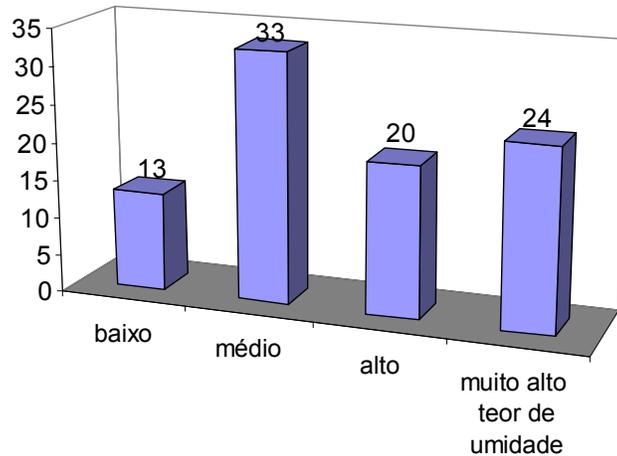


FIGURA 18- CLASSIFICAÇÃO DOS QUEIJOS QUANTO AO TEOR DE UMIDADE

Na figura 18, observa-se que o maior número de amostras (33) foram classificadas como sendo de média umidade (36,7%), seguidas pelas amostras de muito alto teor de umidade (24), alto teor (20) e baixo teor de umidade (13), correspondendo a 26,7% 22,2% e 14,4%, respectivamente.

5.1.2 Ocorrência de *Listeria* spp. nos queijos

A pesquisa de *Listeria* spp. foi feita pelo método convencional e rápido VIP. Os resultados obtidos pelas diferentes metodologias foram apresentados e discutidos separadamente.

5.1.2.1 Pesquisa de *Listeria* spp. pelo método convencional

Com a utilização do método convencional 5 (5,5%) do total de amostras de queijo (90) coletadas nos diferentes pontos de comercialização foram positivas para *Listeria* spp., sendo que 3 amostras (3,3%) foram identificadas como *L. monocytogenes* e 2 amostras (2,2%) como *L. innocua*. Das 10 amostras de queijo envolvidas em surtos de DTA em nenhuma delas foi isolada *Listeria* spp.

Nas provas de identificação todas as cepas isoladas apresentaram resultado positivo nas características do gênero *Listeria* (catalase, motilidade em forma de guarda-chuva, prova de bile-esculina, produção de ácido a partir de glicose, lactose e sacarose em agar TSI diferindo quanto as provas de fermentação de açúcares, β -hemolise e testes de CAMP frente a *S. aureus*, conforme Tabela 8. Todas as cepas isoladas e identificadas como *L. monocytogenes* foram produtoras de β -hemolisina e positivas para os testes de CAMP frente a *S. aureus*, fermentadoras da rhamnose, e apresentaram-se negativas para os testes de redução de nitrato a nitrito e fermentação da xilose e manitol. A presença de *Listeria monocytogenes* em 25 g da amostra classifica estes produtos como impróprios para o consumo, conforme legislação brasileira (Brasil, 2001).

5.1.2.2 Pesquisa de *Listeria* spp. pelo Método VIP

Quando se utilizou o método VIP constatou-se um percentual maior de amostras contaminadas. Das 90 amostras dos diferentes pontos de comercialização 13,33% (12 amostras) foram positivas para *Listeria* spp., caracterizadas como *L. monocytogenes* em 6 amostras (6,7%) e *L. innocua* em 6 amostras (6,6%). Das amostras de queijos analisadas proveniente de surto de DTA (10 amostras) nenhuma foi positiva para a pesquisa de *Listeria* spp.

As amostras de queijo que apresentaram VIP^R Biocontrol positiva para *Listeria* spp. foram submetidas a isolamento em meios seletivos diferenciais (LPM modificado, ágar Oxford e Ágar Palcam) a partir do caldo de enriquecimento BLED (12). As provas bioquímicas em nível de gênero e espécie foram feitas após seleção de 5 colônias suspeitas presentes nos meios seletivos para *Listeria* spp. Todos os isolados

apresentaram resultado positivo nas características do gênero *Listeria* (catalase, motilidade em forma de guarda-chuva, prova de bile-esculina, produção de ácido a partir glicose, lactose e sacarose em ágar TSI), diferindo quanto às provas de fermentação de açúcares, β -hemólise e testes de CAMP frente a *S. aureus*, conforme tabela 08. Todas as cepas identificadas como *L. monocytogenes* foram produtoras de β -hemolisina e positivas para os testes de CAMP frente a *S. aureus*, fermentação da ramnose, e apresentaram-se negativas para os testes de redução de nitrato a nitrito e fermentação da xilose e manitol.

TABELA 08 - RESULTADOS DAS PROVAS BIOQUÍMICAS UTILIZADAS NA IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DO GÊNERO *Listeria* OBTIDOS A PARTIR DE AMOSTRAS POSITIVAS PELO MÉTODO CONVENCIONAL E VIP

	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>
Motilidade guarda-chuva	+	+
Catalase	+	+
Produção de ácido a partir de glicose, lactose e sacarose em ágar triptice açúcar ferro (TSI)	A/A*	A/A*
VM/VP	+/+	+/+
Prova de bile-esculina	+	+
NO ₃ /NO ₂	-	-
β -hemólise	+	-
Fermentação Manitol	-	-
Fermentação Rhamnose	+	-
Fermentação Xilose	-	-
Camp Teste (<i>S. aureus</i>)	+	-

* Fermentação com produção de ácido

5.1.3 Comparação do resultado obtido pelo método convencional e VIP na pesquisa de *Listeria* spp.

Considerando os resultados obtidos pelas duas metodologias de análise (metodologia convencional e método rápido VIP), o número de amostras contaminadas por *Listeria* spp foi de 12% de um total de 100 amostras (90 de ponto de comercialização e 10 de evento de surto de DTA). Foram considerados como resultados positivos, quando o microrganismo foi detectado na amostra em apenas um dos métodos de análise utilizados, ou pelos dois métodos simultaneamente.

Do total das 12 amostras positivas para *Listeria* spp. apenas 5 foram positivas por ambos os métodos enquanto 7 foram exclusivamente positivas no método VIP. Os isolados de ambos os métodos foram caracterizados por provas bioquímicas e sorológicas. Os resultados da ocorrência de *Listeria* spp., considerando os diferentes tipos de queijo, teores de umidade, métodos utilizados e caracterização sorológica estão representados na Tabela 9. Do total de amostras (12) que apresentaram *Listeria* spp. 50% foram identificadas como *L. monocytogenes* e 50% como *L. innocua* (Figura 19). As características diferenciais das espécies aceitas como pertencentes ao gênero *Listeria* estão apresentadas na Tabela 10, as quais foram utilizadas na interpretação das provas bioquímicas das colônias suspeitas.

TABELA 09 - OCORRÊNCIA DE *Listeria* spp. E SOROVARIEDADES, APÓS CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E SOROLÓGICA EM DIFERENTES TIPOS DE QUEIJOS COMERCIALIZADOS NO ESTADO DO PARANÁ UTILIZANDO DIFERENTES MÉTODOS DE PESQUISA

Amostra	Queijo	Classificação pelo Teor de Umidade	Método Convencional	Método VIP	Sorovariedade
1.	Prato (fatiado)	Média	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	1/2 a
2.	Colonial	Média	Ausência	<i>L. monocytogenes</i>	1/2 a
3.	Colonial	Média	Ausência	<i>L. monocytogenes</i>	1/2 a
4.	Minas magro	Alta	Ausência	<i>L. innocua</i>	6 a
5.	Minas frescal	Muito alta	Ausência	<i>L. innocua</i>	6 a
6.	Colonial	Muito alta	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	1/2 a
7.	Minas frescal magro	Muito alta	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	1/2 a
8.	Minas magro	Muito alta	Ausência	<i>L. innocua</i>	6 a
9.	Minas frescal	Média	Ausência	<i>L. innocua</i>	6 a
10.	Ricota fresca	Muito alta	Ausência	<i>L. monocytogenes</i>	1/2 a
11.	Minas magro	Muito alta	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	6 a
12.	Minas magro	Muito alta	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	6 a

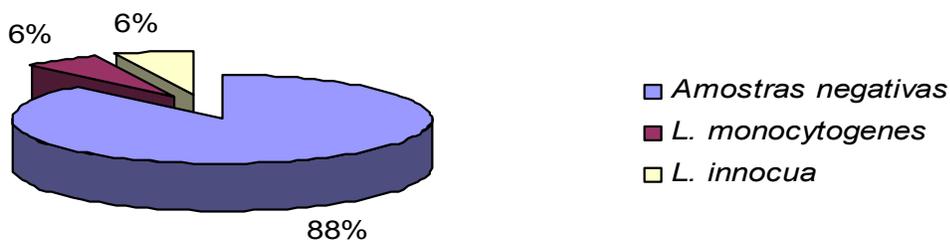


FIGURA 19 - OCORRÊNCIA DE *Listeria* spp. EM AMOSTRAS DE QUEIJOS ANALISADAS NO ESTADO DO PARANÁ

TABELA 10 - CARACTERÍSTICAS DIFERENCIAIS DAS ESPÉCIES ACEITAS COMO SENDO DO GÊNERO *Listeria*

Espécie	Beta hemólise	NO3/NO2	Ferm. MAN	Ferm. RAM	Ferm. XIL	VM/VP	Camp. S. aureus	Teste R. equi
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	-	+	-	=/+	+	-
<i>L. innocua</i>	-	-	-	V	-	+/+	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	-	-	+	+/+	-	+
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	V	+	+/+	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	-	+	+/+	+	-
<i>L. grayi</i>	-	-	+	-	-	+/+	-	-
<i>L. murrayi</i>	-	+	+	V	-	+/+	-	-

FONTE: adaptado de SEELIGER e JONES (35). CASSAROTTI, VANIA *et al.*, 1994.

A análise da distribuição de sorotipos mostrou que 100% dos isolados de *L. innocua* pertencem ao sorotipo 6a e para os isolados de *Listeria monocytogenes* testados o sorotipo prevalente foi 1/2 a.

Estes resultados de sorotipagem dos isolados estão de acordo com os encontrados nos isolados de produtos lácteos (HOFER *et al.*, 2000).

Quando se correlaciona o número de amostras contaminadas com *Listeria* spp. e o teor de umidade verifica-se que as amostras classificadas com muito alta umidade foram as que apresentaram o maior percentual de contaminação (29,2% de um total de 24 amostras). Nos queijos com baixa umidade não se detectou amostras contaminadas.

Nos queijos de média e alta umidade a ocorrência de *Listeria* spp. foi de 12,12% e 5% respectivamente (Figura 20).

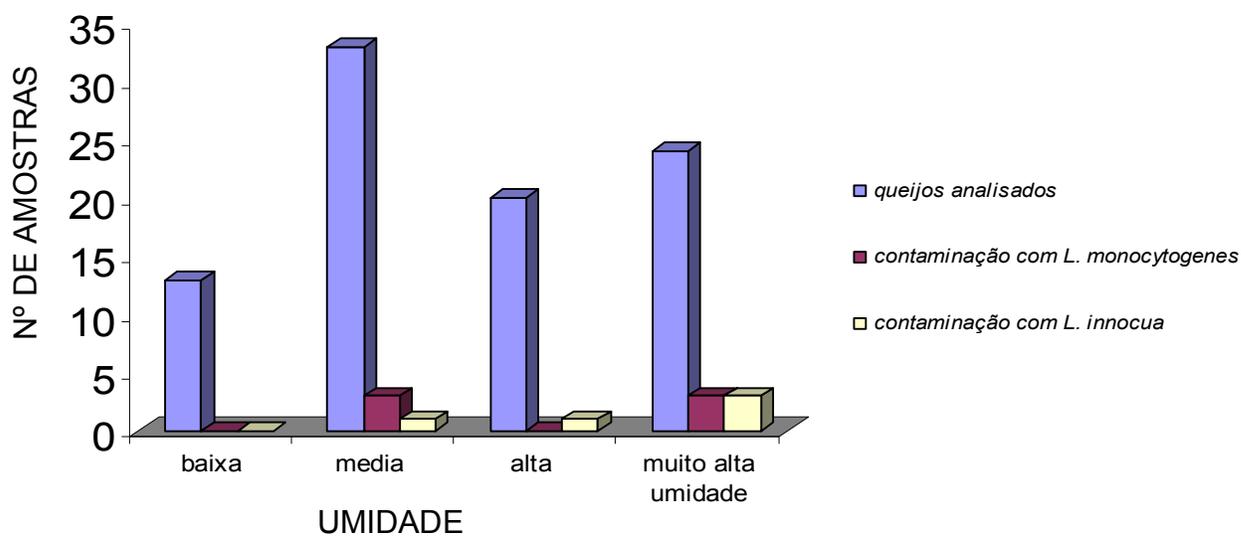


FIGURA 20 - CONTEUDO DE UMIDADE DOS QUEIJOS E NÍVEL DE CONTAMINAÇÃO COM *L. monocytogenes* e *L. innocua*

O método convencional forneceu resultado falso negativo em 7 amostras, quando comparado com o método VIP utilizado como triagem, quer seja quando se considera a espécie detectada ou o grau de umidade do queijo. O maior número de amostras falso-negativas correspondem a amostras contaminadas com *Listeria monocytogenes*, embora seja esta a espécie detectada predominantemente por ambos os métodos de análise.

As espécies não patogênicas de *Listeria* são comumente encontradas em produtos lácteos, principalmente *L. innocua*. Quando são isoladas apenas espécies não patogênicas em alimentos, não exclui a possibilidade de *L. monocytogenes* estar presente na amostra, porém não ser detectada (PETRAN e SWANSON 1993), o que pode ser constatado pelo estudo realizado por CASOLARI *et al.*, (1994), o qual detectou dentre as espécies encontradas, 47% de *L. innocua* e 16% de *L. monocytogenes*. As

fontes de contaminação de queijos podem ser o leite ou o ambiente de processamento. Atualmente, sabe-se que as vias de contaminação do leite cru são a mastite bovina e o ambiente, 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, embora esse agente já tenha sido isolado de queijos elaborados com leite. Os trabalhos realizados nas indústrias revelam que a contaminação cruzada após a pasteurização do leite seria a fonte de contaminação dos queijos. Especificamente em indústrias processadoras de queijo tipo frescal, as pesquisas ainda são escassas (JOHNSON; LATTUADA, 1993).

5.1.3.1. Comparação da sensibilidade e especificidade dos métodos convencional e VIP na detecção de *Listeria* spp.

A comparação da sensibilidade e especificidade dos métodos de detecção de *Listeria* spp utilizados (convencional e VIP) foi feita aplicando-se as equações de BEUMER *et al.*, 1991 cujos valores utilizados estão apresentados na Tabela 11.

TABELA 11 - VALORES FALSO-POSITIVOS E FALSO-NEGATIVOS CONSIDERANDO OS RESULTADOS OBTIDOS PELOS DIFERENTES MÉTODOS

Método	Amostras positivas	Amostras negativas	Amostras falso-negativas ^a	Amostras falso-positivas	Total
Método rápido					
VIP	12	88	0	0	100
Método Convencional	5	95	7	0	100

^a = Quando uma mesma amostra apresentou resultado positivo para *Listeria* spp. em uma e negativo em outra metodologia

Pelo método rápido VIP encontrou-se 12 amostras positivas e 88 amostras negativas para o gênero *Listeria* enquanto que com o método convencional, detectou-se apenas 5 amostras positivas sendo portanto 95 amostras negativas. O método convencional apresentou 7 resultados falso-negativos quando comparado com os resultados positivos obtidos pelo método VIP. Aplicando-se as equações de BEUMER *et al.*, 1991, para esses resultados constata-se 100% de especificidade para os dois métodos. Considerando que no universo de 100 amostras apenas 12 eram positivas, a

sensibilidade foi de 100% e 63,16% respectivamente para o método rápido VIP e convencional. Pela análise estatística dos resultados obtidos com aplicação de testes estatísticos não-paramétricos para análise dos dados pelo coeficiente de concordância de Kappa utilizando o programa EpiTable do Epi Info versão 6.04d observou-se que não se pode avaliar a sensibilidade e o valor preditivo dos testes, pois as amostras foram poucas e a grande amplitude dos intervalos de confiança indicam falta de precisão para a estimativa estatística dos resultados. O coeficientes kappa foi igual a 0,950884 para o método VIP e o 0,556962 para o método convencional. Esse coeficiente é um valor que varia de zero a um, quanto mais próximo de 1 (um), maior é a concordância e o valor zero indica a falta de concordância.

Quando se compara os resultados obtidos nesse estudo quanto a ocorrência de *L. monocytogenes* (6,0%) com dados da literatura, encontramos tanto valores superiores como inferiores quer seja em dados nacionais quanto internacionais. Estudos sobre a incidência de *Listeria* spp. no Brasil reportam uma contaminação de 1,4% a 41,17%. SOUZA, 2002 detectou 1,4% de *L. monocytogenes* em 70 amostras de queijo de coalho artesanal comercializado em Fortaleza-CE, enquanto Ramos e Costa em 1993 detectaram 1,7% em amostras do mesmo tipo de queijo comercializado na cidade de Manaus-AM. Oliveira em 1993 detectou 2% de *L. monocytogenes* em queijo Minas Frescal no comércio varejista de Goiânia-GO, porcentagem esta também encontrada por Schwab em 1994 em amostras de queijo colonial artesanal comercializado em Porto Alegre-RS. Destro *et al.*, em 1991, isolaram *L. monocytogenes* em 10% de amostras de queijo Minas Frescal, enquanto Silva *et al.*, em 1998 constataram alta incidência (41,17%) de *L. monocytogenes* em queijo Minas Frescal artesanal. Já outros autores como Casarotti *et al.*, (1994) e Feitosa *et al.*, (2003) não detectaram este microrganismo respectivamente em amostras analisadas de queijo Minas Frescal comercializadas em Piracicaba-SP e de queijo de coalho e manteiga produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. Na literatura estrangeira observam-se dados bastante variados em relação à taxa de incidência de 0,5 a 46% (TERPLAN *et al.*, 1986; BECKERS *et al.*, 1987; FARBER *et al.*, 1987; BREER; SCHOPFER, 1988; GLEDEL, 1988; PINI; GILBERT, 1988; WEBER *et al.*, 1988; RORVIK; YNDESTAD, 1991; CORDANO; ROCOURT, 2001; GUERRA *et al.*, 2001; PINTADO *et al.*, 2005).

Ao se avaliar os diferentes trabalhos existentes em relação à ocorrência de *L. monocytogenes*, observa-se que o estabelecimento de uma relação comparativa entre estes se torna difícil, devido a variedade de métodos analíticos utilizados bem como diferentes meios de cultura, padrões de amostragem adotados na obtenção dos resultados, o que pode resultar em níveis de detecção diferentes. Além de que segundo Wong *et al.*, 1990, os diferentes resultados de ocorrências pode também ser explicado pela distribuição e especificidade geográfica do gênero *Listeria* spp. Em relação aos trabalhos brasileiros, tal dificuldade é agravada pelo fato de que existem produtos tipicamente brasileiros, como o queijo Minas Frescal, queijo de coalho e manteiga entre outros. Entretanto, o que se pode notar entre os vários resultados na literatura é a predominância da baixa incidência deste microrganismo, com o que os dados ora obtidos concordam.

A genotipagem de amostras de *Listeria monocytogenes* pela técnica de RAPD, utilizando-se quatro diferentes iniciadores aleatórios, resultou em dois grupos com perfis genéticos distintos: A: amostras clonais A, F, G, J e W; B: amostra B (Figura 21). Pela árvore filogenética construída a partir do método UPGMA do programa Treeconw evidenciou-se uma alta similaridade genética (99%) entre os dois grupos formados por *Listeria monocytogenes* (Figura 22).

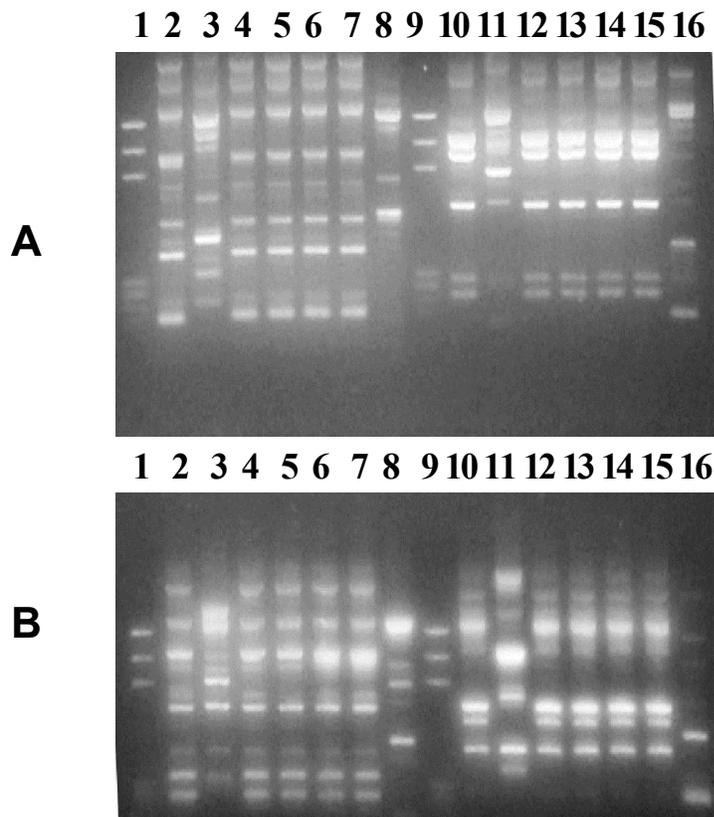


FIGURA 21 - PERFIS GENÉTICOS DOS ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* A PARTIR DE QUATRO DIFERENTES INICIADORES

Gel A: Canaletas 1- Padrão ϕ 174/HaeIII; 2- amostra A; 3- amostra B; 4- amostra F; 5- amostra G; 6- amostra J; 7- amostra W; 8- controle negativo (*Staphylococcus aureus*); 9- padrão ϕ x174 ; 10- amostra A; 11- amostra B; 12- amostra F; 13- amostra G; 14- amostra J; 15- amostra W; 16- controle negativo (*Staphylococcus aureus*). As amostras contidas nas canaletas 2 a 8 foram amplificadas com o primer OPA 1 e as amostras nas canaletas 10 a 16 foram amplificadas com o primer OPA 4.

Gel B: : Canaletas 1- Padrão ϕ 174/HaeIII; 2- amostra A; 3- amostra B; 4- amostra F; 5- amostra G; 6- amostra J; 7- amostra W; 8- controle negativo (*Staphylococcus aureus*); 9- padrão ϕ x174 ; 10- amostra A; 11- amostra B; 12- amostra F; 13- amostra G; 14- amostra J; 15- amostra W; 16- controle negativo (*Staphylococcus aureus*). As amostras contidas nas canaletas 2 a 8 foram amplificadas com o primer OPA 6 e as amostras nas canaletas 10 a 16 foram amplificadas com o primer OPA 7.

A – isolado proveniente de amostra de queijo prato fatiado; B – isolado proveniente de queijo colonial; F- isolado proveniente de queijo colonial; G – isolado proveniente de queijo Minas frescal magro; J – isolado proveniente de ricota fresca; W – isolado proveniente de queijo colonial

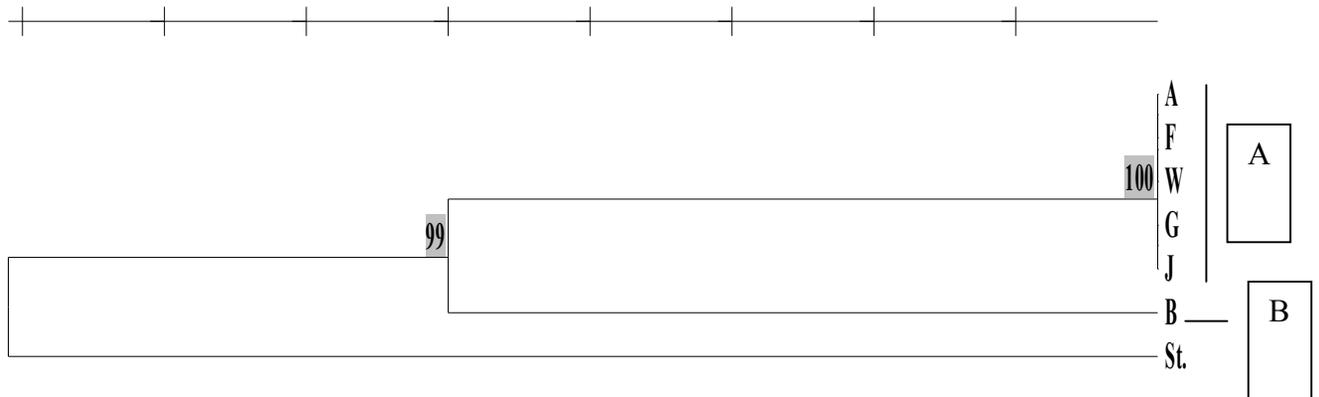


FIGURA 22 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE *Listeria monocytogenes* (A, F, W, G, J) E *Listeria monocytogenes* (B),

A árvore filogenética de amostras de *L. monocytogenes* mostrando a similaridade genética entre cada amostra e entre os dois grupos formados (A e B).

ST: *Staphylococcus aureus* - controle negativo

A – isolado proveniente de amostra de queijo prato fatiado; B – isolado proveniente de queijo colonial; F- isolado proveniente de queijo colonial; G – isolado proveniente de queijo Minas frescal magro; J – isolado proveniente de ricota fresca; W – isolado proveniente de queijo colonial

A presença de *L. monocytogenes* em 25 g de amostra classifica estes produtos como impróprios para o consumo, conforme legislação brasileira (BRASIL, 2001) a qual preconiza ausência de *L. monocytogenes* para queijos de média, alta e muito alta umidade. Um total de 6,7% das amostras de queijos comercializados nas diferentes regiões do Estado do Paraná mostrou-se impróprias para o consumo de acordo com o padrão legal vigente, pois foi detectada a presença da espécie mais patogênica, *L. monocytogenes*. Em outras amostras de queijo se observou também o isolamento de *L.innocua* (6,7%).

Apesar do caráter ubiqüitário do gênero *Listeria*, a constatação da presença nos queijos analisados de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a é uma preocupação de saúde pública evidenciando a existência de falhas no processo de fabricação dos queijos produzidos no Estado do Paraná.

A presença *Listeria innocua* é indicativa de que o processo de produção poderia também permitir a contaminação com *L. monocytogenes* servindo de alerta para que seja desencadeada uma revisão do processo de produção de forma a prevenir a contaminação nos pontos críticos do processo.

A importância do trabalho sob o ponto de vista de saúde pública é mostrar que existe um risco potencial à saúde da população tendo em vista o aumento do número de idosos e imunodeprimidos para os quais a *Listeria monocytogenes* é potencialmente grave e também o fato de nos isolados se constatar *L. monocytogenes* pertencente ao sorotipo 1/2 a, tanto em vista que este é um dos três sorotipos mais comumente responsáveis pelos surtos de listeriose (1/2a, 1/2b, sendo o mais freqüentemente 4b) (KEROUANTON *et al.*, 1998; MARGOLLES *et al.*, 1998; HOFER *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos indicam também que o método VIP é um método viável na triagem de amostras contaminadas para a liberação do produto para a comercialização por ser rápido e confiável, não requerendo equipamentos adicionais e apresenta resultados confiáveis. Por outro lado o método convencional diferencia-se do método VIP pela morosidade e demora inviabilizando assim a sua utilização na liberação de lotes para comercialização além de ser mais caro.

5.1.4 Resultados da Avaliação da Qualidade dos Queijos Analisados em Relação a Diferentes Microrganismos

5.1.4.1. Análise dos Resultados Microbiológicos dos Tipos de Queijos Coletados nos Pontos de Comercialização.

A análise dos resultados microbiológicos em função dos tipos de queijos foram classificados conforme critérios da Associação Brasileira da Indústria de Queijos (ABIQ) que utiliza o critério de classificação dos queijos quanto aos processos de fabricação (Quadro 01).

QUADRO 01 CLASSIFICAÇÃO DOS QUEIJOS EM RELAÇÃO AOS PROCESSOS DE FABRICAÇÃO

Tratamento da massa	Características da cura	Exemplos
Massa não cozida	sem cura cura por <i>Penicillium candidum</i> cura por <i>Penicillium roqueforti</i>	Minas frescal camembert, brie gorgonzola
Massa semi cozida	cura rápida cura prolongada	gouda prato
Massa cozida	cura prolongada	parmesão, reino, gruyère
Massa filada	sem cura com cura	mussarela provolone
Fundidos	sem cura /cremosos sem cura/cosnsistentes	requeijão cream cheese
Proteína de soro	sem cura/fresca	ricota fresca

FONTE: ABIQ, 2005.

Os queijos obtidos dos diferentes pontos de comercialização podem ser classificados, considerando os critérios da Associação Brasileira da Indústria de Queijos em:

- (a) mussarela (19);
- (b) prato (6);
- (c) requeijão (1);
- (d) frescos de massa crua subdivididos em: Minas frescal (25) e ricotas (11);
- (e) queijos artesanais subdivididos em colonial (23), montanhês (2), Minas padrão (1), gouda (1) e provolone (1).

Com o objetivo de verificar se existe uma correlação do grau e tipo de contaminação com os diferentes tipos de queijos, os resultados das análises microbiológicas foram organizados em tabelas considerando cada tipo separadamente (Tabelas 12,13,14, 15). Os queijos classificados como mussarela em geral apresentaram baixa contaminação o que pode estar relacionado ao tipo de processo tecnológico empregado na sua obtenção. Neste tipo de queijo não foi detectado *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* em nenhuma das 19 amostras analisadas. Três amostras apresentaram estafilococos coagulase positiva superior a 10^3 UFC/g e apenas uma amostra apresentou NMP de coliformes a 45°C superior a 1100/g de amostra (Tabela 12).

TABELA 12 RESULTADO DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE QUEIJOS MUSSARELA PRODUZIDOS E OBTIDOS EM PONTOS DE COMERCIALIZAÇÃO NO ESTADO DO PARANÁ, NOS ANOS 2001 E 2002

Produto	Estafilococos Coagulase positiva (UFC/g)	Coliforme a 45°C (NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp (25 g)	<i>L. monocytogenes</i> (25 g)
Queijo Mussarela Fatiado	$< 1,0 \times 10^2$	$< 3,0$	Ausência	Ausência
Queijo Tipo Mussarela	$< 1,0 \times 10^2$	$< 3,0$	Ausência	Ausência
Queijo tipo Mussarela	$1,8 \times 10^3$	4,0	Ausência	Ausência
Queijo Mussarela	$< 1,0 \times 10^2$	$< 3,0$	Ausência	Ausência
Queijo Mussarela	$< 1,0 \times 10^2$	$< 3,0$	Ausência	Ausência
Queijo Mussarela (Holandês)	$< 1,0 \times 10^2$	$< 3,0$	Ausência	Ausência
Queijo Mussarela Fatiado	$2,0 \times 10^3$	$4,6 \times 10^2$	Ausência	Ausência
Queijo Mussarela	$< 1,0 \times 10^2$	$< 3,0$	Ausência	Ausência
Queijo Mussarela Holandês	$< 1,0 \times 10^2$	$< 3,0$	Ausência	Ausência
Queijo Mussarela	$< 1,0 \times 10^2$	9,0	Ausência	Ausência
Queijo Mussarela	$< 1,0 \times 10^2$	4,0	Ausência	Ausência
Queijo Mussarela	$< 1,0 \times 10^2$	$< 3,0$	Ausência	Ausência
Queijo Mussarela	$< 1,0 \times 10^2$	$< 3,0$	Ausência	Ausência
Queijo Mussarela	$< 1,0 \times 10^2$	$< 3,0$	Ausência	Ausência
Queijo Mussarela	$< 1,0 \times 10^2$	$< 3,0$	Ausência	Ausência
Queijo Mussarela	$< 1,0 \times 10^2$	$< 3,0$	Ausência	Ausência
Queijo Tipo Mussarela	$2,6 \times 10^3$	$< 3,0$	Ausência	Ausência
Queijo Tipo Mussarela	$< 1,0 \times 10^2$	$> 1,1 \times 10^3$	Ausência	Ausência
Queijo Fatiado Mussarela	$< 1,0 \times 10^2$	$< 3,0$	Ausência	Ausência

Para os queijos classificados como prato e requeijão (Tabela 13) apenas uma amostra de queijo prato estava contaminada com *L. monocytogenes*.

Não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. nestes tipos de queijos. A contagem de estafilocos coagulase positiva foi abaixo de 100 UFC/g do produto.

TABELA 13 - RESULTADO DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE QUEIJOS PRATO E REQUEIJÃO PRODUZIDOS E OBTIDOS EM PONTOS DE COMERCIALIZAÇÃO NO ESTADO DO PARANÁ, ANOS 2001 E 2002

Produto	Estafilo coagulase positiva (UFC/g)	Coliforme a 45°C (NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp (25 g)	<i>Listeria monocytogenes</i> (25 g)
Queijo Prato fatiado	$< 1,0 \times 10^2$	$> 1,1 \times 10^3$	Ausência	Presença
Queijo Prato*	$< 1,0 \times 10^2$	$< 3,0$	Ausência	Ausência
Queijo Lanche fatiado	$< 1,0 \times 10^2$	$7,5 \times 10$	Ausência	Ausência
Queijo Prato	$< 1,0 \times 10^2$	$< 3,0$	Ausência	Ausência
Queijo Prato Light	$< 1,0 \times 10^2$	$< 3,0$	Ausência	Ausência
Queijo Prato Lanche	$< 1,0 \times 10^2$	$9,3 \times 10$	Ausência	Ausência
Requeijão	$< 1,0 \times 10^2$	$< 3,0$	Ausência	Ausência

Nos queijos classificados como frescos de massa crua (Tabela 14) em duas amostras detectou-se a presença de *L. monocytogenes* (queijo Minas Frescal magro e ricota fresca) e em nenhuma das 36 amostras foi isolada *Salmonella* spp. Quatro amostras apresentaram contagens de estafilococos coagulase positiva superiores a 100 UFC/g do produto tendo sido observado nestas amostras valores que variaram de 200 a maiores que 300.000 UFC/g de produto. Um total de 6 amostras apresentou um grau de contaminação de risco potencial de coliformes a 45°C, tendo variado de 1.100 a 11.000 NMP/g de produto, sendo 4 queijo Minas Frescal e 2 ricotas. Duas amostras de queijo Minas Frescal apresentaram um elevado grau de contaminação em relação a coliformes a 45°C, superior a 11.000 NMP/g de amostra o que pode caracterizar risco eminente de contaminação por patogênicos o que os tornam impróprios para o consumo. O elevado grau de contaminação destas amostras pode estar correlacionado ao processo de obtenção dos mesmos tendo em vista que estes produtos não sofrem tratamento térmico no seu processo de fabricação estando, portanto a qualidade microbiológica dependente da qualidade da matéria prima e dos controles de processo.

TABELA 14 - RESULTADO DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE QUEIJOS FRESCOS DE MASSA CRUA (MINAS FRESCAL E RICOTAS) PRODUZIDOS E OBTIDOS EM PONTOS DE COMERCIALIZAÇÃO NO ESTADO DO PARANÁ NOS ANOS 2001 E 2002

Produto	Estafilo coagulase positiva (UFC/g)	Coliforme a 45°C (NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp (25 g)	<i>L. monocytogenes</i> (25 g)
Queijo Minas Frescal Light	< 1,0 x 10 ²	1,1 x 10 ³	Ausência	Ausência
Queijo Minas Frescal Light	< 1,0 x 10 ²	1,1 x 10 ³	Ausência	Ausência
Queijo Minas Magro	< 1,0 x 10 ²	>1,1 x 10 ⁴	Ausência	Ausência
Queijo Minas Frescal Light	< 1,0 x 10 ²	2,4 x 10 ²	Ausência	Ausência
Queijo Tipo Minas Magro	< 1,0 x 10 ²	>1,1 x 10 ⁴	Ausência	Ausência
Queijo Minas frescal Light	< 1,0 x 10 ²	4,0	Ausência	Ausência
Queijo Minas Frescal	< 1,0 x 10 ²	2,1 x 10 ²	Ausência	Ausência
Queijo Minas Frescal Light	< 1,0 x 10 ²	4,0	Ausência	Ausência
Queijo Minas Frescal	< 1,0 x 10 ²	> 1,1 x 10 ³	Ausência	Ausência
Queijo Minas Frescal	> 3,0 x 10 ⁵	> 1,1 x 10 ³	Ausência	Ausência
Queijo Minas	< 1,0 x 10 ²	< 3,0	Ausência	Ausência
Queijo Minas Magro	< 1,0 x 10 ²	< 3,0	Ausência	Ausência
Queijo Minas Frescal	< 1,0 x 10 ²	1,5 x 10	Ausência	Ausência
Queijo Minas Light	< 1,0 x 10 ²	1,5 x 10 ³	Ausência	Ausência
Queijo Minas Frescal Magro	9,0 x 10 ²	4,6 x 10 ³	Ausência	Presença
Queijo Minas Frescal	< 1,0 x 10 ²	9,3 x 10	Ausência	Ausência
Queijo Tipo Minas Frescal	< 1,0 x 10 ²	< 3,0	Ausência	Ausência
Queijo Minas Frescal	4,2 x 10 ³	< 3,0	Ausência	Ausência
Queijo Minas Light	< 1,0 x 10 ²	< 3,0	Ausência	Ausência
Queijo Minas Frescal Light	2,0 x 10 ²	< 3,0	Ausência	Ausência
Queijo Minas Frescal Magro	< 1,0 x 10 ²	< 3,0	Ausência	Ausência
Queijo Minas Magro	< 1,0 x 10 ²	1,1 x 10 ³	Ausência	Ausência
Queijo tipo Minas Frescal	< 1,0 x 10 ²	< 3,0	Ausência	Ausência
Queijo tipo Minas Frescal	< 1,0 x 10 ²	4,0	Ausência	Ausência
Queijo branco	< 1,0 x 10 ²	< 3,0	Ausência	Ausência
Ricota Fresca	< 1,0 x 10 ²	1,1 x 10 ⁴	Ausência	Ausência
Ricota	< 1,0 x 10 ²	< 3,0	Ausência	Ausência
Ricota Fresca	< 1,0 x 10 ²	4,3 x 10	Ausência	Ausência
Ricota Fresca	< 1,0 x 10 ²	< 3,0	Ausência	Ausência
Ricota Fresca Prensada	< 1,0 x 10 ²	1,5 x 10 ²	Ausência	Ausência
Ricota Fresca	< 1,0 x 10 ²	4,3 x 10	Ausência	Ausência
Ricota Fresca	< 1,0 x 10 ²	4,3 x 10	Ausência	Ausência
Ricota Fresca	< 1,0 x 10 ²	< 3,0	Ausência	Presença
Ricota Fresca	< 1,0 x 10 ²	< 3,0	Ausência	Ausência
Ricota Fresca Prensada	< 1,0 x 10 ²	< 3,0	Ausência	Ausência
Ricota Prensada	< 1,0 x 10 ²	1,5 x 10 ³	Ausência	Ausência

Nos queijos classificados como artesanal (Tabela 15) em três amostras de queijo colonial foi isolado *Listeria monocytogenes*. Um total de 11 amostras apresentou NMP de coliformes a 45°C superiores a 1100/g de produto. Dez amostras apresentaram NMP com níveis de contaminação entre 1100 a 11.000/g e uma apresentou NMP de coliformes a 45°C superior a 11.000/g. Nenhuma das 28 amostras de queijos artesanais ocorreu o isolamento de *Salmonella* spp. Seis amostras apresentaram níveis de alerta em relação à contagem de estafilococos coagulase positiva com grau de contaminação

variando entre 10^3 e 10^4 UFC/g, duas amostras (queijo colonial) apresentaram níveis superiores a 10^5 UFC/g apresentando risco de causar toxi-infecção alimentar.

TABELA 15 - RESULTADO DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DOS QUEIJOS ARTESANAIS PRODUZIDOS E OBTIDOS EM PONTOS DE COMERCIALIZAÇÃO NO ESTADO DO PARANÁ NOS ANOS 2001 E 2002

Produto	Estafilo coagulase positiva (UFC/g)	Coliforme a 45°C (NMP/g)	Salmonella spp (25 g)	L. monocytogenes (25 g)
Queijo Montanhês (fatiado pela empresa)	$< 1,0 \times 10^2$	$< 3,0$	Ausência	Ausência
Queijo Montanhês (fatiado)	$< 1,0 \times 10^2$	$< 3,0$	Ausência	Ausência
Queijo tipo Gouda	$2,0 \times 10^2$	$> 1,1 \times 10^3$	Ausência	Ausência
Queijo Minas Padrão	$< 1,0 \times 10^2$	$< 3,0$	Ausência	Ausência
Queijo Provolone	$< 1,0 \times 10^2$	4,0	Ausência	Ausência
Queijo Colonial	$< 1,0 \times 10^2$	$> 1,1 \times 10^3$	Ausência	Ausência
Queijo Colonial	$< 1,0 \times 10^2$	$> 1,1 \times 10^3$	Ausência	Ausência
Queijo Tipo Colonial	$< 1,0 \times 10^2$	$< 3,0$	Ausência	Ausência
Queijo Tipo Colonial	$< 1,0 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	Ausência	Ausência
Queijo Colonial	$2,0 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	Ausência	Ausência
Queijo Colonial Condimentado	$8,0 \times 10^3$	$> 1,1 \times 10^3$	Ausência	Ausência
Queijo Colonial	$< 1,0 \times 10^2$	$2,3 \times 10$	Ausência	Ausência
Queijo Colonial	$< 1,0 \times 10^2$	9,0	Ausência	Ausência
Queijo Colonial	$< 1,0 \times 10^2$	$> 1,1 \times 10^3$	Ausência	Ausência
Queijo Colonial	$< 1,0 \times 10^2$	$> 1,1 \times 10^3$	Ausência	Ausência
Queijo Colonial	$> 3,0 \times 10^5$	$> 1,1 \times 10^3$	Ausência	Ausência
Queijo Colonial (com casca)	$> 3,0 \times 10^5$	$< 3,0$	Ausência	Ausência
Queijo tipo Colonial	$< 1,0 \times 10^2$	$< 3,0$	Ausência	Ausência
Queijo Colonial	$< 1,0 \times 10^2$	$2,3 \times 10$	Ausência	Ausência
Queijo Colonial	$5,0 \times 10^3$	$9,3 \times 10$	Ausência	Ausência
Queijo Colonial	$9,2 \times 10^4$	$< 3,0$	Ausência	Presença
Queijo Colonial	$< 1,0 \times 10^2$	$> 1,1 \times 10^4$	Ausência	Ausência
Queijo Colonial	$< 1,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10$	Ausência	Ausência
Queijo Colonial	$< 1,0 \times 10^2$	$2,1 \times 10^3$	Ausência	Ausência
Queijo Colonial	$< 1,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10$	Ausência	Ausência
Queijo Colonial	$7,3 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	Ausência	Presença
Queijo Colonial	$2,0 \times 10^4$	$2,4 \times 10^2$	Ausência	Ausência
Queijo Tipo Colonial	$< 1,0 \times 10^2$	$> 1,1 \times 10^3$	Ausência	Presença

5.1.4.2. Avaliação dos queijos obtidos de pontos de comercialização em relação aos limites de tolerância microbiológica conforme legislação vigente

Os resultados das análises microbiológicas dos queijos foram também analisados frente à legislação vigente do Ministério de Saúde, Resolução RDC n°12 de 02/01/01, a qual estabelece os parâmetros microbiológicos de adequação do produto para o consumo humano considerando os diferentes tipos de queijo e teores de umidade (Quadro 02)

QUADRO 02 - LIMITES MICROBIOLÓGICOS DE ACORDO COM A RDC 12 DE 02/01/2001 PARA QUEIJOS CONFORME TEOR DE UMIDADE.

Teor de umidade do queijo	Tolerância para amostra indicativa			
	Estafilo coagulase positiva (UFC/g)	Coliforme a 45°C (NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp (25 g)	<i>Listeria monocytogenes</i> (25 g)
Baixo	Max. 10 ³ /g	Máx. 5,0 x 10 ² /g	Ausência	-
Médio	Máx. 10 ³ /g	Máx. 10 ³ /g	Ausência	Ausência
Alto	Máx. 10 ³ /g	Máx.5,0 x 10 ³ /g	Ausência	Ausência
Muita alto	Máx. 5 x10 ² /g	Máx.5,0 x 10 ² /g	Ausência	Ausência

FONTE: RDC 12 de 02/01/2001 da ANVISA/MS

Das 90 amostras analisadas provenientes dos pontos de comercialização em média 33,33 % não atendem ao padrão microbiológico estabelecido pela Resolução RDC n° 12 de 02/01/01. Os queijos classificados como muito alta umidade apresentaram maior número de amostras com grau de contaminação microbiológica acima dos limites tolerados (Tabela 16). Os queijos de alta umidade foram os que apresentaram o menor número de amostras fora da especificação microbiológica (30%).

TABELA 16 - NÚMERO DE AMOSTRAS ANALISADAS QUE ATENDEM E NÃO ATENDEM A LEGISLAÇÃO VIGENTE X TEOR DE UMIDADE

TEOR DE UMIDADE - QUEIJO	NÚMERO DE AMOSTRAS		
	Analisadas	Atendem legislação vigente	Não atendem legislação vigente
BAIXO	13	9 (69,23 %)	4 (30,77 %)
MÉDIO UMIDADE	33	22 (66,67 %)	11 (33,33 %)
ALTO UMIDADE	20	14 (70 %)	6 (30 %)
MUITO ALTO	24	15 (62,50 %)	9 (37,50 %)
TOTAL / %	90	60 (66,67 %)	30 (33,33 %)

Tendo em vista que a legislação considera principalmente o teor de umidade no estabelecimento dos parâmetros para tolerância microbiológica, é necessário que essa análise frente à legislação seja feita considerando os diferentes teores de umidade. Os

queijos classificados como de baixa umidade (13 amostras) (Tabela 17). Num total de 30,70% dessas não atenderam ao padrão microbiológico preconizado pela legislação vigente. Essas amostras foram reprovadas na contagem de estafilococos coagulase positiva tendo ainda o agravante de que duas amostras estavam com seus limites acima da dose infectante. Estes produtos são passíveis de acarretar intoxicação alimentar. Foi observado também que uma amostra de queijo colonial apresentou NMP de coliformes a 45°C acima da tolerância para amostra indicativa. Nas pesquisas realizadas foi incluída a pesquisa de *Listeria monocytogenes* apesar de não ser um parâmetro exigido pela legislação vigente.

TABELA 17 - CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE TIPOS DE QUEIJOS COM BAIXA UMIDADE E QUE NÃO ATENDEM A RDC – 12 DE 02 DE JANEIRO DE 2001

Ano de 2002	MICROORGANISMOS PESQUISADOS			
	Estafilo coagulase positiva (UFC/g)	Coliforme a 45°C (NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp (25 g)	<i>Listeria monocytogenes</i> (25 g)
Queijo Colonial	> 3,0 x 10 ⁵	>1,1 x 10 ³	Ausência	Ausência
Queijo tipo mussarela	2,6 x 10 ³	<3,0	Ausência	Ausência
Queijo Colonial	> 3,0 x 10 ⁵	< 3,0	Ausência	Ausência
Queijo Colonial	2,0 x 10 ⁴	2,4 x 10 ²	Ausência	Ausência
Tolerância para amostra indicativa	Max. 10 ³ UFC/g	Máx. 5,0 x 10 ² /g	Ausência	Não preconizado

Para os queijos classificados como de média umidade (33 amostras) (Tabela 18). Observa-se que o parâmetro de maior freqüência de condenação foi o NMP de coliformes a 45°C/g de produto, em níveis superiores a 10³, seguido da contagem de estafilococos coagulase positiva em níveis de 10³ a 10⁴ UFC/g e presença de *Listeria monocytogenes* em três amostras. As 3 amostras de onde foram isolados *Listeria monocytogenes* consiste de queijo prato fatiado que estava disponível para comercialização em um grande supermercado de Curitiba. Uma amostra de queijo colonial, oriunda de Francisco Beltrão com registro estadual e, também uma amostra de queijo colonial coletada em Cascavel tendo o estabelecimento produtor registro no Serviço de Inspeção Federal (SIF). Como se pode observar os queijos contaminados por *Listeria*, são oriundos de diferentes regiões do estado, e de unidades produtoras

com diferentes graus de fiscalização. Foi observado que em nenhuma das amostras ocorreu o isolamento de *Salmonella* spp.

TABELA 18 - CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE QUEIJOS COM MÉDIA UMIDADE E QUE NÃO ATENDEM A RDC – 12 DE 02 DE JANEIRO DE 2001

MICROORGANISMOS PESQUISADOS				
	Estafilo coagulase positiva (UFC/g)	Coliforme a 45°C (NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp (25 g)	<i>Listeria monocytogenes</i> (25 g)
Ano de 2001				
Queijo Colonial	<100	>1,1 x 10 ³	Ausência	Ausência
Queijo Colonial	<100	>1,1 x 10 ³	Ausência	Ausência
Queijo tipo Gouda	200	>1,1 x 10 ³	Ausência	Ausência
Queijo tipo mussarela	1,8 x 10 ³	4	Ausência	Ausência
Queijo colonial condimentado	8,0 x 10 ³	> 1,1 x 10 ³	Ausência	Ausência
Queijo tipo colonial	<100	>1,1 x 10 ³	Ausência	Ausência
Queijo prato fatiado	<100	>1,1 x 10 ³	Ausência	Presença
Ano de 2002				
Queijo Colonial	7,3 x 10 ⁴	1,1 x 10 ⁴	Ausência	Presença
Queijo tipo mussarela fatiado	2,0 x 10 ³	4,6 x 10 ²	Ausência	Ausência
Queijo tipo colonial	<100	> 1,1 x 10 ³ / g	Ausência	Presença
Queijo tipo Mussarela	<100	>1,1 x 10 ³	Ausência	Ausência
Tolerância p/ amostra indicativa	Máx. 10 ³ /g	Máx. 10 ³ /g	Ausência	Ausência

Para os queijos classificados como de alta umidade (20 amostras) 30% das amostras não atendem as exigências microbiológicas segundo a RDC 12 de 02 /01/2001 da ANVISA/MS (Tabela 19). O principal motivo de condenação das amostras foi o NMP de coliformes a 45°C/ g do produto com níveis superiores a 10⁴ seguido da contagem de estafilococos coagulase positiva apresentando valores superiores de 2 a 5 vezes ao limite estabelecido. Ocorreu também o isolamento de *Listeria innocua* em uma das amostras classificada como queijo Minas magro proveniente de estabelecimento produtor de Umuarama - PR com Serviço de Inspeção Municipal. A legislação estabelece a condenação da amostra se ocorrer o isolamento de *Listeria monocytogenes*, pois esta é a espécie comprovadamente patogênica ao homem. Em nenhuma dessas amostras ocorreu o isolamento de *Salmonella* spp.

TABELA 19 - CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE QUEIJOS COM ALTA UMIDADE E QUE NÃO ATENDEM A RDC – 12 DE 02 DE JANEIRO DE 2001

MICRORGANISMOS PESQUISADOS				
	Estafilo coagulase positiva (UFC/g)	Coliforme a 45°C (NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp (25 g)	<i>Listeria monocytogenes</i> (25 g)
Ano de 2001				
Queijo Colonial	2,0 x 10 ³	1,1 x 10 ³	Ausência	Ausência
Queijo Minas magro	<100	>1,1 x 10 ⁴	Ausência	Ausência*
Queijo Minas magro	<100	>1,1 x 10 ⁴	Ausência	Ausência
Ano de 2002				
Queijo Colonial	5,0 x 10 ³	9,3 x 10	Ausência	Ausência
Queijo Minas frescal	4.2 x 10 ³	< 3,0	Ausência	Ausência
Queijo colonial	<1,0 x 10 ²	>1,1 x 10 ⁴	Ausência	Ausência
Tolerância p/ amostra indicativa	Máx. 10 ³ /g	Máx.5,0 x 10 ³ /g	Ausência	Ausência

* Isolado *Listeria innocua*

Para os queijos classificados como de muita alta umidade (24 amostras) (Tabela 20) se observa que o mais freqüente motivo de condenação dessas amostras é o NMP de coliformes a 45°C/g de produto, com níveis de 10³ e superiores, seguido da contagem de estafilococos coagulase positiva onde uma amostra apresentou 9 vezes nível de contaminação superior ao limite tolerado, outra níveis de 10⁴ e uma terceira amostra níveis acima da dose infectante de 10⁵. Em duas amostras foi isolado *Listeria monocytogenes* sendo uma das amostras de queijo colonial produzido por pequenos produtores de Guarapuava e comercializado em feira livre na cidade de Curitiba, e a outra em queijo Minas Frescal magro produzido por estabelecimento sujeito ao Serviço de Inspeção do Paraná e estava sendo comercializada em Curitiba. Também foi isolado *Listeria innocua* em duas outras amostras. A primeira de queijo Minas Frescal produzido por estabelecimento com inspeção estadual e comercializada em Paranavaí e a segunda também proveniente de estabelecimento com inspeção estadual e comercializado em feira livre de Curitiba. Em nenhuma das amostras de queijo com muito alta umidade ocorreu o isolamento de *Salmonella* spp.

TABELA 20 - CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE QUEIJOS COM MUITO ALTA UMIDADE E QUE NÃO ATENDEM A RDC – 12 DE 02 DE JANEIRO DE 2001

	MICROORGANISMOS PESQUISADOS			
	Estafilo coagulase positiva (UFC/g)	Coliforme a 45°C (NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp (25 g)	<i>Listeria monocytogenes</i> (25 g)
Ano de 2002				
Queijo Minas frescal	$> 3,0 \times 10^5$	$> 1,1 \times 10^3$	Ausência	Ausência
Queijo Minas frescal	$< 1,0 \times 10^2$	$> 1,1 \times 10^3$	Ausência	Ausência *
Queijo Minas magro	$< 1,0 \times 10^2$	$1,1 \times 10^3$	Ausência	Ausência
Ricota fresca	$< 1,0 \times 10^2$	$1,1 \times 10^4$	Ausência	Ausência
Queijo colonial	$9,2 \times 10^4$	$< 3,0$	Ausência	Presença
Queijo Minas light	$< 1,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$	Ausência	Ausência
Queijo Minas frescal magro	$9,0 \times 10^2$	$4,6 \times 10^3$	Ausência	Presença
Queijo Minas magro (ricota prensada)	$< 1,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$	Ausência	Ausência*
Ricota fresca	$< 1,0 \times 10^2$	$< 3,0$	Ausência	Presença
Tolerância p/ amostra indicativa	Máx. 5×10^2 /g	Máx. $5,0 \times 10^2$ /g	Ausência	Ausência

* Isolado *Listeria innocua*

A contagem de microrganismos do grupo coliforme, sobretudo os de origem fecal, indica as condições de higiene em que os queijos foram produzidos, uma vez que tais microrganismos, comumente encontrados no leite cru, são geralmente destruídos pela pasteurização. Normalmente, a presença de coliformes fecais em alimentos está relacionada com contaminação fecal de animais e do homem, embora a ocorrência de *Escherichia coli* seja mais adequada para tais conclusões. A presença de indicadores de contaminação fecal provavelmente revela condições inadequadas de higiene durante a fabricação dos queijos, ficando claro que os mesmos podem estar sendo expostos à contaminação por microrganismos indesejáveis, inclusive patogênicos. Além disso, deve-se ressaltar a importância de algumas linhagens de *E. coli* como enteropatógenos potenciais. A presença de coliformes a 45°C fora dos padrões recomendados sugere a utilização de leite para fabrico dos queijos excessivamente contaminado devido à sub-pasteurização, contaminação pós-processamento, exposição do produto beneficiado a temperatura superior a 10°C ou ainda ausência de pasteurização. Medidas adequadas de fiscalização sanitária devem ser adotadas, para adequar o produto às normas vigentes estabelecidas pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento, segundo a qual o leite deve ser higienizado e submetido ao processo de pasteurização. Margolles *et al.*, (1996) encontraram uma associação significativa entre altas contagens de coliformes e a presença de *Listeria spp* e *Listeria monocytogenes* em amostras de queijo. Esses

resultados sugerem que condições precárias de manipulação favorecem a contaminação tanto de coliformes como de *Listeria spp.* Durante as análises observou-se que quatro amostras atendiam aos limites preconizados pela RDC 12 de 02 de janeiro de 2001 em relação aos parâmetros de estafilococos coagulase positiva, coliformes a 45°C e *Salmonella spp.*, entretanto nessas amostras constatou-se o isolamento de *Listeria spp.*, tendo numa das amostras o isolamento de *Listeria monocytogenes* (tabela 21).

TABELA 21 - AMOSTRAS ANALISADAS NÃO CONDENADAS PELOS PARÂMETROS ESTAFILOCOCCOS COAGULASE POSITIVA, COLIFORMES A 45°C E *Salmonella spp* MAS QUE APRESENTAVAM A PRESENÇA DE *Listeria spp.*

	Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)	NMP de Coliformes a 45°C/ g	Pesquisa de <i>Salmonella spp</i> (25 g)	Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> (25 g)
Queijo tipo Minas Frescal (média umidade)	< 100	4	Ausência	Cultura negativa VIP + (Cultura a partir do BLED : <i>Listeria innocua</i>)
Ricota fresca (muito alta umidade)	< 100	< 3,0	Ausência	Cultura negativa VIP + (Cultura do BLED - <i>L. monocytogenes</i>)
Queijo Minas Magro (muito alta umidade)	< 100	< 3,0/g	Ausência	Cultura positiva para <i>Listeria innocua</i> VIP +
Queijo Minas magro (muito alta umidade)	< 100	1,5 x 10 ²	Ausência	Cultura positiva para <i>Listeria innocua</i> VIP + (cultura a partir do BLED positivos para <i>Listeria innocua</i>)

A amostra na qual ocorreu o isolamento de *Listeria monocytogenes*, tratava-se de uma amostra de ricota fresca que era comercializada em feira livre de Curitiba proveniente de estabelecimento com Serviço de Inspeção Estadual. Nas outras três amostras foram isoladas *Listeria innocua*. Estes três produtos provem de estabelecimentos com inspeção federal e estadual e estavam sendo comercializados em Curitiba. Estes resultados enfatizam a necessidade de que os laboratórios de microbiologia de alimentos incluam em sua rotina a pesquisa de *Listeria spp.* pela importância sanitária deste gênero.

Enfatiza-se, portanto, a importância do cumprimento das normas relativas às Boas Práticas de Fabricação, a fim de se obter produtos lácteos de qualidade superior, incluindo o controle sanitário do rebanho, a obtenção higiênica do leite, a conservação

adequada do leite ordenhado, o controle higiênico-sanitário dos operadores, a utilização de leite pasteurizado e a limpeza e desinfecção adequada dos equipamentos e utensílios utilizados no processamento.

Indica também a necessidade de se melhorar os cuidados na coleta, transporte e processamento da matéria prima. Devem-se implementar normas de qualidade (HACCP) no processo de produção deste produto e a ação dos órgãos de vigilância sanitária de forma a garantir que os produtos atendam os padrões de qualidade microbiológica, visando proteger a saúde do consumidor, tendo em vista a severidade dos riscos resultantes da infecção que este microrganismo pode ocasionar na população de risco.

5.1.4.3. Avaliação microbiológica das amostras de queijo envolvidas em DTA

Na análise dos resultados das amostras envolvidas em DTA utilizou-se o critério de dose infectante (10^5) para *S. aureus*, *B.cereus*, Clostrídios sulfito redutores a 45°C, presença de indicador de origem fecal (*E. coli*) e presença de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em 25 g.

Das amostras analisadas, envolvidas em DTA, nove delas (90%), apresentaram contaminação por *Staphylococcus aureus* acima de sua dose infectante (10^5 UFC/g). Sendo que seis amostras apresentaram também a presença de *Escherichia coli*, considerado indicador de contaminação fecal, em níveis de Número Mais Provável igual ou superior a $1,1 \times 10^4$ /g. Três amostras que apresentaram *Staphylococcus aureus* acima de sua dose infectante tiveram contagens de *E. coli* mais baixas na ordem de $1,1 \times 10^2$, $4,6 \times 10^2$ e $1,1 \times 10^3$ respectivamente. Em nenhuma destas amostras foi isolado *Listeria monocytogenes* como de *Listeria* spp., tanto pelo método convencional quanto pelo VIP (triagem). As sementeiras realizadas também não revelaram o desenvolvimento de Clostridio sulfito redutor a 46°C, *Clostridium perfringens*; *Bacillus cereus* e *Salmonella* spp. .Em uma das amostras (III/2002) não ocorreu o isolamento de *Staphylococcus aureus*, nem de outros possíveis agentes de DTA pesquisados. Nessa amostra detectou-se a presença de *Escherichia coli* em quantidade superior a $1,1 \times$

10⁴/g o que significa a presença de indicadores de contaminação fecal e risco ao consumo deste produto (Tabela 22).

TABELA 22 - CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DOS QUEIJOS ENVOLVIDOS EM EVENTOS DE SURTO DE DTA NO ESTADO DO PARANÁ, NOS ANOS 2001 E 2002

Queijos Coloniais	MICROORGANISMOS PESQUISADOS						CONVENCIONAL (25 g)	VIP
	<i>Clostrídio perfringens</i> (UFC/g)	<i>S. aureus</i> (UFC/g)	<i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)	<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp (25g)	<i>Listeria monocytogenes</i>		
Ano 2001								
I	<10/ g	>3,0 x 10 ⁷	< 100 /g	1,1 x 10 ⁴	A	A	N	
II	<10/ g	1,0 x 10 ⁵	< 100 /g	1,1 x 10 ⁴	A	A	N	
III	<10/ g	1,0 x 10 ⁵	< 100 /g	1,1 x 10 ⁴	A	A	N	
IV	<10/ g	2,0 x 10 ⁶	< 100 /g	> 1,1 x 10 ⁴	A	A	N	
Ano 2002								
I	<10/ g	>3,0 x 10 ⁷	< 100	> 1,1 x 10 ⁴	A	A	N	
II	<10/ g	>3,0 x 10 ⁷	< 100	1,1 x 10 ²	A	A	N	
III	<10/ g	<1,0 x 10 ²	< 100	> 1,1 x 10 ⁴	A	A	N	
IV	<10/ g	4,1 x 10 ⁶	< 100	4,6 x 10 ²	A	A	N	
V	< 10/g	>3,0 x 10 ⁶	< 100	< 3,0	A	A	N	
VI	<10/g	>3,0 x 10 ⁶	< 100	1,1 x 10 ³	A	A	N	
DI	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	ICF	P	P	T	

Nota: A - ausência ; N – negativo; IC F – indicador de contaminação fecal; DI – dose infectante; P- presença; T- triagem.

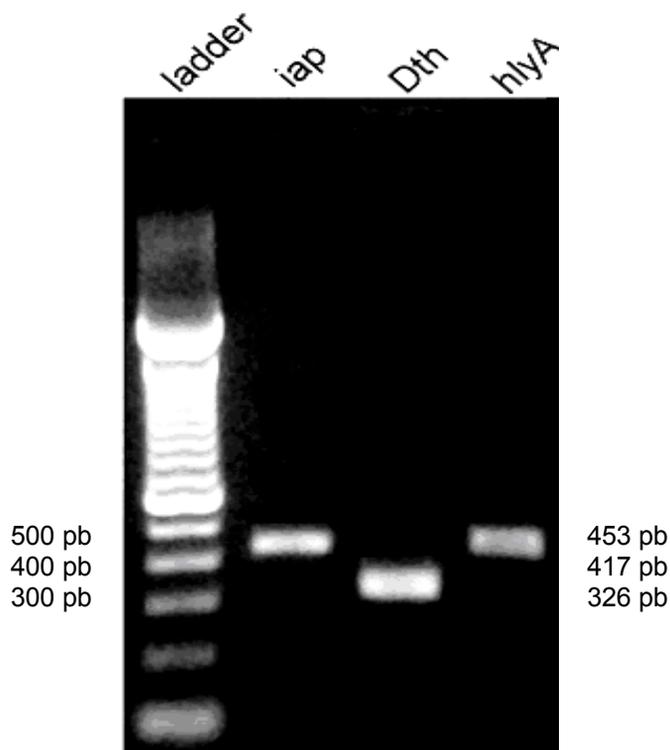
Na epidemiologia do *S. aureus*, o homem e outros animais representam seus principais reservatórios, estando presente na mucosa nasal, garganta, cabelo e pele de mais de 50% da população humana. Ainda são responsáveis por infecções. Desde lesões na pele até infecções generalizadas e sistêmicas. Esse microrganismo quando oriundo de animais está vinculado principalmente ao leite de gado acometido de mastite. O produto nessas condições representa um risco potencial na veiculação de *S. aureus* produtor de enterotoxinas, contaminando alimentos derivados como o queijo. Embora, a fonte de contaminação de *S. aureus* de origem animal em alimentos tenha um significado epidemiológico importante, é considerada como fonte principal na ocorrência de surtos de DTA, a originária de manipuladores de alimentos portadores de cepas enterotoxigênicas, sendo as fossas nasais o principal reservatório. A presença nas mãos

e outras superfícies, isentas de lesões, resulta da disseminação por contato com áreas de habitat natural do microrganismo. Portanto, o manipulador de alimentos portador de *S. aureus* enterotoxigênico representa um importante elo na cadeia epidemiológica dos surtos de DTA. Logo, a ampla disseminação do *S. aureus* no ambiente justifica a freqüente presença desse microrganismo nos alimentos, principalmente naqueles submetidos à intensa manipulação sob condições precárias de higiene. O queijo, por ser um produto que exige muita manipulação na sua fabricação, é muito vulnerável à contaminação por esse microrganismo. Além de ser um alimento rico em proteína o que serve como um excelente meio de cultura para o desenvolvimento desse microrganismo. De acordo com McKane e Kandel (1996) a manutenção de alimentos contaminados em temperaturas entre 20 e 35°C por várias horas permite a multiplicação de *Staphylococcus* coagulase positiva e a liberação de toxinas suficiente para gerar os sintomas da intoxicação. Segundo ICMSF (1996), concentrações de *Staphylococcus aureus* acima de 10^5 UFC/g de produto são considerados suficientes para a produção de toxinas estafilocócicas em níveis propícios para a ocorrência de enterotoxemia em pessoas que venham a consumir o leite e seus derivados. Dessa forma, torna-se fundamental o controle das condições as quais o produto final é submetido após a fabricação, principalmente durante a sua distribuição e comercialização. O armazenamento refrigerado, durante essas fases, apresenta-se como um forte aliado à preservação da qualidade dos alimentos perecíveis, entre os quais se destacam os diferentes tipos de queijo. A refrigeração mostra-se importante não somente para o controle do desenvolvimento de *Staphylococcus* coagulase positiva nos alimentos como também de outros microrganismos patogênicos e deterioradores. A interrupção da cadeia do frio deve ser evitada, durante a distribuição e comercialização, eliminando-se oscilações de temperatura nessas fases, visando garantir a manutenção da qualidade dos queijos.

5.2. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *L. monocytogenes*

5.2.1 Caracterização molecular da cepa padrão 07F7G de *L. monocytogenes*

Foi realizada a caracterização molecular da cepa padrão 07F7G de *L. monocytogenes* após cultivo deste microrganismo em ágar nutriente a 35°C por 24 horas e extração do DNA pelo método convencional da Proteinase K. A utilização dos *primers* 234 e 319 para o gene *hlyA*, e dos *primers* A1 e A2 para o gene *Dth18*, permitiu a amplificação de fragmentos com 417pb e 326pb respectivamente. A utilização dos *primers* Mar1 e Mar2 permitiu a amplificação de uma região altamente variável do gene *iap*, resultando num segmento de 453pb exclusivo de *L. monocytogenes*, conforme mostrado na figura 23.



Amplificação do DNA extraído da cepa 07F7G de *L. monocytogenes*. Ladder: marcador de peso molecular de 100pb; *iap*: amplificação de um segmento de 453pb do gene *iap*; *Dth*: amplificação de um segmento de 326pb do gene *Dth18*; *hlyA*: amplificação de um segmento de 417pb do gene *hlyA*;

FIGURA 23 - AMPLIFICAÇÃO DOS GENES *hlyA*, *Dth18* E *iap* DE DNA EXTRAÍDO DA CEPA PADRÃO

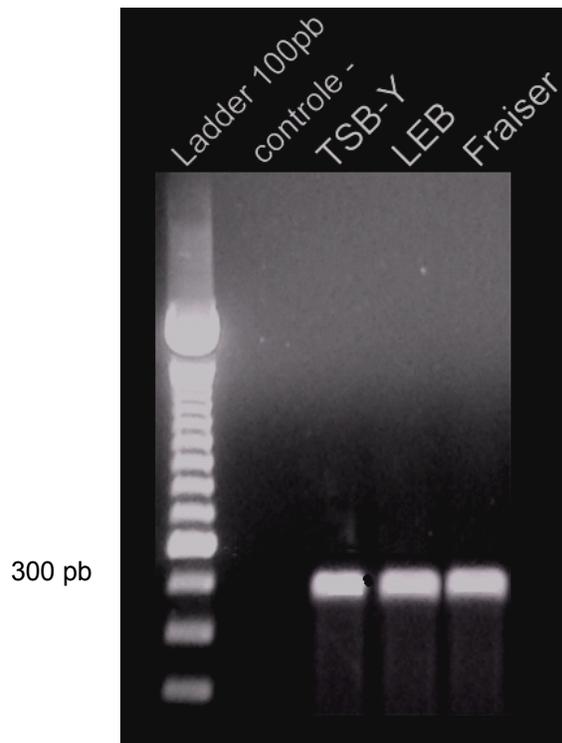
5.2.2 Caracterização molecular da cepa padrão 07F7G de *L. monocytogenes* após enriquecimento em LEB, TSB-Y, Fraiser e Fraiser modificado

Na análise de alimentos por PCR a presença de células mortas do patógeno pode dar um resultado falso positivo. Por outro lado, a presença de certos constituintes dos alimentos pode causar a inibição da PCR, levando a um resultado falso negativo. Com o objetivo de superar estas limitações, diversos pesquisadores buscaram alternativas técnicas.

Para evitar falso positivo, alguns trabalhos utilizam a RT-PCR (KLEIN; JUNEJA, 1997); (HERMAM, 1997). Esta variação da PCR amplifica apenas o RNAm utilizando a enzima transcriptase reversa. O RNAm em células bacterianas é uma molécula pouco estável, sendo rapidamente degradada. A dificuldade na extração do RNAm e o custo elevado desta técnica dificultam a aplicação deste tipo de análise.

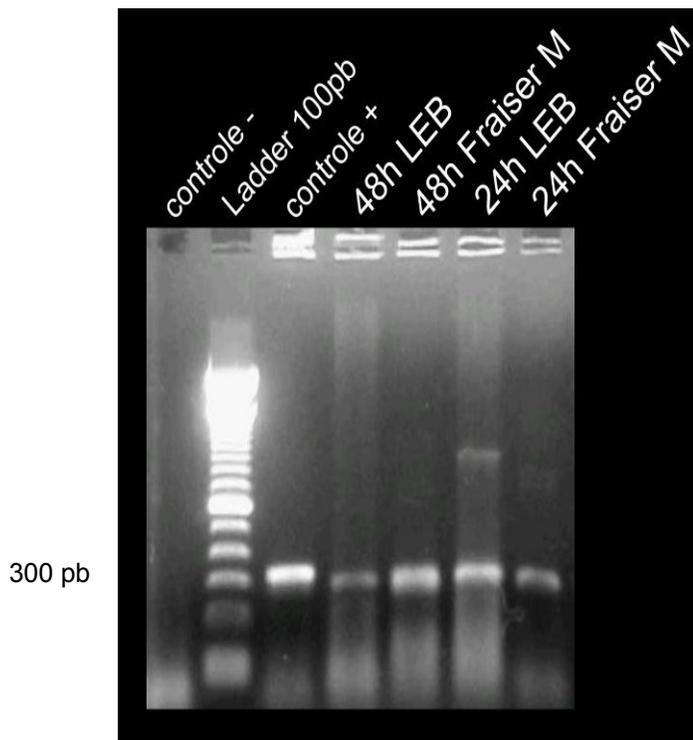
Outra estratégia utilizada para evitar falsos resultados positivos é a introdução de uma etapa de enriquecimento da amostra contaminada, recuperando assim apenas as células viáveis do patógeno. Além disso, esta etapa de enriquecimento parece eliminar os inibidores da PCR. (MANZANO *et al*, 1997a); (NIEDERHAUSER *et al*, 1992); (ROSSEN *et al*, 1991); (INGIANNI *et al*, 2001); (BHADURI; COTTRELL, 2001); (KACLIKOVÁ *et al*, 2002).

Dos quatro caldos de enriquecimentos testados (LEB, TSB-Y, Fraiser e Fraiser Modificado) e duas condições de incubação (24 e 48 horas) após inoculação da cepa 07F7G de *L. monocytogenes*, o meio Fraiser Modificado, com 48 horas de incubação demonstrou ser a melhor condição para cultivo da cepa padrão de *L. monocytogenes* para posterior realização da PCR. A extração de DNA com proteinase K a partir dos caldos de enriquecimento inoculados apresentaram rendimento satisfatório. A utilização dos *primers* 234 e 319 para o gene *hlyA*, e dos *primers* A1 e A2 para o gene *Dth18*, permitiu a amplificação de fragmentos com 417pb e 326pb respectivamente, conforme figuras 24 e 25.



Amplificação do gene *Dth18*. Ladder: marcador de peso molecular de 100pb; TSB-Y: cepa 07F7G cultivada no caldo TSB-Y; LEB: cepa 07F7G cultivada no caldo LEB; Fraiser: cepa 07F7G cultivada no caldo Fraiser.

FIGURA 24 - PCR APÓS ETAPA DE ENRIQUECIMENTO COM AMPLIFICAÇÃO DO GENE *Dth 18* DA CEPA O 7 F7G



Amplificação do gene *Dth18*. Ladder: marcador de peso molecular de 100pb; controle +: DNA da cepa 07F7G de *L. monocytogenes*; 48h LEB: caldo LEB por 48 horas; 48h Fraiser M: caldo Fraiser Modificado por 48 horas; 24h LEB: caldo LEB por 24 horas; 24h Fraiser M: caldo Fraiser modificado por 24 horas.

FIGURA 25 - PCR APÓS ETAPA DE ENRIQUECIMENTO E DOIS PERÍODOS DE INCUBAÇÃO DA CEPA 07F7G

5.2.3 Caracterização Molecular de *L. monocytogenes* nas Amostras Naturalmente Contaminadas

Amostras de queijo contaminadas naturalmente, obtidas durante a etapa da avaliação da qualidade higiênico-sanitária dos queijos comercializados no Estado do Paraná, tiveram seu DNA extraído e analisado por PCR. Os testes realizados com o DNA extraído de células de microrganismos direto do queijo demonstraram a presença de inibidores da PCR inviabilizando a aplicação da técnica a partir do queijo. Para superar a interferência dos inibidores, alguns autores (MANZANO *et al.*, 1997a) fazem um cultivo em caldo de enriquecimento e posterior diluição. A simples diluição do caldo de enriquecimento (Frasier Modificado, 48 horas) considerando as diluições citadas na

literatura não foi suficiente para eliminar os interferentes inviabilizando dessa forma a análise por PCR.

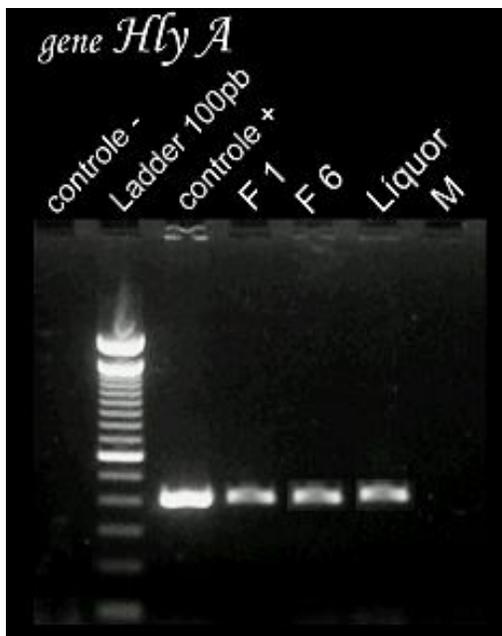
Outros autores descrevem métodos de extração de DNA com alta pureza, utilizando tiocianato de guanidina (PITCHER; SAUNDERS; OWEN, 1989), iodeto de sódio (MAKINO; OKADA; MARUYAMA, 1995), solventes orgânicos (HERMAN; De BLOCK; MOERMANS, 1995), membranas de policarbonato (DUFFY *et al*, 1999), filtros FTA (LAMPEL; ORLANDI; KORNEGAY, 2000), entre outros. Estas técnicas, apesar de eficientes, são trabalhosas, de custo elevado e de difícil adaptação na rotina do laboratório.

Um resultado satisfatório de superação de interferentes foi conseguido através de modificações introduzidas na técnica de extração de DNA pela Proteinase K, envolvendo uma etapa de enriquecimento em caldo Fraiser modificado incubado a 30°C por 48 horas. Após a etapa de enriquecimento, o caldo de cultivo foi centrifugado e lavado com água ultrapura, seguido da extração convencional com Proteinase K. Após a extração, foi introduzida uma etapa de precipitação do DNA com etanol absoluto. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70%, seco, e ressuspenso em água ultrapura o que permitiu a realização da PCR em amostras de queijo naturalmente contaminadas, conforme resultados mostrados nas figuras 26, 27 e 28. A amplificação dos três segmentos gênicos em estudo nas amostras analisadas sugere que a introdução das etapas de lavagem e precipitação do DNA eliminaram os inibidores da PCR presentes nas amostras de queijo.



300 pb (*Dth* 18 – 326 pb)

FIGURA 26 - AMPLIFICAÇÃO DO GENE *Dth*18 DE AMOSTRAS NATURALMENTE CONTAMINADAS
 Ladder: marcador de peso molecular de 100pb; Controle +: DNA da cepa 07F7G de *L. monocytogenes*;
 Líquor: amostra de líquido de paciente com listeriose; F1 e F6: amostras de queijo contaminadas naturalmente com *L. monocytogenes*; M: amostra de queijo sem contaminação – controle negativo.



400 pb (*hlyA* -417 pb)

FIGURA 27 - AMPLIFICAÇÃO DO GENE *hlyA* DE AMOSTRAS NATURALMENTE CONTAMINADAS

Ladder: marcador de peso molecular de 100pb; Controle +: DNA da cepa 07F7G de *L. monocytogenes*;
 F1 e F6: amostras de queijo contaminadas naturalmente com *L. monocytogenes*; Líquor: amostra de líquido de paciente com listeriose; M: amostra de queijo sem contaminação – controle negativo.

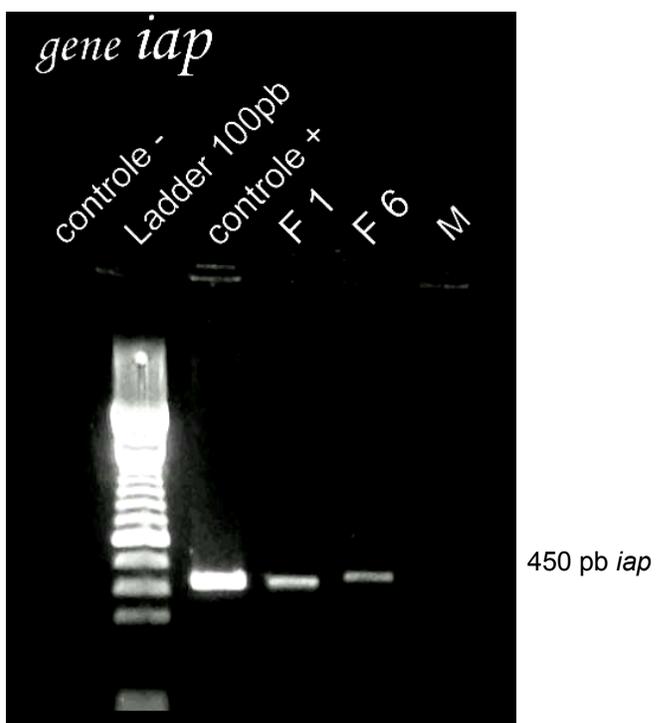


FIGURA 28 - AMPLIFICAÇÃO DO GENE *iap* DE AMOSTRAS NATURALMENTE CONTAMINADAS

Ladder: marcador de peso molecular de 100pb; Controle +: DNA da cepa 07F7G de *L. monocytogenes*; F1 e F6: amostras de queijo contaminadas naturalmente com *L. monocytogenes*; M: amostra de queijo sem contaminação— controle negativo.

6 CONCLUSÕES

Um total de 12% das amostras de queijos estavam contaminadas com *Listeria* spp, sendo 6% com *Listeria monocytogenes* e 6% com *Listeria innocua*.

A análise da distribuição de sorovar mostrou que 100% dos isolados de *Listeria innocua* pertencem ao sorotipo 6a enquanto que, para *Listeria monocytogenes*, o sorovar prevalente foi 1/2a.

Os queijos classificados como muito alta umidade foram os que apresentaram maior contaminação com *Listeria* spp (29,2 %), seguido dos de média umidade (12,2 %), alta umidade (5 %) e baixa umidade (0 %).

A ocorrência de 12% de *Listeria* spp. nos queijos comercializados no Paraná sugere falta de controle deste microrganismo em nível de industrialização, bem como falhas durante o processo de comercialização representando risco à saúde do consumidor.

O método VIP (Ensaio Visual de Imunoprecipitação) mostrou maior sensibilidade e especificidade na detecção de *Listeria* spp, do que o método convencional, sendo, portanto, o método mais viável para a triagem de amostras contaminadas na liberação do produto para comercialização, tendo em vista a rapidez do resultado.

Os queijos artesanais (coloniais) foram os que apresentaram o maior grau de contaminação microbiana, e também os de maior risco para a população por apresentarem amostras contaminadas com *Listeria monocytogenes*, estafilococos coagulase positiva (*S. aureus*) acima da dose produtora de toxinas e infectante bem como a presença de indicadores de contaminação fecal.

Das amostras provenientes de pontos de comercialização em média 33,33% não atendem ao padrão microbiológico estabelecido pela legislação vigente, independente do teor de umidade ou do tipo de queijo.

Os queijos com muito alta umidade apresentaram maior número de amostras com grau de contaminação microbiológica acima dos limites tolerados.

Nos queijos de baixa umidade o parâmetro de maior reprovação das amostras foi contagem de estafilococos coagulase positiva, enquanto que nos de média umidade, alta umidade e muita alta umidade foi o número mais provável de coliformes a 45 °C.

Das amostras de queijos provenientes de surtos envolvidas em DTA 90 % apresentaram contaminação por *Staphylococcus aureus* acima da dose infectante, sendo este o provável agente etiológico causador do evento. Em nem uma destas amostras foi detectada a presença de *Listeria* spp.

A pesquisa de *Listeria monocytogenes* em queijos deve ser efetivada pelos laboratórios de análise desses produtos, tendo em vista que encontrou-se amostras que seriam aprovadas pelos outros parâmetros da legislação se a pesquisa de *Listeria monocytogenes* não fosse realizada.

Dos meios testados, o meio Fraiser modificado com 48h de incubação, apresentou-se como a melhor condição de cultivo para posterior realização da PCR, quando se utilizou cepa padrão.

A modificação do método de extração com proteinase K, com introdução de uma etapa de precipitação do DNA com etanol absoluto e lavagem com etanol a 70 %, secagem, e ressuspensão em água ultrapura, mostrou-se eficiente na superação dos interferentes da reação da PCR, na etapa de enriquecimento na análise de amostras de queijo naturalmente contaminadas.

A amplificação dos Genes *Dth18*, *hlyA* e *iap*, mostrou-se eficiente para a caracterização molecular de *Listeria monocytogenes* nas amostras naturalmente contaminadas, sendo uma alternativa viável de utilização para a pesquisa deste microorganismo pelos laboratórios de controle de qualidade, tendo em vista a rapidez na obtenção do resultado com a identificação de espécie, sendo portanto um método mais específico.

Dos métodos utilizados concluí-se que na otimização da rotina de um laboratório de controle de qualidade cuja pesquisa de *Listeria monocytogenes* seja intensa, uma triagem com o método VIP seguido de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) nas amostras positivas para aquele microorganismo, é uma alternativa viável quando se deseja acelerar a obtenção de resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO, P.R.S. **Ocorrência de *Listeria monocytogenes* e de outros microrganismos em gelados comestíveis fabricados e comercializados na região metropolitana de Curitiba, Paraná.** 106p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- ALBUQUERQUE, L. C; CASTRO, M. C. D. **Queijos Finos: origem e tecnologia.** Epamig: Juiz de Fora, 1995. 199p.
- ALMEIDA, P.F. de; ALMEIDA, R.C.C.; RODRICK, G. E. *Listeria monocytogenes*: importância e distribuição nos alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 64, p. 19-23, set. 1999.
- ALMEIDA, P.F.; ALMEIDA, R.C.C. A PCR protocol using in gene as a target for specific detection of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Oxford, v. 11, p.97–101, 2000.
- AL-SOUD, W. A.; RADSTRÖM, P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.10, p. 3748 – 3753, Oct. 1998.
- AL-SOUD, W. A.; RADSTROM, P. Effects of amplification facilitator on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n.12, p.4463 – 4470, Dec. 2000.
- ANDURAND, M.D.T.B. *Listeria monocytogenes*. Recife: Soc. Pernambucana de Medicina Veterinária, jun. 2003.
- ANUNCIACÃO, L.L.C. *et al.* Production of staphylococcal enterotoxin a in white chesse. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v 25, n.1, p.67-71, 1994.
- ARAGON-ALEGRO, L.C. **Avaliação da viabilidade do emprego dos testes VIA e UNIQUE (TECRA Diagnostics) e VIP (BioControl Systems) para triagem da presença de *Listeria sp.*** Em produtos cárneos. 57f. Dissertação (Mestre em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- ARAÚJO, P.C.C.; FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T. de; PRADOCARVALHO, J.C.A. do. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em produtos de carne de peru comercializados na cidade de Niterói – RJ – Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 30, n. 1, p. 19-25, 2002.
- ARAÚJO, W.N. de; SILVA, M.H.; MARTINEZ, T.C.N.; SILVA, A.V.F.; SILVEIRA, V.F. da; BARROS, S.L.B. Determinação do nível de contaminação por coliformes totais no queijo Minas comercializado na região metropolitana de Salvador – Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 2, p. 5-9, 2000.
- ARAÚJO, W.N. de; SILVA, M.N.; MARTINEZ, T.C.; SILVEIRA, V.F. da; BARROS, S.L.B.; SILVA, A.V.F. Isolamento e identificação de coliformes no queijo Minas comercializado na região metropolitana de Salvador/Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 2, p. 37-42, 2001.
- ARCHER, D. L. *Listeria monocytogenes*. What is its ecological niche? In: MILLER, A.L.; SMITH, J.L.; SOMKUTI, G.A. (Eds.). **Foodborne Listeriosis**. Amsterdam: Elsevier, 1990. p.5-8.
- ARIYAPITIPUN,T.; MUSTAPHA, A.; CLARKE, A. D. Survival of *Listeria monocytogenes* scott A on vaccum packaged beef treated with polylactic acid, lactic acid and nisin. **Journal of Food Protection**,

Ames, v.63, n.1, p.131-136, 2000.

ARUMUGASWAMY, R.K.; ALI, G.R.R.; HAMID, S.N.B.A. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods in Malaysia. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.23, p.117-121, 1994.

ASPERGER, H.; HEISTINGER, H.; WAGNER, M.; LEHNER, A.; BRANDL, E. A contribution of *Listeria* enrichment methodology-growth of *Listeria monocytogenes* under varying conditions concerning enrichment broth composition, cheese matrices and competing microbial flora. **Food Microbiology**, London, v. 16, p. 419-431, 1999.

AURELI, P. ; FIORUCCI, G. C.; CAROLI, D.; MARCHIARO, G.) ; NOVARA, O. ; LEONE L. ; SALMASO S. ; An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, n.17, p. 1236-1241, 2000.

AURELI, P.; FIORUCCI, G. C.; CAROLI, D.; MARCHIARO, G.; NOVARA, O.; AUTIO, T. *et al.* Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v.65, n. 1, p. 150-155, Jan., 1999.

AZADIAN, B. S.; FINNERTY, G. T.; PEARSON, A. D. Cheese-borne *Listeria meningitis* in immunocompetent patient. **Lancet**, Boston, v.1, n.8633, p.322-323, 1989.

BADINI, K. B. *et al.* Hábitos dos consumidores de leite cru, produzido e comercializado clandestinamente nos municípios de Botucatu/SP e de Manuel/SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n.51, p.15-17, set.-out., 1997.

BAHK, J.; MARTH, E.H. Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. In: CLIVER, D.O. (Ed.). **Foodborne diseases**. San Diego: Academic Press, 1990. Cap. 18, p. 247-57.

BAILEY, J.S.; FLETCHER, D.L.; COX, N.A. Recovery and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* from broiler chickens in the southeastern United States. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 52, p. 148-150, 1989.

BAIRD-PARKER, A. C. Foods and microbiological risks. **Microbiology**, v.140, n.4, p.687-695, 1994.

BANNISTER, B. A. *Listeria monocytogenes* meningitis associated with eating soft cheese. **Journal of Infection**, London, v.15, p.165-168, 1987.

BANSAL, N.S. Development of a polymerase chain reaction assay for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.22, p. 353-6, 1996.

BARAKAT, R. K.; HARRIS, L.J. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* on cooked modified –atmosphere – packaged poultry in the presence and absence of a naturally occurring microbiota. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v.65, n.1, p.342-345, Jan., 1999.

BARBUTI, S.; MERCADANTI, I.; MUTTI, P.; QUINTAVALLA, S. Determinazione rápida di *Listeria monocytogenes* in prodotti carnei: valutazione del método Gene-track . **Ind. Cons.**, v.75, p.3-11, 2000.

BARNES, R.; ARCHER, P.; STRACK, J. *et al.* Listeriosis associate with consumption of turkey franks. **Morbidity and Mortality Weekly Rep.**, v. 38, p.267 -268, 1989.

BASSLER, H.A. ; FLODD, S.J.A. ; LIVAK, K.J. ; MARMARO, J. ; KNORR, R.; BATT, C.A. Use of a fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v. 61, p.3724- 3728, 1995.

BAYLEY, J. S.; FLETCHER, D.L.; COX, N. A. Effect of enrichment of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.6, p.505-507, June, 1990a.

BAYLEY, J. S.; FLETCHER, D.L.; COX, N. A. Efficacy of enrichment media for recovery of heat-injured

- Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 53, n.6, p.473-477, June 1990b.
- BEAN, N. ; GRIFFIN, P.N. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1983: Patogens vehicles and trends. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 53, n.9, p. 804-807, 1990.
- BECKERS, H. J. Incidence of foodborne diseases in Netherlands: annual summary, 1982 and an overview from 1979 to 1982. **Journal of Food Protection**, Ames, v.51, p.327-333, 1988.
- BECKERS, H.J.; SOENTORO, P.S.S.; DELGOU-VAN ASCH, E.H.M. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses and raw milk and its resistance to heat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 4, n. 3, p. 249-256, 1987.
- 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.
- BENDIG, J.W.A.; STRANGWAYS, J.E.M. *Listeria* in hospital lettuce. **Lancet**, London, v.1, p. 616-617, 1989.
- BENEDICT, R. C. *Listeria monocytogenes*: physiology and metabolism. In: MILLER, A.J.; SMITH, J.L.; SOMKUTI, G.A. (Ed). **Foodborne Listeriosis**. 1990. p.13-24.
- BENNETT, R.W.; WEAVER, R.E. Serodiagnosis of *Listeria monocytogenes* In: FDA Bacteriological Analytical Manual 8th Edition, 1995.
- BERRY, E. D.; LIEWEN, M.B.; MANDIGO, R.W. *et al.* Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Peciococcus* during the manufacture of fermented semidry sausage. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 53, p.194-197, 1990.
- BERSOT, L. S. **Frequência de *Listeria monocytogenes* em mortadelas e comportamento durante o processamento industrial e estocagem**. 67p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- BERSOT, L.S.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T. Production of mortadella: behavior of *Listeria monocytogenes* during processing and storage conditions. **Meat. Science**, United Kingdom, v.57, p. 13-17, 2001.
- BERSOT, L. S.; GILLIO, C.; TAVOLARO, P.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T. Behaviour of *L. monocytogenes* in sliced, vacuum-packed mortadella. **Brazilian Journal of Microbiology**. [online]., v. 39, n. 3, p. 514-516, 2008.
- BESSE, N.G.; LAFARGE, V. Development of a membrane filtration method for enumeration of from soft cheese. **Food Microbiology**, London, v. 18, p. 669-676, 2001.
- BESSE, M.T.; LUO, Q.; ROTBART, H.A. ; BLASSER, M.J. ; ELLISON III, T.T. Detection of *Listeria monocytogenes* by using the polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p. 2930 – 2932, 1990.
- BESSE, M. T. Detection of *Listeria monocytogenes* by using the polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, n. 9, p.2930-2932, Sept. 1990.
- BEUCHAT, L.R.; BRACKETT, R.E. Inhibitory effects of raw carrots on *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 1734-1742, 1990.
- BEUMER, R R; GIFFEL, M. C. te; COX, L. J. Optimization of haemolysis in enhanced haemolysis agar (EHA) - a selective medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. **Letter in Applied Microbiology**, Oxford , n. 24, p. 421-425, 1997.
- BEUMER, R. R.; GIFFEL, M.C.; KOK, M.T.C., *et al.* Confirmation and identification of *Listeria spp.*

Letters in Applied Microbiology, Oxford, v.22, p.448-452, 1996.

BEUMER, R.R.; BRINKMAN, E.; ROMBOUTS, F.M. Enzyme-linked immunoassays for the detection of *Salmonella* spp.: a comparison with other methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.112, p.363-374, 1991.

BEUMER, R.R.; GIFFEL, M.C.; ANTHONIE, S.V.R.; COX, L. J. The effect of acriflavine and nalidixic acid on the growth of *Listeria* spp. in enrichment media. **Food Microbiology**, London, v.13, p. 137-148, 1996.

BHADURI, S.; COTTRELL, B. Sample preparation methods for PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocitogenes* on beef chuck shoulder using a single enrichment medium. **Molecular and Cellular Probes**, Loughborough, v.115, p. 267-274, 2001.

BIER, O. **Microbiologia e imunologia**. 24. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1994.

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, 1990. cap.12, p.71-74.

BILLE, J.; CATIMEL, B.; BANNERMAN, E. JACQUET, C.; Yersin, M.N.; Caniaux, I.; Monget, D.; Rocourt, J.. Api Listeria: a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.6, p.1857-1860, 1992.

BILLE, J.; GLAUSER, M.P. Listeriose: situation in der Schweiz (Listeriose in Switzerland). **Bulletin de l'Office Federal de la Santé Publique**, n. 3, p. 28-29, 1988.

BILLE, J.; ROCOURT, J.; SWAMINATHAN, B. *Listeria, Erysipelthix and Kurthia*. In: MANUAL of clinical microbiology. 7thed. Washington : American Society for Microbiology, 1999.

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, 2005. **Euro Surveill**, v. 11, n.6, p. 91-3, 2006.

BOGGS, J. D., WHITWAM, R. E. ; HALE, L. M. ; BRISCOE, R. P. ; KAHN, S. E. ; MACCORMACK, J. N.; MAILLARD, J. M. ; GRAYSON, S. C.; SIGMON, K. S.; REARDON, J.W.; SAAH, J. R. Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese – North Caroline, October 2000 – January 2001. **Morbidity Morbidity Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.50, p.560-562, 2001

BOHNE, J.; SOKOLOVIC, Z.; GOEBEL, W. Transcriptional regulation of *prfA* and PrfA-regulated virulence genes in *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 6, p. 1141-1150, 1994.

BOLLELA, V. R. *et al.* Problemas na padronização da reação em cadeia da polymerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.33, n.3, p.281-286, jun., 1999.

BORGES. M. F. *et al.* Occurrence of *Listeria monocytogenes* in salami. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.30, p. 362-4, 1999.

BOURGEDIS, J. F. **Microbiologia alimentar**. Zaragoza: Acribia, 1994. v. 1.

BOWMER, E.J.; MCKIEL, J. A.; COCKCROFT, W.H.; SCHMITT, N.; RAPPAY, D. E. *Listeria monocytogenes* infections in Canada. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v. 109, p. 125-135, 1973.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07/03/96.

Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regulamentação da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal.** Brasília, 1980. 166 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação Geral de Vigilância epidemiológica. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica, Alimentar e Sexual. **Manual Integrado de Prevenção e Controle de Doenças transmitidas por Alimentos.** Brasília, 2003. 123p.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. **Programa nacional de monitoramento da qualidade de produtos dispensados de registro.** Brasília, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico de princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 jan. 2001. Seção 1.

BREER, C.; CHOPFER, K. *Listeria* and food. **Lancet**, Boston, n.2, p.1022, 1988.

BREHM, K.; RIPIO, M T.; KREFT, J.; VÁZQUEZ-BOLAND, 1. A The *bvr* locus of *Listeria monocytogenes* mediates virulence gene repression by β -glucosides. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 16, p. 5024-5032, 1999.

BSAT, N. ; BATT, C.A. A combined modified reverse dot-blot and nested PCR assay for the specific non-radioactive detection of *Listeria monocytogenes*. **Molecular and Cellular Probes**, Loughborough, v.7, p.199-207, 1993.

BUBERT, A. *et al.* Detection and differentiation of *Listeria spp.* by a single reaction based on Multiplex PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v.65, n.10, p. 4688 -4692, Oct. 1999.

BUBERT, A. ; HEIN, I. ; RAUCH, M. ; LEHER, A. ; YOON, B.; GOEBEL, W; WAGNER, M. Detection and differentiation of *Listeria spp.* By a single reaction based on multiplex PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v. 65, p.4688-4692, 1999.

BUCHANAN, R. L.; DAMERT, W.G.; WHITING, R.C.; VAN SCHOTHORST, M. Use of epidemiologic and food survey data to estimate a purposefully conservative dose-response relationship for *Listeria monocytogenes* levels and incidence of listeriosis. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 60, n.8, p.918-922, 1997.

BUCHANAN, R. L.; PHILLIPS, J. G. Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 53, p. 370-376, 1990.

BUCHANAN, R. L.; STAHL, H.G.; ARCHER, D.L. Improved plating media for simplified, quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in foods. **Food Microbiology**, London, v.4, n.4, p.269-275, July, 1987.

BUCHANAN, R. L.; STAHL, H.G.; ARCHER, D.L. *Listeria* methods development research at the Eastern Regional Research Centre. U.S. Department of Agriculture. **Journal of Association Analytical Chemists**, v.71, p.651-654, 1988.

BUCHANAN, R.L.; DAMBERT, W.G.; WHITING, R.C.; SCHOTHORS, M.van. Use of epidemiologic and food survey data to estimate a purposefully conservative dose-response relationship for *Listeria monocytogenes* levels and incidence of Listeriosis. **Journal of Food Protection**, Ames,v. 60, n. 8, p. 918-922, 1997.

- BUCHANAN, R.L.; KLAWITTER, L.A. Effects of temperature and oxygen on the growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4.5. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 6, p. 1754-1756, 1990.
- BÜLA, C.J.; BILLE, J.; GLAUSER, M.P. An epidemic of food-borne Listeriosis in western Switzerland: description of 57 cases involving adults. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 20, n.1, p. 66-72, 1995.
- BUYSER, M.L, DUFOUR, B. ;MAIRE, M ; LAFARGE , V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. **International Journal of Food Microbiology**, v.67, n. 1-2, p.1-17, 2001.
- CABANES, D.; DEHOUX, P.; DUSSURGET, O.; FRAGEU, L.; COSSART, P. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. **Trends in Microbiology**, v.10, n.5, p.238-245, 2002.
- CAIRD, L. Listeriosis in pregnancy. **Lancet**, London, v. 1, p. 322, 1989.
- CÂMARA, S.A.V. **Surtos de toxinfecções alimentares no estado de Mato Grosso do Sul, no Período de 1998-001**. 79f. Monografia (Especialização em Gestão em Saúde) – Escola de Saúde Pública “Dr. Jorge David Nasser”, Campo Grande, 2002.
- CAMARGO, N.J. Cuidados dos alimentos: um desafio transnacional. **O Estado do Paraná**, Jornal Agrícola, p.3, 17 out. 1999.
- CAMARGO, N.J.; SOUZA, I. L.; PUZYNA, I. P. *et al.* Surtos de 1978 a 1995. Curitiba: Secretaria de Estado da Saúde , Centro de Saneamento e Vigilância Sanitária, 1996. (Mimeo).
- CAMP reaction between *Listeria monocytogenes* and *Rhodococcus equi*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 46, n. 7, p. 832-834, 1996.
- CANDRIAN, U. Polymerase chain reaction in food microbiology. **Journal of Microbiological Methods**, v.23, n.1, p.89-103,1995.
- CANTONI, C.; BALZARETTI, C.; VALENTI, M. Episodio di Listeriosi da consumo di insaccato a case of *Listeria monocytogenes* human infection associated with consumption of “testa in cascetta” (cooked meat porkproduct). **Archivio Veterinario Italiano**, Milano, v. 40, n. 2, p. 141-142, 1989.
- CANTONI, C.; COMI, G.; VALENTI, M. *Listeria* in formaggi e in salumi. . **Industrie Alimentari**, Pinerolo , v.27, n.264, p.859-861, 1988b.
- CANTONI, C.; COMI, G.; VALENTI, M. Attualità su *Listeria monocytogenes* nei formaggi. **Industrie Alimentari**, Pinerolo, v. 27, n.258, p.266-268, 1988a.
- CANTONI, C.; VALENTI, M.; COMI, G. *Listeria* in formaggi in salumi. **Industrie Alimentari**, Pinerolo, v. 27, n. 264, p. 859-61, 1988. Apud **Dairy Science Abstracts**, Wallingford, v.51, n.3, p.123, Mar. 1988. (Resumo).
- CARMEN. Tudo sobre Queijos. Disponível em <http://www.bycarmen.com.br/tudosobrequeijos.htm>>. Acesso em: Janeiro, 2005.
- CARMINATI, D.; PERRONE, A.; GIRAFFA, G.; NEVIANI, E.; MUCHETTI, G. Characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from gorgonzola cheese rinds. **Food Microbiology**, London, v. 21, p. 801-807, 2004.
- CARNIO, M.C.; EPPERT, I.; SCHERER, S. Analysis of the bacterial surface ripening flora of German and French smeared cheeses with respect to their anti-listerial potential. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 47, p. 89-97, 1999.
- CARRIQUE-MAS, J. J.; HÖKEBERG, I.; ANDERSSON, Y.; ARNEBORN, M.,CARVALHO, J. D. G.;

VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. V. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, Oxford, v.1, p. 262-267, 2007.

CARRIQUE-MAS, JJ; HOKEBERG, I; ANDERSSON, Y; ARNEBORN, M.; THAM, W; DANIELSSON-THAM, ML; 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

CASAROTTI, V. **Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em leite cru pasteurizado tipo C e queijo minas frescal comercializados em Piracicaba.** 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

CASAROTTI, V.; GALLO, C.; CAMARGO, R. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo minas frescal comercializados em Piracicaba – SP. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 44, n. 3, p. 158-163, 1994.

CASSIDAY, P. K.; BRACKETT, R.E. Methods and media to isolate and enumerate *Listeria monocytogenes*: a review. **Journal of Food Protection**, Ames, v.52, n.3, p.207-214, 1989.

CATÃO, R.M.R.; CEVALLOS, B.S.O. de. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E.coli* no leite cru pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas v. 21, n. 3, Sept./Dec. 2001. (SciELO Brazil).

CATÃO, R.M.R.; VIGOLVINO, W.A.; ANDRADE, W.T.; HOFER, E. Meningite por *Listeria monocytogenes* em Campina Grande – Paraíba, Brasil: relato de um caso. **RBAC**, v. 35, n. 2, p. 81-81, 2003.

CAVALHERI, N.A. **Avaliação dos métodos Colilert®, Fluorocult® e Petrifilm™ na determinação de *Escherichia coli* em leite pasteurizado.** 51 p. . Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1998.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Updat:** Multistate outbreak of listeriosis, 1999. Georgia [Online]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/od/oc/media/pressrel/r990114.htm>. Acesso em ;17Mar.1999.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Preventing foodborne illness:** Listeriosis. Georgia [Online]. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/publications/brochures/lister.htm>>. Acesso em: 16 Dec. 1998.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Updat:** multistate outbreak of listeriosis. 1999. Georgia [Online]. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/od/oc/media/pressrel/r990114.htm>>. Acesso em: 17 Mar. 1999.

CENTER FOR DISEASE CONTROL(CDC) Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese – United states. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5026a3.htm> [2001. July 6]

CERF, O. Risques bactériens liés aux produits laitiers. **Revue Française des Laboratoires**, n. 348, p. 67-69, Dec. 2002.

CÉU AZUL. Disponível em <<http://www.ceuazul.ind.br/IMAGENS/laticinios1.jpg>>. Acesso em: Janeiro, 2005.

CHEROUTRE-VIALETTE, M.; LEBERT, I.; HEBRAUD, M.; LABADIE, J.C.; LEBERT, A. Effects of pH or aw stress on growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam v. 42, p.71-77, 1998.

CHRISTENSEN, D.P. *et al.* Mutational analysis of the role of HPr in *Listeria monocytogenes*. **Applied**

and Environmental Microbiology, Washington, v.65, n.5, p.2112-2115, May, 1999.

CIENTISTAS desvendam mistério da infecção com *Listeria*. Disponível em: <<http://www.uol.com.br>>. Acesso em: 2003.

CLARK, A G.; MCLAUCHLIN, I. Simple color tests based on an a1anyl peptidase reaction which differentiate *Listeria monocytogenes* from other *Listeria* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 8, p. 2155-2156, 1997.

CLARK, E. E. *et al.* Absence of serotype: specific surface antigen and altered teichoic acid glycosylation among epidemic-associated strains of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 10, p. 3856 – 3859, Oct., 2000.

COFFEY, A; ROMBOUTS, F. M.; ABEE, T. Influence of environmental parameters on phosphatidylcholine phospholipase C production in *Listeria monocytogenes*: a convenient method to differentiate *L. monocytogenes* from other *Listeria* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v. 62, n. 4, p. 1252-1256, 1996.

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

COLE, M.B.; JONES, M.V.; HOLYOAK, C. The effect of pH, salt concentration and temperatura on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**. v.69, p.63-72, 1990.

COLEMAN, N.W. Controlling *Listeria histeria* in your plant. **Dairy and Food Sanitation**, Ames, v.6, n.112, p. 555-7, Dec. 1986.

COMI, G.; CANTÓN, C. Alcuni aspetti della presenza di *Listeria monocytogenes* nei formaggi. **Industrie Alimentari**, Pinerolo, v.27, n.257, p.104-106, 1988.

COMI, G.; CANTÓN, C.; DçALBERT, S. Indagine sua presenza di *Listeria monocytogenes* nei formaggi. . **Industrie Alimentari**, Pinerolo, v. 26, n.247, p. 216-218, 1987.

COMI, G.; CANTÓN, C.; DçAUBERT, S. Indagine sulla presenza di *Listeria monocytogenes* nei formaggi. **Industrie Alimentari**, Pinerolo, v.26, n.247, p.216-8, 1987. Apud **Dairy Science Abstracts**, Wallingford, v.50, n.3, p.125, Mar. 1988. (Resumo).

CONNER, D.E.; BRACKETT, R.E.; BEUCHAT, L.R. Effect of temperature, sodium chloride, and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. **Applied Environmental Microbiology**, v.52, p.59-63, 1986.

CONTE, M. P.; PETRONE, G.; DI BIASE, A. M.; AMMENDOLIA, M. G.; SUPERTI, F.; SEGANTI, L. Acid tolerance in *Listeria monocytogenes* influences invasiveness of enterocyte-like cells and macrophage-like cells. **Microb. Pathog.**, n. 29, p. 137-144, 2000.

COORAY, K.J. ; NISHIBORI, T. ; XIONG,H.; MATSUYAMA, T.; FUJITA,M. ; MITSUYAMA, M. Detection of multiple virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes* by PCR in artificially contaminated milk samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v.60, p.3023-3026, 1994.

COPEs, J.; PELLICER, K.; ECHEVERRIA, H.G.; STANCHI, N.O.; MARTINEZ, C.; LEARDINI, N. Investigación de *Listeria monocytogenes* en quesos de pasta blanda. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 32, Enero/Marzo, 2000.

CORBY, J.; CARLONI, E.; HOLCOMB, M.; KONDRACKI, S.; WORON, R.;CORDANO, A.M.; ROCOURT, J. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 70, p. 175-178, 2001.

COSSART, P. Molecular and cellular basis of the infecrion by *Listeria monocytogenes*: an overview. .

International Journal of Food Microbiology. Jena, DE, v. 291, p. 401- 409, 2002.

COX, L. J.; SIEBENGA, A.; PEDRAZZINI, C. ; MORETON, J. Enhanced haemolysis agar (EHA) – an improved selective and differential medium for isolation of *L. monocytogenes*. **Food Microbiology**, London, n. 8, p. 37-49, 1991.

CRUZ, C.D.; SILVESTRE, F.A.; KINOSHITA, E.M.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T. Epidemiological Survey of *Listeria monocytogenes* in a gravlax salmon processing line. **Brazilian Journal of Microbiology** [online]., v. 39, n. 2, p. 375-383, 2008.

CURIALE, M.S. *et al.* Deoxyribonucleic acid hybridization method for the detection of *Listeria* in dairy products, seafoods, and meats: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.77, n.3, p.602–617, 1994.

CURIALE, M.S.; LEWUS, C. Detection of *Listeria monocytogenes* in samples containing *Listeria innocua*. **Journal of Food Protection**, Ames, v.57, p.1048-51,1994.

CURTIS, G.D.W.; MITCHELL, R.G.; KING, A.F.; GRIFFIN, E.J. A selective differential model for the isolation of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.8, n.3, p. 95-98, Mar. 1989.

CZAJKA, J.; BATT, C.A. Verification of causal relationships between *Listeria monocytogenes* isolates implicated in food-borne outbreaks of Listeriosis by randomly amplified polymorphic DNA patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 5, p.1280–1287, 1994.

DALLAS, H.L.; THOMAS, D.P.; HITCHINS, A.D. Virulence of *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, and *Listeria innocua* assayed with in vitro murine macrophagocytosis. **Journal of Food Protection**, Ames., v. 59, n. 1, p. 24-27, 1995.

DALTON, C. B.; AUSTIN, C. C.; SOBEL, J.; HAYES. P. S.; BIBB, W. F.. Na outbreak of meningitis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. **The New England Journal of Medicine**, Boston v. 336, n. 2, p. 100-105, Jan. 1997a.

DALTON, G.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.

DATTA, A. R. *et al.* Synthetic oligodeoxyribonucleotide probes for detection of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n.12, p. 2933 –2937, Dec., 1988.

DATTA, A.R.; WENTZ, B. A; RUSSELL, J. Cloning of the listeriolysin O gene and development of specific gene probes for *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.3874-3877, 1990.

DAVIES, L.W.; EWAN, E.P.; VARUGHESE, P.; ACRES, S.E. *Listeria monocytogenes* infections in Canada. **Clinical Invest. Medical**, v. 7, n.4, p.315-320, 1984.

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

DENDER, A. G. F. *Listeria monocytogenes*: um produto de leite e produtos lácteos. **Inf. Agropecuário**, Belo Horizonte, v.13, n. 155, p. 19-23, 1995.

DESEO, J. *Listeria monocytogenes* in processed meats. **AOAC Int.**, Arlington, v.3, n.4, p.23-24, 1999.

DESTRO, M. T.; LEITÃO, M.F.F.; FARBER, J. M. Use of molecular typing methods to trace the

dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.2, p.705-711, 1996.

DESTRO, M. T.; SERRANO, A. M.; KABUKI, D.Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, Oxford,, v.2, n.2, p.110-2, 1991.

DESTRO, M.T. **Isolamento de *Listeria sp* e estudo de sua ocorrência em carne, leite e derivados**. 73 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990.

DESTRO, M.T.; SERRANO, A.M.; KABUKI, D.Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, Oxford, v. 2, p. 110-112, Apr. 1991.

DIAZ, R.; GUEVAR, L.M.; ROJAS, B. Inciência de *Listeria* spp. En ensaladas de vegetales con mínimo procesamiento empacadas em bolsas de polipropileno. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS, 5, Águas de Lindóia, 1998. **Livro de Resumos**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1998. r.P.Q.1.3.,p.99.

DiMAIO, H. *Listeria* infection in women. **Primary Care Update for OB/GYNS**, v. 7, n. 1, p. 40-45, 2000.

DOMINGUEZ, L.; FERNANDEZ, J.F.; BRIONES, V.; BLANCO, J. L.; SUAREZ, G. assessment of different selective agar media for enumeration and isolation of *Listeria* from dairy products. **Journal of Dairy Researches**, v.55, p.579-583, 1988.

DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, L.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.F.; VASQUEZ-ROLAND, J. A.; RODRIGUEZ-FERRI, E.; SUAREZ-FERNANDEZ, G. Isolation de micro-organismes du genre *Listeria* à partir de la lait cru destine à la consommation humaine. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.31, n.10, p. 938-41, Oct. 1985.

DONINI, C.A. Contribuição ao estudo epidemiológico da listeriose como zoonose de causa alimentar. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n.48, p.54-55, mar./abr., 1997.

DONNELLY, C. W. Detection and isolation of *Listeria monocytogenes* from food samples: implications of sublethal injury. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 85, p.495-500, 2002.

DONNELLY, C. W. *Listeria monocytogenes*. In: HUI, Y.H.; GORHAM, J.R.; MURREL, K.D.; OLIVER, D.O. (Eds.). **Foodborne disease handbook**. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 215-252.

DONNELLY, C. W. *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. **Nutrition Reviews**, v. 59, p. 183-194, 2001.

DONNELLY, C. W.; BRACKETT, R. E.; DOORES, S.; LEE, W. H.; LOVETT, J. *Listeria*. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. (Eds.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3rded. Washington: American Public Health Association, 1992. Cap. 38, p. 637-663.

DONNELLY, C.W. Historical perspectives on methodology to detect *Listeria monocytogenes*. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v.71, n.3, p.644-6, 1988.

DONNELLY, C.W.; BAIGENT, G.J. Method for flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.52, n.4, p.689-95, Oct. 1986.

DONNELLY, C. W., BRIGGS, E. H.; DONNELLY, L.S. Comparison of heat resistance of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, p. 1433-1438, 1987.

DOYLE, M. E. Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes*. **FRI Briefings**, University of

Wisconsin-Madison, Food Research Institute, Madison, WI, Out. 2001.13 p.

DOYLE, M. P.; MESKE, L. M.; MARTH, E. H. Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and storage of non fat dry milk. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 48, n.9, p740-742, 1985.

DOYLE, M. P.; SCHOENI, J.L. Selective-enrichment procedure for isolating *Listeria monocytogenes* from fecal and biologic specimens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.51, p.1127-1129, 1986.

DOYLE, M.P. Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, Chicago, v. 42, p.169-171, 1988.

DOYLE, M.P.; SCHOENI, J.L. Comparison of produces for isolating *Listeria monocytogenes* in soft, surfaceripened cheese. **Journal of Food Protection**, Ames, v.50, n.1, p. 4-6, Jan, 1987.

DUFFY, G. *et al.* The development of a combined surface adhesion and polymerase chain reaction technique in the rapid detection of *Listeria monocytogenes* in meat and poultry., **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 49, p. 151-9, 1999.

DUGGAN, J.; PHILLIPS, C.A. *Listeria* in the domestic environment. **Nutrition Food Science**, London, v.213, n. 2, p.73-79, March/April, 1998.

DUH, Y.H.; SCHAFFNER, D.W. Modelling the effect of temperature on the growth rate and lag time of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 56, p. 205-210, 1993.

DUMÍNGUEZ, L. Taxonomic note: a proposal for reviewing the interpretation of the transduction during *Listeria monocytogenes* infection. **Arch. Bioc. Biop.**, v. 372, n. 1, p.166-172, 1999.

DUVALL, R.; HITCHINS, A. Pooling of noncollaborative multilaboratory data for evaluation of the use of DNA probe test kits in identifying *Listeria monocytogenes* strains. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 60, n. 8, p. 995-997, 1997.

EL MARRAKCHI, A.; HAMANA, A.; EL OTHMANI, F. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products produced or imported into Marocco. **Journal of Food Protection**, Ames, v.55, n.4, p.241-5, Apr. 1992.

ELEFTHERIADOU, M.; VARNAVA-TELLO, A.; METTA-LOIZIDOU, M.; NIKOLAOU, A.S.; AKKELIDOU, D. The microbiological profile of foods in the Republic of Cyprus: 1991-2000. **Food Microbiology**, London, v. 19, p. 463-471, 2002.

ERDENLIG, S. *et al.* Production of monoclonal antibodies to *Listeria monocytogenes* and their application to determine the virulence of isolates from channel catfish. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 7, p.2827 – 2832, July, 1999.

ERMOLAEV A , S.; BEL YI, Y.; TARTAKOVSKII, I. Characteristics of induction of virulence factor expression by activated charcoal in *Listeria monocytogenes*. **FEMS Microbiol Lett.**, n. 174, p. 137-141, 1999.

ERMOLAEVA, S.; VARFOLOMEEV A, N.; BELYI, Y.; TARTAKOVSKII, I Isolation and characterization of a *Listeria monocytogenes* mutant strain hyperproducing virulence factors. **FEMS Microbiol Lett.**, n. 150, p. 189-195, 1997.

ESPER, L.M.R. **Diagnóstico da qualidade de ricotas comercializadas no município de Campinas – S.P. 97p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.**

ESPER, M.R.N.R. *et al.* Meningite por *Listeria monocytogenes* em São Paulo, Brasil. **Revista do**

Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, v. 38, n.1, p.37-41, 1978.

EUTHIER, S.M.F.; TRIGUEIRO, I.N.S.; RIVERA, F. Condições higiênico-sanitárias do queijo de leite de caba "tipo coalho", artesanal elaborado no curimataú paraibano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas v. 18, maio/jul. 1998. (SciELO Brazil).

FACINELLI, B.; VARALDO, P.E.; TONI, M.; CASOLARI, C.; FABIO, U. Ignorance about *Listeria*. **British Medical Journal**, Edinburgh, v. 299, p.738, 1989.

FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA. Departamento de Epidemiologia. Universidade de São Paulo. **Surto de Listeriose em Hospital infantil da Costa Rica**. São Paulo, 1999. 20 p. (Série Vigilância em Saúde Pública).

FALEIRO, M.L.; ANDREW, P.W.; POWER, D. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 84, p. 207-216, 2004.

FARBER, J. M.; CARTER, M. D.; VARUGHESE, P. V.; ASHTON, F. E.; EWAN, E. P. Listeriosis traced to the consumption of alfafa tablets and soft cheese. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v.322, n.5, p.338, Feb., 1990.

FARBER, J. M.; DELAY, E. M.; MACKIE, M. T.; LIMERICK, B. A small outbreak of listeriosis potentially linked to the consumption of imitation crab meat. **Letter in applied Microbiology**, Oxford, v.31, n.2, p.100-104, Aug., 2000.

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

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*. In: LUND, B. N.; BAIRD-PARKER, T. C.; GRAHAME, W. G. **The microbiological safety and quality of food**. Gaithersburg: Aspen Publishers, v III, Cap. 44, p.1178- 1232, 2000.

FARBER, J.M. Current research on *Listeria monocytogenes* in foods: an overview. **J. Food Prot.**, Ames, v.56, n.7, p.640-643, 1993.

FARBER, J.M. *Listeria monocytogenes*. **Journal Associations of Official Analytical Chemists**, Arlington, v.74, n.4, p.701-704, 1991.

FARBER, J.M.; COATES, F.; DALEY, E. Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.15, n.3, p.103-105, Sept., 1992.

FARBER, J.M.; DALEY, E. Presence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally-contaminated meats. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.22, n.1, p.33-42, 1994.

FARBER, J.M.; HARWIG, J. The Canadian portion on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. **Food Control**, Oxford,, v. 7,n.4/5, p.253-258, 1996.

FARBER, J.M.; JOHNSTON, M.A.; PURVIS, U.; LOIT, A. Surveillance of soft and semi-soft cheeses for the presence of *Listeria* spp. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 157-163, 1983.

FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*. In: LUND, B.M.; BAIRD-PARKER, A.C.; GOULD, G.W. (Eds.). **The microbiological safety and quality of food**. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers, p. 1178-1232. 2000.

FARBER, J.M.; ROSS, W.H., HARWIG, J. Health risk assessment of *Listeria monocytogenes* in Canada. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 30, p. 145-156, 1996.

FARBER, J.M.; SANDERS, G. W.; DUNFIELD, S.; PRESCOTT, R. The effect of various acidulants on

the growth of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 9, p. 181-183, 1989a.

FARBER, J.M.; SANDERS, G.W.; JOHNSTON, M.A. A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. **Journal of Food Protection**, Ames, v.52, n. 7, p.456-458, July 1989b.

FARBER, J.M.; SANDERS, G.W.; MALCOLM, S.A. The presence of *Listeria spp* in raw milk in Ontario. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.34, n.2, p. 95-100, Feb. 1988.

FARBER, J.M.; SANDERS, G.W.; SPEIRS, J.I. et al. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in inoculated and naturally contaminated raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.7, n.4, p.277-286, 1988.

FDA. Food and Drug Administration. **Bacteriological analytical manual**. 8thed. Gaithersburg, 1995.

FDA. Triunfo Import FOOD corp. RECALLS queijo tipo Mineiro cheese – United States. Disponível em ; <http://fda.gov/oc/oc/firmrecalls/triunfo10.03.html> [2003, October 29].

FEITOSA, T.; BORGES, M.F.; NASSU, R.T.; AZEVEDO, E.H.F.; MUNIZ, C.R. Salmonella spp., Listeria so. And hygienic sanitary indicator microorganisms in cheeses from Rio Grande do Norte State. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, supl., p. 162-165, 2003. (SciELO Brazil).

FENLON, D.R.; WILSON, J. The incidence of *Listeria monocytogenes* in raw milk from farm bulk tanks in north east Scotland. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.66, n.3, p.191-196, Mar., 1989.

FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.; GENIGEORGES, C. Quantitative evaluation of three selective enrichment broth and agars used in recovering *Listeria* microorganisms. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.2, p.105-110, Feb., 1990.

FITTER, S.; HEUZENROEDER; THOMAS, C.J. A combined PCR and selective enrichment method for rapid detection of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 34, p.53 –59, 1992.

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

FLORENTINO, E.R.; MARTINS, R.S. Características microbiológicas do “queijo de coalho” produzido no Estado da Paraíba. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n.59, p.43-48, jan.-fev., 1999.

FLORIDA Studies show USDA. Listeria method superior to FDA method. **Food Chem. News**, v. 12, n.4, 1987.

FLUIT, A. C. *et al.* Detection of *Listeria monocytogenes* in cheese with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, n.5, p.1289-1293, May, 1993.

FLUIT, A. C. *et al.* Detection of *Listeria monocytogenes* in cheese with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, n.5, p.1289-1293, May 1993.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Report of the FAO expert consultation on the trade impact of Listeria in fish products**. Rome: FAO, 1999. 34 p. (FAO Fisheries Report, n. 604).

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual**. 6 ed. Washington, 1984. (Supl. 9, 1987).

FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. **Pathogens reduction and HACCP system and beyond**, 1998. [Online]. Disponível em: <<http://www.usda.gov/agency/fsis/bkbeyond.htm>>. 12 Jun. 1998.

FOODBORNE listeriosis in Switzerland. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 51, p. 425, 1988.

FRANCO, B. D. G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. 196p.

FRANCO, B.D.G.M. Métodos rápidos e automação em microbiologia de alimentos. [Florianópolis: s.n.], 2006.

FRASER, J.A.; SPERBER, W.H. Rapid detection of *Listeria spp* in food and environmental samples by esculin odeling s. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 551, n.10, p.762-765, Oct., 1988.

FRÖDER, H. **Emprego de um método molecular para avaliar a presença de *Listeria monocytogenes* em saladas de hortaliças folhosas minimamente processadas**. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

FRYE, D.M; ZWEIG, R; STURGEON,J. ; TORMEY, M; LECAVALIER, M.; LEE, I.; LAWANI, L., MASCOLA, L. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with delicatessen meat contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Clin Infect Dis**, v.35, p.943-9, 2002.

FUJISA W A, T.; MORI, M. Evaluation of media for determining hemolytic activity and that of API *Listeria* system for identifying strains of *L. monocytogenes*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 4, p. 1127-1129, 1994.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.3, p.12 – 16, 2000.

FURLANETTO, S. M. P. *et al.* *Listeria spp*. Avaliação da eficiência de quatro meios de plaqueamento no seu isolamento. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 10, n.46, p.30-34., nov.-dez., 1996.

FURRER. B. ; CANFRAN, U. ; HOEFELIN, C. ; LUETHY, J. Detection and Identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by *in vitro* amplification of haemolysin gene fragments. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.70, p.372-379, 1991.

GALDIERO, E.; D'ISANTO, M.; ALLIBERTI, F. Effect os saline concentration, pH and growth temperature on the invasive capacity of *Listeria monocytogenes*. **Res. Microbiology**, v. 148, p.305-313, 1997.

GANDHI,M.; CHIKINDAS,M.L. *Listeria* a food borne pathogen that knows to survive. **International Journal of Food microbiology**. v. 113, p. 1-15, 2007.

GARAYZABAL, J.F.; RODRIGUEZ, L.D.; BOLAND, J.A.V. et al. Survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk trated in a pilot plant size pasteurizer. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.63, n.6, p. 533-537, 1987.

GARRIDO, N.S.; MORAIS, J.M.T.; BRIGANTI, R.C.; OLIVEIRA, M.A. de; BARGAMINI, A.M.M.; OLIVEIRA, S.A.V. de; FÁVARO, R.M.D. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite pasteurizado proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto/SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 141-146, 2001.

GARRITY, G. M.; WINTERS, M.; SEARLES, D. B. Taxonomic outline of the procaryontic genera. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2nd Ed. 2001. Disponível em:

<http://www.cme.msu.edu/bergeys/april2001-genus.pdf>.

GAULIN, C.; RAMSAY, D.; RINGUETTE, L.; ISMAÏL, J.; First documented outbreak of *Listeria monocytogenes* in Quebec, 2002. **Canada Communicable Disease Report**, v.29, n.21, Nov., 2003. Disponível em: hc-sc.gc.ca/pphbdgspsp/publicat/ccdr-rmtc/03vol29/dr2921ea.html. Acesso em: 26/02/04.

GAY, M.; CERF, O.; DAVEY, K.R. Significance of pre-incubation temperature and inoculum concentration on subsequent growth of *Listeria monocytogenes* at 14°C. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 81, p. 433-438, 1996.

GELINSKI, J. M. L. N. *et al.* Rapid detection of *Salmonella* in foods using a combination of sprint msrv and *Salmonella* latex test. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.38, n.3/l, p. 315-322, jul./set. 2002.

GENIGEORGES, C.; TOLEDO, J.H.; GARAYZABAL, F.J. Selected microbiological and chemical characteristics of illegally produced and marketed soft Hispanic style cheeses in California. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.8, p. 598-601, Aug. 1991.

GENIGEORGIS, C. A.; DUTULESCU, D.; GARAYZABAL, J.F. Prevalence of *Listeria spp.* In poultry meat at the supermarket and slaughterhouse level. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 52, p. 618-624, 1989.

GENIGEORGIS, C.A.; OANCA, P.; DUTULESCU, D. Prevalence of *Listeria spp.* In turkey meat at the supermarket and slaughterhouse level. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 53, p.282-288, 1990.

GEOFFROY, C. ; GAILLARD, J.-L. ; ALOUF, E. ; BERCHE, P. Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, Washington, v.55, p.1641-1646, 1987.

GEOFFROY, C.; GAILLARD, J.-L.; ALOUF, J. E.; BERCHE, P. Production of thioldependent haemolysins by *Listeria monocytogenes* and related species. **J. Gen. Microbiol.**, n. 135, p. 481-487, 1989.

GEOFFROY, C.; GAILLARD, J.-L.; ALOUF, J. E.; BERCHE, P. Purification, characterization, and toxicity of the sulphhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 55, n. 7, p. 1641-1646, 1987.

GEOFFROY, C.; RAVENEAU, J.; BERETTI, J.L.; LECROISEY, A.; VÁZQUEZ-BOLAND, J. A; ALOUF, J; BERCHE, P. Purification and characterization of an extracellular 29-kilodalton phospholipase C from *Listeria monocytogenes*. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 7, p. 2382-2388, 1991.

GIBELLO, A. *et al.* Development of a PCR assay for detection of *Yersinia ruckeri* in tissues of inoculated and naturally infected trout. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 1, p. 346-350, Jan., 1999.

GILBERT, R. J. Foodborne infections and intoxications: recent problems and new organisms. **Brit. Food J.**, v.96, p.85-7, 1994.

GILBERT, R. J.; PINI, P. N. Listeriosis and food borne transmission. **TheLancet**, London, v.1, n. 8583, p. 472-473, 1988.

GILLOT, P.; HERMANS, C.; YDE, M.; GIGI, J.; JANSSENS, M.; GENICOT, A.; Sporadic case of listeriosis associated with the consumption of a *Listeria monocytogenes*-contaminated 'Camembert' cheese. **Journal of Infection**, v. 35, p.195-197, 1997.

GILLOT, P; HERMANS, C., YDE, M.; GIGI, J.; JANSSENS, M.; GENICOT, A.; ANDRÉ, P.; WAUTERS, G.. ;Sporadic case of listeriosis associated with the consumption of a *Listeria monocytogenes*-contaminated 'Camembert' cheese. **J Infect. Sep**; v. 35, n. 2, p. 195-7, 1997.

- GLASS, K. A.; DOYLE, M. P. Fate and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in beaker sausage and pepperoni. **Journal of Food Protection**, Ames, v.52, p. 226- 231, 1989.
- GLASS, K. A.; KAUFMAN, K. M.; JOHNSON, E. A. Survival of bacterial pathogens in pasteurized process cheese slices stored at 30°C. **J. Food Prot.**, v.61, n.3, p.290-294, 1998.
- GLASS, K.A.; DOYLE, M.P. Fate of *Listeria monocytogenes* in processed meat products during refrigerated storage. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington , v. 55, n. 6, p. 1565-1569, June 1989.
- GLEDEL, J. *Listeria* and the dairy industry in France. In: SYMPOSIUM ON FOODBORNE LISTERIOSIS, Wiesbaden, FRG, Sept.7, 1988. **Proceedings...** Hamburg: B.Behr's Verlag GmbH&Co., 1988. p. 73-82.
- GOLDEN, D. A.; BEUCHAAT, L.R.; BRACKETT, R.E. Direct plating technique for enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 71, n.3, p.647-650, May/June, 1988b.
- GOLDEN, D. A.; BEUCHAT, L.R.; BRACKETT, R.E. Inactivation and injury of *Listeria monocytogenes* as affected by heating and freezing. **Food Microbiology**, London, v.4, n.1, p.17-23, 1988c.
- GOLDEN, D.A.; BEUCHAT, L.R.; BRACKETT, R.E. Evaluation of selective direct plating media for their suitability to recover uninjured, heat-injured, and freeze-injured *Listeria monocytogenes* from foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, n.6, p. 1451-6, June 1988a.
- GOLDFINE, H.; KNOB, C. Purification and characterization of *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C. **Infection and Immunity**, Washington, v. 60, n. 10, p. 4059-4067, 1992.
- GOLLO, R.; CANSIAN, R.L.; VALDUGA, E. Identificação de alguns pontos de controle de processamento dos queijos prato e mussarela. **Brazilian Journal of Food Technology**, Chicago, v. 6, p. 43-51, 2003.
- GÓMEZ CAMPILLO, J.J.; DOMÍNGUEZ FERNÁNDEZ, M.C.; ZUMALACÁRREGUI RODRIGUEZ, J.M. Incidencia de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* 0157:H7 en carnes y productos comercializados en castilla y leon. **Alimentaria**, v 303, p. 71-75, Junio 1999.
- GORBACH S.L.; BARTLETT, J.G.; BLACKLOW, N.R. **Infection diseases**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992.
- GORET, P. ; OUDAR, J. Les listerioses animales : frequence et incidence eventuelle chez l'homme. **Rev. Pathol. Comp. Med. Exp.**, v.2, n.5, p.602-626, 1965. Résumé.
- GOULET, V.; JACQUET, C.; VAILLANT, V.; REBIÈRE, I.; MOURET, E.; LORENTE, C.; MAILLOT, E.; STAÏNER, F.; ROCOURT, J. Listeriosis from consumption of raw-milk cheese. **The Lancet**, London, v.345, n.8964, p.1581- 1582, June, 1995.
- GRAY, J.T.; WAKABONGO, M *et al.* Recognition of *Yersinia enterocolitica* multiple strain infection in twin infants using PCR- base DNA fingerprinting. **Journal of Applied Microbiology**, New York, v. 90, n. 3, p. 358-364, March 2001.
- GRAY, M. L. A possible link in the relationship between silage feeding and listeriosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 136, p. 205-8, Mar. 1960.
- GRAY, M. L.; KILLINGER, A.H. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v. 30, n.2, p.309-382, June 1966.

- GRAY, P.S.; MOSSEL, A. Food hygiene in ten EC. **Brit. Food J.**, v. 94, n.9, p.10-13, 1992.
- GREIFFENBERG, L.; SOKOLOVIC, Z.; SCHNITLER, A.S.; BOCKMANN, R. *et al.* *Listeria monocytogenes*- infected human umbilical vein endothelial cells: internalin-independent invasion, intracellular growth, movement, and host cell responses. **FEMS Microbiology Letters**, v. 157, p.163–170, 1997.
- GUANG-HUA, W.; MAO-ZHAN, S. The behaviour of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed sliced odelin spiced beef. **Fleischwirtsch.**, Frankfurt, v.77,n.1, p.57-58, 1997.
- GUERRA, M.M.; McLAUHLIN, J.; BERNARDO, F.A. *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. **Food Microbiology**, London, v.18, p. 423-429, 2001.
- GUERZONI, M.E.; LANCIOTTI, R.; TORRIANI, S.; DELLAGLIO, F. Growth odeling of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in food model systems and dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 24, n. 1-2, p. 83-92, 1994.
- HAIN,T.; STEINWEG,C.; CHAKRABORTY,T. Comparative and functional genomics of *Listeria* spp. **Journal of Biotechnonology**, Amsterdan, v.126, p.37-51,2006.
- HARMON, S.M.; GOEPFERT, J. M. *Listeria*. In: APHA. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington, 2002.
- HARVEY, J.; GILMOUR, A. Occurrence and characteristics of *Listeria* in foods produced in Northern Ireland. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.19, p.193-205,1993.
- HARVEY, J.; GILMOUR, A. Occurrence of *Listeria* species in raw milk and dairy products produced in Northern Ireland. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.72, n.2, p.119- 25, Feb., 1992.
- HAYES, P.S. *et al.* Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 51, n.2, p.438-440, Feb. 1986.
- HEALTH CANADA. Listeriosis: British Columbia – Canadá . Disponível em : <http://www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgspsp/bid-bmi/dsd-dsm/nb-ab/2001/nb0802 e.html> [2003, October 23]
- HEISICK, J. E.; HARRELL, F. M.; PETERSON, E. H.; MCLAUGHLIN, S.; WAGNER, D. E.; WESLEY, I. V.; BRYNER, J. Comparison of four procedures to detect *Listeria* spp. In foods. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 52, p. 154-157, 1989b.
- HEISICK, J.E.; ROSAS-MARTY, L.I.; TATINI, S.R. Enumeration of viable *Listeria species* and *Listeria monocytogenes* in foods. **Journal of Food Protection**, Ames, v.58, n.7, p.733-736, 1995.
- HEISICK, J.E.; WAGNER, D. E.; NIERMAN, M. L.; PEELER, J. T. *Listeria spp.* found on fresh market produce. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, p. 1925-1927, 1989a.
- HERMAN, L. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* by PCR. **Food Microbiology**, London, v.14, p.103-110, 1997.
- HERMAN, L. M. F.; BLOCK, J.H.; MOERMANS, R.J.B. Direct detection of *Listeria monocytogenes* in 25 milliliters of raw milk by a two-step PCR with nested primers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 2, p.817 – 819, Feb., 1995.
- HERMAN, L.; BLOCK, J. D.; RENTERGHEM, R. VAN. Isolation and detection of *Clostridium tyrobutyricum* cells in semi-soft and hard cheeses using the polymerase chain reaction. **Journal of Dairy Research**, v. 64, p.311-314, 1997.
- HERMAN, L.M.F.; BLOCK, J.H.G.E.; MOERMANS, R.J.B. Direct detection of *Listeria monocytogenes* in 25 milliliters of raw milk by a two-step PCR with Nested primers. **Applied and Environmental**

- Microbiology**, Washington, v. 61, n.2, p.817–819, Feb. 1995.
- HIRCHINS, A.D. *Listeria monocytogenes* In: FDA Bacteriological Analytical Manual 8th Edition.
- HITCHINS, A.D.; TRAN, T. Initial cell concentration and selective media effects on the isolation of *Listeria monocytogenes* from enrichment cultures of inoculated foods. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 53, n. 6, p. 502- 504, June 1990.
- HO, J. L.; SHANDS, K. N.; FRIEDLAND, G.; ECKIND, P.; FRASER, D. W. An outbreak of type 4 b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. **Archives International Medicine**, Chicago, v. 146, p.520-524, 1986.
- HOFER, C.B.; MELLES, C.E.A.; HOFER, E. *Listeria monocytogenes* in renal transplant recipients. **Rev. Inst. Méd. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v.41, n.6, p.375-377, nov./dec. 1999.
- HOFER, E.; PESSOA, G.V.A.; MELLES, C.E.A. Listeriose humana prevalência dos sorotipos de *Listeria monocytogenes* isolados no Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 44, n.2, p. 125-131, 1984.
- HOFER, E.; PESSOA, G.V.A.; MELLES, C.E.A. Listeriose humana: prevalência dos sorotipos de *Listeria monocytogenes* isolados no Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 44, n.2, p.125-131, 1984.
- HOFER, E.; RIBEIRO, R. Ocorrência de espécies de *Listeria* em camarão industrializado. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 207-208, 1990.
- HOFER, E.; RIBEIRO, R. Ocorrência de espécies de *Listeria* em camarão industrializado. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 207-208, 1990.
- HOFER, E.; RIBEIRO, R.; FEITOSA, D.P. Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.95, p.615-620, 2000.
- HOFFMANN, F.L. *et al.* Microbiologia do leite pasteurizado tipo “C”, comercializado na região de São José do Rio Preto – SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n.65, p.51-54, out., 1999.
- HOLBROOK, R.; BRIGGS, T.; ANDERSON, J. *et al.* A 43 hour test. In: ANNUAL MEETING OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION OF MILK, FOOD AND ENVIRONMENTAL SANITARIANS, 81st., San Antonio, Texas, 1994. **Anais...** San Antonio, Texas, 1994.
- HOLT, J.G.; KRIEG, N. R; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. Regular, nonsporing gram-positive rods. Genus *Listeria*. In: HENSLEY, W. R (Ed.). **Berguey’s manual of sistematic bacteriology**. 9thed. Baltimore: Willians Wilkins, 1994. p.565-570.
- HUDSON, J.A.; MOTT, S. J. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* on cold-smoked salmon under refrigeration and mild temperature abuse. **Food Microbiology**, London, v.10, p. 61-68, 1993.
- HURD, S.; PHAN, Q.; HADLER, J.; MACKENZIE, B.; LANCE-PARKER, S.; BLAKE, P.; DEASY, M.; RANKIN, J.; FRYE, D.; LEE, I.; WERNER, B.; VUGIA, D.; BIDOL, S.; STOLTMAN, G.; BOULTON, M.; WIEDMANN, M.; KORNSTEIN, L; BOGGS, J. D.; WHITWAM, R.E.; HALE, L.M.; BRISCOE, R. P.; KAHN, S.E.; JONES, T.; MOORE, W.; AHRABI-FARD, S.; DAVIS, J.; Multistate outbreak of listeriosis – United States, 1998. **Morbidity and Mortality Weekly** v.49, n.50, p.1129-1130, Dec., 2000
- HUSU, J.R.; SEPPANEN, J.T.; SIVELA, S.K.; RAURAMAA, A.L. Contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* on dairy farms. **J. Vet. Med.**, v. 37, p. 268-275, 1990.
- IFST. *Listeria monocytogenes* in cheese. London, UK, 1995-1996.

INGIANNI, A. ; FLORIS, M.; PALOMBA,P.; MADEDDU,M.A; QUARTUCCIO,M. ; POMPEI, R. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in foods, by a combination of PCR and DNA probe. **Molecular and Cellular Probes**, v. 15, p. 275-280, 2001.

INNIS, M.A.; GELFANT, D.H.; SNINSKY, D.H.; WHITEA, T.J. (Eds.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego, California: Academic Press, 1990.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. *Listeria monocytogenes*. In: MICROORGANISMS in foods 5: microbiological specification of food pathogens. London: Chapman & Hall, 1996. p.141-182.

IRETON, K.; COSSART, P. Host-pathogen interactions during entry and actin-based movement of *Listeria monocytogenes*. **Annu. Rev. Genet.**, n. 31, p. 113-138, 1997.

IRETON, K.; COSSART, P. Mécanismes d'entrée de *Listeria monocytogenes* dans les cellules de mammifères: facteurs bactériens, ligands cellulaires, signalisation. **Annales de L'Institut Pasteur/actualités**, v.8, p.131-138, 1997.

JACQUET, C.; CATIMEL, B.; BROSCHE, R.; BUCHRIESER, C.; DEHAUMONT, P.; GOULET, V. ; LEPOUTRE, A.; VEIT, P; ROCOURT, J .Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n.6, p.2242-2246, June, 1995.

JACQUET, C.; CATIMEL, B.; BROSCHE, R.; BUCHRIESER, C.; DEHAUMONT,JARADAT, Z.W.; SCHUTZE, G.E.; BHUNIA, A.K. Genetic homogeneity among *Listeria monocytogenes* strains from infected patients and meat products from two geographic locations determined by phenotyping, ribotyping and PCR analysis of virulence genes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.76, p.1-10, 2002.

JATON, K. ; SAHLI, R. ; BILLE, J. Development of polymerase chain reaction assays for detection of *Listeria monocytogenes* in clinical cerebrospinal fluid samples. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, p. 1931-1936, 1992.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. **Microbiologia médica**. 20.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

JAY, J. M.; LOESSNER,M.; GOLDEN, D.A. **Modern food microbiology**. 7 ed. Food Science Text Series. Springer Science Business Media Inc. 751 p. 2005.

JAY, J.M. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. **Food Control**, Oxford, v. 7, n. 4/5, p. 209-214, 1996.

JAY, J.M. **Microbiologia de los Alimentos**. 3.ed. Acribia, Zaragoza, 1994.

JEONG, D. K.; FRANK, J.F. Growth of *Listeria monocytogenes* at the 10°C in biofilms with microorganisms isolated from milk and dairy processing environments. **Journal of Food Protection**, Ames, v.57, n.7, p.576-586, 1994.

JERSEK, B. *et al.* Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence-based PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n.1, p. 103–109, jan., 1999.

JOBIM, C. C.; SANTOS, G. T. **Aspectos relacionados a microbiologia da silagem e qualidade da forragem**. Disponível em: <<http://dzo.uem.br/artigo.html>>. Acesso em março de 2002.

JOHANNESSEN, G.S.; LONCAREVIC, S.; KRUSE, H. Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.77, p.199-204, 2002.

JOHNSON, J. L.; LATTUADA, C. P. Comparison of nucleic acid hybridization assays and biochemical

characterization tests for the confirmation of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Ames, v.56, n.10, p.834-840, 1993.

JONES, C.E.; SHAMA, G.; JONES, D.; ROBERTS, I.S.; ANDREW, P.W. Physiological and biochemical studies on psychrotolerance in *Listeria monocytogenes*. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.83, n.1, p.31-35, 1997.

JUNEJA, V.K.; SNYDER, O. P., MARMER, B.J.J. Potential for growth from spores of *Bacillus cereus* and *Clostridium botulinum* and vegetative cells of *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* serotypes in cooked ground beef during cooling. **Journal of Food Protection**, Ames, v.60, n.3, p.272-275, 1997.

KABUKI, D.Y. **Rastreamento de *Listeria monocytogenes* em indústrias processadoras de queijo fresco tipo latino, nos Estados Unidos da América, em pregando a subtipagem molecular. 145p.** Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

KACHKOVÁ, E. *et al.* Detection of *Listeria monocytogenes* in food, equivalent to EN iso 11290-1 or ISO 10560, by a three-days polymerase chain reaction- based method. **Food Control**, Oxford, v. 14, p.175-179, 2003.

KALOGRIDOU-VASSILIADOU, D.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Microbiological and physicochemical characteristics of 'Anthotyro', a Greek traditional whey cheese. **Food Microbiology**, London, v. 11, p. 15-19, 1994.

KARPÍSKOVÁ, R; PEJHALOVA, M.; MOKROOVÁ, J.; VYTASOVÁ, J.; MUHAOVÁ, P; RUPRICH, J. Application of a chromogenic medium and the PCR method for the rapid confirmation of *Listeria monocytogenes* in fodstuffs. **Journal of Microbiological Methods**, v.41,n.3, p. 267-271, 2000.

KATHARIOU, S.; ROCOURT. J.; HOF, H.; GOEBEL, W. Levels of *Listeria monocytogenes* hemolysin are not directly proportional to virulence in experimental infections of mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 56, n. 2, p.534-536, 1988.

KAYAL, S; HARBIT, A. Listeriolisina O: a key protein of *Listeria monocytogenes* with multiple functions. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 30, p. 514-529, 2006.

KAYAL, S.; LILIENBAUM, A.; POYART, C.; MEMET, S.; ISRAEL, A.; BERCHE, P. Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NF-Kappa B and upregulation of adhesion molecules and chemokines. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 31, n.5, p.1709-1722, 1999.

KEROUANTON, A.; BRISABOIS, A.; DENOYER, E.; DILASSER, F.; GROUT, J.; SALVAT, G.; PICARD, B. Comparison of five typing methods for the epidemiological study of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 43, p.61-71, 1998.

KERR, K.; DEALLER, S.F.; LACEY, R.W. *Listeria* in coolchill food. **Lancet II**, London, n.8601, p.37-38, 1988a.

KERR, K.; DEALLER, S.F.; LACEY, R.W. Materno-fecal listeriosis from cooked-chill and refrigerated food. **Lancet II**, London, n.8620, p.1133, 1988b.

KERR, K.G.; DEALLER, S.F.; LACEY, R.W. Materno fetal listeriosis from cook chill and refrigerated food. **The Lancet**, London, p. 1133, Nov. 1988.

KINDERLERER, J. L.; LUND, B. M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by hexanoic and octanoic acids. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 14, p. 271-274, 1992.

KING, W.; RAPOSA, W.; WARSHAW, J.; JOHNSON, A.; HALBERT, D.; KLINGER, J.D. A new

colorimetric nucleic acid hybridization assay for *Listeria* in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.8, p.226-232, 1989.

KLAUSNER, R. B.; DONNELLY, C. W. Environmental sources of *Listeria* and *Yersinia* in Vermont dairy plants. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.8, p.607-11, Aug., 1991.

KLEIN, P.; JUNEJA, V. Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription - PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 11, p. 4441-4448, Nov. 1997.

KLIMA, R.A.; MONTVILLE, T.J. The regulatory and industrial responses to listeriosis in the USA: a paradigm for dealing with emerging foodborne pathogens. **Trends Food Science Technology**, v.6, p.87-93, 1995.

KNABEL, S. J. Optimized, one-step, recovery-enrichment broth for enhanced detection of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk and hot dogs. **J. AOAC Int.**, v.85, p.501-504, 2002.

KNABEL, S.J. (Ed). Foodborne illness: role of home food handling practices. **Food Technology**, Chicago, v.49, p.119-131, 1995.

KNIGHT, M.T.; NEWMAN, M.C.; BENZINGER, M.J.; AGIN, J.R.; ASH, M.; SIMS, P.; HUGHES, D. TECRA *Listeria* visual immunoassay (TLVIA) for detection of *Listeria* in foods: collaborative study. **J.AOAC Int.**, v. 79, n. 5, p. 1083-1094, Sep-Oct. 1996.

KNOCHEL, S.; GOULD, G. Preservation microbiology and safety: quo vadis? **Trends Food Sci. Tech.**, v.6, n.4, p.127-131, 1995.

KOCKS, C.; HELLIO, R.; GOUNON, P.; ORAYON, H.; COSSART, P. Polarized distribution of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA at the site of directional actin assembly. **J. Cell Sci.**, n. 105, p. 699-710, 1993.

KONEMAN, E.W. **Diagnóstico microbiológico**. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

KORSAK, N.; DAUGE, G.; GHAFIR, Y.; CHAHED, A.; JOLLY, S.; VINDEVOGEL, H. An efficient sampling technique used to detect four foodborne pathogens on pork and beef carcasses in nine Belgian abattoirs. **J. Food Prot.**, Ames, v.61, n.5, p.535-541, 1998.

KRÄMER, K. H.; BAUMGART, J. Sliced frankfurter-type sausage: inhibiting *Listeria monocytogenes* by means of a modified atmosphere. **Fleischwirtsch**, Frankfurt, v.73, n.11, p.1279-1280, 1993.

KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 584-640, July 2001.

KRETZSCHMAR, M. **Estudo comparativo de metodologias para avaliar a recuperação e sobrevivência de *Listeria* spp. frente à microbiota residente de pescado mantido em temperatura de refrigeração e congelamento**. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1997.

KRUGER, M. F. **Controle de *Listeria monocytogenes* em linguiça frescal refrigerada através do uso de óleo essencial de orégano e nisina**. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2006.

KUHN, M.; GOEBEL, W. Host cell signaling during *Listeria monocytogenes* infection. **Trends in Microbiol.**, v.6, p.11-15, 1998.

KUHN, M.; GOEBEL, W. Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. **Infection and Immunity**, Washington, v.57, p.3695-3701, 1989.

KUHN, M.; PFEUFFER, T.; GREIFFENBERG, L.; GOEBEL, W. transduction during *Listeria*

monocytogenes infection. www.biomedexperts.com/Profile.bme/1112458/T_Pfeuffer

LABERGE, I. *et al.* Detection of *Listeria monocytogenes* inoculated in dairy products by ampliscript. **Food Microbiology**, London, v.14, p.283-290, 1997.

LACIAR, A. L.; VACA, L.; CENTORBI, O.N.P. *Listeria spp.* em alimentos de origem animal. **Revista Argentina de Microbiologia**, n. 31, p. 25-30, 1999.

LAGE, M.E. *et al.* Ocorrência de *Listeria spp.* em carne crua de frango no mercado da cidade de Belo Horizonte–MG. **Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec.**, v. 48, n.1, p.53-60, 1996.

LAMPEL, K. A. *et al.* Improved template preparation for PCR-based assays for detection of food-borne bacterial pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n.10, p.4539-42, Oct. 2000.

LANCIOTTI, R.; MASSA, S.; GUERZONI, M. E.; DI FABIO, G. Light butter: natural microbial population and potential growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 15, p. 256-258, 1992.

LANDGRAF, I. M. *et al.* Surto de Meningite neonatal por *Listeria monocytogenes*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 58, n.1, p. 63-67, 1999.

LANGONI, H.; FONSECA, T.H.P. Participação da *Listeria monocytogenes* na mastite bovina: importância para a saúde pública. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.11, n.50, p.36-38, jul.-ago., 1997.

LANTZ, P.G. *et al.* Enhanced sensitivity in PCR detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese through use of an aqueous two-phase system as a sample preparation method. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.9, p. 3416–3418, Sept. 1994.

LANTZ, P.G.; TJERNELD, F.; HAHN-HÄGERDAL, B.; RÅDSTRON, P. Use of aqueous two-phase systems in sample preparation for polymerase chain reaction-based detection of microorganisms. **Journal of Chromatography B**, v. 680, p. 165-170, 1996.

LEAL, N. C.; HOFER, E.; COSTA, M.F.; SÁ, A. T. Isolamento de *Listéria monocytogenes* de líquido cefalorraquidiano, em Recife, Pernambuco. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.14, n.4, p 290-291, out.-dez., 1983.

LEASOR, S.B.; FOEGEDING, P. M. *Listeria* species in commercially broken raw liquid whole egg. **Journal of Food Protection**, Ames, v.52, p.777-780, 1989.

LECHOWICH, R.V. Microbiological challenges of refrigerated foods. **Food Technology**, Chicago, v.42, p.84-89, 1988.

LEE, I.; LAWANI, L.; MASCOLA, L. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with delicatessen meat contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.35, n.10, p.943-949, Oct., 2002.

LEE, W. H.; MCCLAIN, D. Improved *Listeria monocytogenes* selective agar. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, Baltimore, v. 52, n.5, p. 1215-1217, Nov. 1986.

LEIMEISTER-WÄCHTER, M.; DOMANN, E.; CHAKRABORTY, T. The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. **J. Bacteriol.**, v. 174, n. 3, p. 947-952, 1992.

LEITE, C.C.; GUIMARÃES, A.G.; ASSIS, P.N.; SILVA, M.D.; ANDRADE, C.S.O. Qualidade bacteriológica do leite integral (tipo C) em Salvador – Bahia. **Rev. Brás. Saúde Prod. An.**, v. 3, n. 1, p. 21-25, 2002.

LEITE, M. O. *et al.* Avaliação da qualidade microbiológica de duas marcas de leite em pó,

comercializadas em Belo Horizonte, (MG) Brasil. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n.65, p.43–46, out. 1999.

LEMES-MARQUES, E.G.; CRUZ, C. D.; DESTRO, M. T. Pheno- and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates from the southwestern region of the State of São Paulo, Brazil. **Braz. J. Microbiol.** [online]., v. 38, n. 2, pp. 287-292, 2007.

LIEWEN, M.B.; PLAUTZ, M.W. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Nebraska. **Journal of Food Protection**, Ames, v.51, n.11, p. 840–1, Nov. 1988.

LIMA, A.T.F.; ROSSINI, E.M.M.; POMPERMAYER, D.M.C. Incidência de *Listeria* sp. e *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos. In. CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22, FLORIANÓPOLIS, 2003. **Resumos**. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Micoribologia, 2003.

LIN, C.M.; FERNANDO, S.; WEI, C.I. Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in vegetables salads. **Food Control**, Oxford., v.7, n.3, p.135-140, 1996.

LINNAN, M. J.; MASCOLA, L.; LOU, X. D.; GOULET, V.; MAY, S.; SALMINEN, C.; HIRD, D. W.; YONEKURA, M. L.; HAYES, P.; WEAVER, R.; AUDURIER, A.; PLIKAYTIS, B. D.; FANNIN, S. L.; KLEKS, A.; BROOME, C.V. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 319, p. 823-828, 1988.

LINTON, R.H.; WEBSTERN, J.B.; PIERSON, M.D.; BISHOP, J.R.; HACKNEY, C. R. The effect of sublethal heat shock and growth atmosphere on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* scott A. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 55, n. 2, p. 84-87, 1992.

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

LOESSNER, M.J. Comparison of seven planting media for enumeration of *Listeria* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, n.12, p. 3003–3007, Dec., 1988.

LOESSNER, M.J.; BELL, R.H.; JAY, J.M.; SHELEF, L.A. Comparison of seven plating media for enumeration of *Listeria* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 2, p. 3003-3007, Dec. 1988.

LOGUERCIO, A. P.; SILVA, W.P.; ALEIXO, J.A.G.; COASTA, M. M.; VARGAS, A.C. *Listeria monocytogenes*: um importante patógeno de origem alimentar. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n.80-81, p.39-48, jan./fev., 2001.

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.

LONCAREVIC, S.; BANNERMAN, E.; BILLE, J.; DANIELSSON-THAM, M.L.; THAM, W. Characterization of *Listeria* strains isolated from soft and semi-soft cheeses. **Food Microbiology**, London, v. 15, p. 521-525, 1998.

LONCAREVIC, S.; DANIELSSON-THAM, M.L.; GERNER-SMIDT, P.; SAHLSTROM, L.; THAM, W. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft and semi-soft cheeses in retail outlets in Sweden. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 26, p. 245-250, 1995.

LONCAREVIC, S.; DANIELSSON-THAM, M.L.; GERNER-SMIDT, P.; SAHLSTROM, L.; THAM, W. Potential sources of human listeriosis in Sweden. **Food Microbiology**, London, v. 15, p. 65-69, 1998.

LONCAVERIC, S.; DANIELSSON-THAM, M.L.; THAM, W. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft and semi-soft cheeses in retail outlets in Sweden. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.26, p. 245-250, 1995.

- LONGO, D.S. et al. **Manual do Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária: métodos de análise microbiológica para alimentos.** [Brasília], 1992.
- LOVETT, J. ; HITCHINS, A.D. *Listeria* isolation, revised method of analysis. **Federal Register**, Washington, v.53, n.211, p.44148-44153, Nov. 1988.
- LOVETT, J. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, Chicago, v.42, n.4, p.172-5. Apr. 1988a.
- LOVETT, J. *Listeria* Isolation. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual**. 6thed. Washington, 1984/87. Supl. 9.
- LOVETT, J. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M. P. (Ed.). **Food-borne pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 283-310.
- LOVETT, J.; FRANCIS, D.W.; HUNT, J. M. *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence and pathogenicity. **Journal of Food Protection**, Ames, v.50, n. 3, p. 188-92, Mar. 1987.
- LOVETT, J.; TWEDT, R. M. *Listeria*. **Food Technology**, Chicago, v. 42, n. 4, p. 188-191, 1988.
- LOVETT, J.; WESLEY, I.V.; VANDERMAATEN, M.J.; BRADSHAW, J.G.; FRANCIS, D.W.; CRAWFORD, R.G.; DONELLU, C.W.; MESSER, J.W. High-temperature short-time pasteurization inactivates *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, p. 734-738, 1990.
- 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.
- LUND, A.M.; ZOTTOLA, E.A.; PUCH, D. J. comparison of methods for isolation of *Listeria* from raw milk. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.8, p. 602-606, Aug., 1991.
- LUNDÉN, J.; TOLVANEN, R.; KORKEALA, H. Human Listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 87, p. E6-E12, 2004.
- LUNGE, V. R. **Desenvolvimento de técnicas de biologia molecular para a detecção e identificação de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes***. 106 p. Tese (Doutorado em Ciências), Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.
- 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.
- MAC FADDIN, J. F. CAMP Reverse CAMP tests (reactions) and CAMP inhibition (phospholipase D production) teste In: **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 912p. p. 35-56.
- MAC FADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1976. 312 p.
- MacGOWAN, A.P.; BOWKER, K.; McLAUCHLIN, J.; BENNETT, P.M.; REEVES, D.S. The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. in shop bought foodstuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 21, n. 4, p. 325-334, 1994.
- MADDEN, J. M. Regulatory concerns of *Listeria* in foods. In: IFT ANNUAL MEETING. **Book of**

abstracts. [S.l.: s.n.], 1992. p.102.

MAIJALA, R.; LYYTIKÄINEN, O.; JOHANSSON, T.; AUTIO, T.; AALTO, T.; HAAVISTO, L.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Exposure of *Listeria monocytogenes* within an epidemic caused by butter in Finland. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 70, n. 1-2, p.97-109, oct., 2001.

MAIJALA, R.; LYYTIKÄINEN, O.; JOHANSSON, T.; AUTIO, T.; AALTO, T.; HAAVISTO, L.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Exposure of *Listeria monocytogenes*.

MAIJALA, R.; LYYTIKÄINEN, O.; JOHANSSON, T. Exposure of *Listeria monocytogenes* in an outbreak caused by butter. In: ISOPOL, 14, Mannheim. **Resumos**. Alemanha, p.165. 2001.

MAKINO, S.I.; OKADA, Y.; MARUYAMA, T. A new method for direct detection of *Listeria monocytogenes* from foods by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.10, p.3745-3747, Oct. 1995.

MANERU, L.; GARCÍA-JALÓN, I. *Listeria monocytogenes* en alimentos disponibles en el mercado de Pamplona. **Alimentaria**, Harac, v. 33, n.267, p.39-43, 1995.

MANUAL de medios de cultivo MERCK. Darmstadt: E. Merck, 1990. p.135-136.

MANZANO, M. et al. A rapid method for the identification and partial serotyping of *Listeria monocytogenes* in food by PCR and restriction enzyme analysis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 42, p.207-212, 1998.

MANZANO, M. et al. A simple and fast PCR protocol to detect *Listeria monocytogenes* from meat, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 74, p. 25-30, July, 1997.

MANZANO, M. et al. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* from milk and cheese by a single-step PCR. **Molecular Biotechnology**, v.7, p. 85-88, 1997.

MANZANO, M. et al. A rapid method for the identification and partial serotyping of *Listeria monocytogenes* in food by PCR and restriction enzyme analysis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 42, p.207-212, 1998.

MANZANO, M. Et al. A simple and fast PCR protocol to detect *Listeria monocytogenes* from meat. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 74, p. 25-30, Jul. 1997.

MANZANO, M. et al. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* from milk and cheese by a single-step PCR. **Molecular Biotechnology**, v.7, p. 85-88, 1997.

MARGOLLES, A.; MAYO, B.; REYES-GAVILÁN, C.G. de los. Phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains isolated from short-ripened cheeses. **Food Microbiology**, London, v. 17, p. 461-467, 2000.

MARGOLLES, A.; MAYO, B.; REYES-GAVILÁN, C.G. de los. Polymorphism of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains isolated from short-ripened cheeses. **Journal of Applied Microbiology**, New York, v. 84, p.255-262, 1998.

MARGOLLES, A.; RODRÍGUEZ, A.; REYER-GAVILLAM, C.G.D. Some chemical and bacteriological characteristics of regional cheeses from Asturias, Spain. **Journal of Food Protection**, Ames, v.59, n.5, p. 509-515, 1996.

MARQUES, E. G. L. **Estudo da influencia de condições extrínsecas na expressão de fatores de virulência produzidos por *Listeria monocytogenes*, e sua aplicação na identificação da espécie. 95f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.**

MARSIGLIA, M. L. et al. Development of a combined selective enrichment method and polymerase chain

reaction (PCR) assay for sensitive detection of *Salmonella* in food samples. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 13, p.649-654, 1997.

MASSA, S.; CESARONI, D.; PODA, G.; TROVATELLI, L.D. The incidence of *Listeria* spp. in soft cheeses, butter and raw milk in the province of Bologna. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.68, n.2, p.153-6, Feb. 1990.

Mc LAUCHLIN, J.; GREENWOOD, M. H.; PINI, P. N. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese from a manufacturer associated with a case of Listeriosis. **Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.10, p.255- 262, 1990.

McCARTHY, S. A. Incidence and survival of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat seafood products. **Journal of Food Protection**, Ames, v.60, n.4, p.372-376, 1997.

MCCLAIN, D.; LEE, W. H. Development of USDA- FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v.71, n.3, p. 660-664, 1988.

McKELLAR, R.C. Use of the CAMP test for identification of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.4219-4223, 1994.

McLAUCHLIN, J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. **Food Control**, Oxford, v. 7, n. 4/5, p. 187-193, April, 1996.

McLAUCHLIN, J. The role of the Public Health Laboratory Service in England and wales in the investigation of human listeriosis during the 1980s and 1990s. **Food Control**, Oxford, v. 7, n. 4/5, p. 235-239, 1996.

McLAUCHLIN, J. *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 63, p. 1-11, 1987.

McLAUCHLIN, J. The identification of *Listeria* species. **Internacional Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 38, p.77-81, 1997.

McLAUCHLIN, J.; GREENWOOD, M.H.; PINI, P.N. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese from a manufacturer associated with a case of listeriosis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 10, n. 3-4, p. 255-262, 1990.

McLAUCHLIN, J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. **Food Control**, Oxford, v.7, n.4/5, p.187-193, 1996.

McLAUCHLIN, J.; HALL, S.M.; VALANI, S.K.; GILBERT, R.J. Human listeriosis and paté: a possible association. **Br. Med. J.**, London, v.303, p.773-775, 1991.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. **Emerg. Infec. Dis.**, Atlanta, v. 5, n.5, p.607-625, 1999.

MELLO, J. F. **Análise molecular do gene iap de *Listeria monocytogenes* isoladas de alimentos no estado do Rio Grande do Sul.** 59 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto de Ciencia e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

MELLO, J. F. *et al.* Molecular analysis of the iap gene of *Listeria monocytogenes* isolated from cheeses in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. [online]. v. 39, n. 1, p. 169-172, 2008.

MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; HOGG, T.; GIBBS, P.A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. **Food Microbiology**, London, v.

21, p. 213-216, 2004.

MENDES, S.D.C. **Detecção de *Listeria* spp. em frango resfriado pelos métodos convencional em condições de aerobiose e microaerofilia.** 59 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

MENÉNDEZ, S.; GODÍNEZ, R.; CENTENO, J.A.; RODRÍGUEZ-OTERO, J.L. Microbiological, chemical and biochemical characteristics of 'Tetilla' raw cows-milk cheese, London, v. 18, p. 151-158, 2001.

MENÉNDEZ, S.; GODÍNEZ, R.; HERMIDA, M.; CENTENO, J.A.; RODRÍGUEZ-OTERO, J.L. Characteristics of 'Tetilla' pasteurized milk cheese manufactured with the addition of autochthonous cultures. **Food Microbiology**, London, v. 21, p. 97-104, 2004.

MERCK. **Manual de médios de cultivo.** Dormstadt, 1982.

MERZ, A.J.; HIGGS, H.N. *Listeria* motility: Biophysics pushes things forward. **Current Biology**, v.13,p.302-304, April 2003.

MEYER-BROSETA, S.; DIOT, A.; BASTIAN, S.; RIVIÈRE, J., CERF, O. Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 80, p. 1-15, 2003.

MIETTINEN, M. K.; SIITONEN, A.; HEISKANEN, P.; HAAJANEN, H.; BJÖRKROTH, K. J.; KORKEALA, H. J. Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, n.7, p.2358-2360, July, 1999.

MING, X.; WEBER, G. H., AYRES, J.W. et al. Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. **J. Food Sci.**, v.62, n.2, p.413-415, 1997.

MONGE, R.; ARIAS, M.L. Presence of various pathogenic microorganisms in fresh vegetables in Costa Rica. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 46, n.4, p.292-294, 1996.

MONGE, R.; ARIAS, M.L.. Presencia de microorganismos patógenos em hortaliças de consumo cruo em Costa Rica. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.46,n. 4, p.292-294, 1996.

MORGAN, F.; BONNIN, V.; MALLEREAU, M.P.; PERRIN, G. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. **International Journal of Food Microbiology, Amsterdam** v. 64, p. 217-221, 2001.

MORO, E. M. P.; NUNES, M. P. *Yersinia* spp: a study of the biological characteristics of strains isolated from minas frescal cheese (white cheese). **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 23, n.4, p.250-255, 1992.

MORSE, R. et al. Isolation of Rifampin: resistant mutants of *Listeria monocytogenes* and their characterization by *rpoB* gene sequencing, temperature sensitivity for growth, and interaction with an epithelial cell line. **Journal of Clinical Microbiology**, Washinton, v.37, n.9, p. 2913-2919, Sept., 1999.

MOURA, S. M. **Incidência de *Listeria* spp em amostras de leite cru e pasteurizado, tipos C e B, obtidas em uma usina de beneficiamento da cidade de São Paulo.** 104 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade São Paulo, São Paulo, 1992.

MURRAY, C.J.L.; STYBLO, K.; ROOUILON, A. Tuberculosis in developing countries; burden, intervention and cost. **Bull. Int. Unio Tub. Lung Dis.**, v. 65, p. 6-24, 1990.

MURRAY, E. G. D.; WEBB, R. A.; SWANN, M. B. R. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis: caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*.

Journal of Pathology and Bacteriology, Edinburgh, v. 29, p. 407-439, 1926.

MURRAY, P. R. et al. **Manual of clinical microbiology**. 7th ed. Washington: ASM Press, 1999.

NAKAMA, A.; TERAU, M.; KOKUBO, Y.; ITOH, T.; MARUYAMA, T.; KANEUCHI, C.; McLAUCHIN, J. A comparison of *Listeria monocytogenes* serovar 4b isolates of clinical and food origin Japan by pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 42, p.201- 206, 1998.

NASCIMENTO, M.da G.F. do; NASCIMENTO, E.R. do. **Importância da avaliação microbiológica na qualidade e segurança dos alimentos**. Seropédica, RJ: EMBRAPA, 2000. (Documentos, 120) (Disponível em: <www.cnpad.embrapa.br/serviços/download/doc/20.pdf>).

NASCIMENTO, M.G.F.; CULLOR, J.S. Listeriose humana: epidemiologia e fontes de contaminação. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.8, p.13-17. 1994

NASCIMENTO, V. P. et al. O uso da reação em cadeia pela polimerase (PCR) na detecção de *Salmonella* em materiais e produtos de origem avícola. In: SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA, 2., Santa Maria, 14- 15 de setembro de 2000. **Anais...** Santa Maria: [Embrapa], 2000.

NEGRETE, I. R. A. **Sorotipagem, fagotipagem caracterização molecular de cepas de *Salmonella* spp. e avaliação epidemiológica de surtos ocorridos no Paraná de 1999 a 2004. 216p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade estadual de Londrina, Londrina, 2004.**

NERO, L.A. ***Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção. 141f. Dissertação (Mestrado Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.**

NERVINO, C. **Relevância de *Staphylococcus aureus* e enterotoxinas na contaminação microbiana e nas doenças de origem alimentar, no estado do Paraná. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) –Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1997.**

NERVINO, C.V.; HIROOKA, E.T. Fatores contemporâneos que afetam a incidência de patógenos causadores de doenças de origem alimentar. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.18, n.2, p.197-206, 1997.

NGUYEN-THE, C.; LUND, B. M. An investigation of the antibacterial effect of carrot on *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 73, p.23-30, 1992.

NIEDERHAUSER, C et al. Comparison of “Gen-Probe” DNA probe and PCR for detection of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated soft cheese and semi-soft cheese. **Research in Microbiology**, v. 144, p.47-54, 1993.

NIEDERHAUSER, C. et al. Use of polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in food. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58. n. 5, p. 1564-68, May, 1992.

NØRRUNG, B.; ANDERSEN, J.K.; SCHLUNOTT, J. Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.53, p.195-203, 1999.

NORTON, D. M.; BATT, C.A. Detection of viable *Listeria monocytogenes* with a 5' nuclease PCR assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p.2122-2127, 1999.

NOTERMANS, S. H. W.; DUFRENNE, J.; LEIMEISTER-WÄCHTER, M; DOMANN,E.; CHAKRABORTY, T. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 9, p. 2666-2670, 1991.

NOTERMANS, S.; DUFRENNE, J.; TEUNIS, P; CHACKRABORTY, T. Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Ames, v.61, n.2, p.244-248,1998.

NOTERMANS, S.; GIESSEN van der, A. Foodborne disease in the 1980s and 1990s, the Dutch experience. **Food Cont**, v.4, p. 122-4, 1993.

NOTERMANS, S.; HOOGENBOOM – VERDEGAL, A. M. M. existing and emerging foodborne diseases. **International Journal of Food Microbiology**, v.15, p.197-205, 1992.

NUNES, Z. das G.; HOFER, E. Evaluation of phenotypic markers associated with pathogenicity in the genus *Listeria*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** , São Paulo, 36, n.4, p.293-299, jul./ago., 1994.

OBLINGER, J. L. (Ed.). Bacteria associated with foodborne diseases. **Food Technology**, Chicago, v.42, p.181-200, 1988.

ODUMERU, J.A.; MITCHELL, S.J.; ALVES, D.M.; LYNCH, J.A.; YEE,A.J.; WAMG, S.L.; STYLIADIS, S.,; S.; FARBER, J.M. Assessment of the microbiological quality of ready-to-use vegetables for health-care food services. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.60, n.8, p.954-960, 1997.

OJENIYI, B.; WEGENER, H.C.; JENSEN, N.E. et al. *Listeria monocytogenes* in poultry products: epidemiological investigations in seven Danish abattoir. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 80, p.395-401, 1996.

OLARTE, C.; GONZÁLEZ-FANDOS, E.; GIMÉNEZ, M.; SANZ, S.; PORTU, J. The growth of *Listeria monocytogenes* in fresh goat cheese (Cameros cheese) packaged under modified atmospheres. **Food Microbiology**, London, v. 19, p. 75-82, 2002.

OLARTE, C.; SANZ, S.; GONZÁLEZ-FANDOS, E.; TORRE, P. Microbiological and physicochemical characteristics of Cameros cheese. **Food Microbiology**, London, v. 16, p. 615-621, 1999.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, n. 6, p. 1661-69, Jun. 1999.

OLIVEIRA, A.N. **Bactérias do gênero *Listeria* em leite e derivados no comércio varejista de Goiânia- Goiás**. 101 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

OLIVEIRA, M.; GUERRA, M.; BERNARDO, F. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in silages assessed by fluorescent in situ hybridization. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. [online], v. 60, n. 1, p. 267-269, 2008.

OLSEN SJ; PATRICK M; HUNTER SB; REDDY V; KORNSTEIN L; MACKENZIE WR; LANE K; BIDOL S; STOLTMAN GA; FRYE DM; LEE I; HURD S; JONES TF; LAPORTE TN; DEWITT W; GRAVES L; WIEDMANN M; SCHOONMAKER-BOPP DJ; HUANG AJ; VINCENT C; BUGENHAGEN A; CORBY J; CARLONI ER; HOLCOMB ME; WORON RF; ZANSKY SM; DOWDLE G; SMITH F; AHRABI-FARD S; ONG AR; TUCKER N; HYNES NA; MEAD P. Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infection linked to delicatessen turkey meat. **Clin Infect Dis**. v.40; n.7, p. 962-7, 2005.

OXOID. *Listeria* rapid test. FT401. **Informe Técnico**, n.17, [199?]

PADILHA, M.R.F.; FERNANDES, Z. de; LEAL, T.C.A.; LEAL, N.C.; ALMEIDA, A.M;P. de. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 34, n. 2, p. 167, 171, mar./abr. 2001.

PAGAN, R.; COONCÓN, S.; SALA, F. J. Effects of several factors on the heat-shock-induced thermotolerance of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington,

v.63, n.8, p.3225-3232, Aug. 1997.

PAGOTTO, F.; DALEY, E.; FARBER, J.; WARBURTON, D. **Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples.** Ottawa, Canadá: Government of Canadá/Health Products and Food Branch, Jan. 2001.

PAINTER, T. J. Carbohydrate polymers in food preservation: an integrated view of the Maillard reaction with special reference to discoveries of preserved foods in Sphagnum-dominated peat bogs. **Carbohydr. Polym.**, n. 36, p.335-347, 1998.

PAK, S.; SPAHR, U.; JEMMI, T.; SALMAN, M.D. Risk factors for *L. monocytogenes* contamination of dairy products in Switzerland, 1990-1999. **Preventive Veterinary Medicines**, v. 53, p. 55-65, 2002.

PALUMBO, S.A. Is refrigeration enough to restrain foodborne pathogens? **Journal of Food Protection**, Ames, v. 49, n.12, p.1003-1009, Dec. 1986.

PALUMBO, S.A.; WILLIAMS, A.C. Effect of temperature relative humidity and suspending medium on the resistance of *Listeria monocytogenes* to drying. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 53, n.5, p.377-81, May 1990.

PANDIRIPALLY, V. K.; WESSTBROOK, D.G.; SUNKI, G.R.; BHUNIA, A.K. Surface protein p104 is involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to human intestinal cell line, Caco-2. **Journal Med. Microbiology**, v.48, p.117-124, 1999.

PARANÁ. Instituto de Saúde. **Capacitação de recursos humanos da Vigilância Sanitária.** Londrina, PR, 1999. (Pré-Projeto apresentado pela 17. Regional de Saúde à Divisão de Alimentos do ISEP).

PARK, S. F.; STEWART, G. S. A. B.; KROLL, R G. The use of bacterial luciferase F for monitoring the environmental regulation of expression of genes encoding virulence factors in *Listeria monocytogenes*. **Journal of General Microbiology**, n. 138, p.2619-2627, 1992.

PARODI, M.; MARINO, P.; BALZARETTI, C.; MAURI, A.; CAINARCA, M.; CANTONI, C. A case report of sporadic listeriosis relate to pork meat in health man. **G. Mal. Infett. Parassit.**, Milano, v. 42, n.1, p.115-116, 1990.

PAZIAK-DOMANSKA, B. et al. Evaluation of the API test, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity and PCR method in identification of *Listeria monocytogenes* in meat foods. **FEMS Microbiol Lett.**, n. 171, p.209-214, 1999.

PEARSON, L. J.; MARTH, E. H. *Listeria monocytogenes*: threat safe a food supply. **Journal Science Dairy**, v.73, p. 912-928, 1980.

PELISSER, M.R. **Detecção de *Listeria* spp. Em frango resfriado comercializado em Florianópolis – SC, através do método rápido Clearview e método convencional.** 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1998.

PEREDA, J. A. O.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. Tecnología de alimentos. São Paulo: Artmed, v.2, 2005

PEREIRA, A. I. B.; MARTINS, S.C.S.; ALBUQUERQUE, L.M.B. Bactérias extremofílicas termófilas, em leite comercial estéril. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 14, n.77, p.40-44, out., 2000.

PEREIRA, M. L.; ROCOURT, J. *Listeria monocytogenes*: uma revisão sobre aspectos taxonômicos, importância médica e em alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 7, n.26, p.5-12, jun. 1993.

PEREIRA, M.L. et al. Characterization of brazilian *Listeria monocytogenes* strains using DNA macrorestriction patterns. **Revista de Microbiologia.**, São Paulo, v. 25, n. 3, p.144-148, set. 1994.

- PEREIRA, M.S.V. Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping – PCR. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.35, p.32-36, 2002.
- PERRY, K.S.P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v.27, n.2, p. 293-300, 2004.
- PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T.J. (Eds.). **Diagnostic molecular microbiology**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1993.
- PETTRAN, R. L.; SWANSON, K.M.J. Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.7, p.616-8,1993.
- PETTRAN, R. L.; ZOTTOLA, E. A. A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 54, p. 458 -460, 1989.
- PETTRAN, R. L.; ZOTTOLA, E. A.; GRAVANI, R. B. Incidence of *Listeria monocytogenes* in market samples of fresh and frozen vegetables. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 53, p. 1238-1240, 1988.
- PHAN-THANH, L.; MAHOUI, F.; ALIGÉ, S. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. **Int. J. Food Microbiol.**, v.55, p.121-126, 2000.
- PICHI, V. ; RAMOS e SILVA, E.O.T.; SOUZA, S.L.P. et al. Isolamento e identificação de *Listeria spp.*, em quartos dianteiros de bovinos desossados. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.63, p.38-42, 1999.
- PIMENTA, F. C. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from foods. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.30, p. 356-361, 1999.
- PIMENTA, F. C.; FURLANETTO, S. M.P.; MAYER, L.W.; TIMENESTSKY, J.; SANTOS, M.A.A. dos. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from foods. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.30, n. 4, Oct./Dec., 1999. (SciELO Brazil).
- PIMENTEL, E.F.; DIAS, R.S.; RIBEIRO-CUNHA, M.; GLÓRIA, M.B.A. Avaliação da rotulagem e da qualidade físico-química e microbiológica de queijo ralado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 289-294, set./dez. 2002. (SciELO Brazil).
- PINE, L.; MALCON, G. B.; BROOKS, J. B.; DANESVAR, M. L. Physiological studies on the growth and utilization of sugar by *Listeria* species. **Can. Journal Microbiology**, v. 35, p 245-254, 1989.
- PINGULKAR, K.; KAMAT, A.; BONGIRWAR, D. Microbiological quality of fresh leafy vegetables, salad components and ready-to-eat salads: na evidence of inhibition of *Listeria monocytogenes* in tomatoes. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, Basingstoke, v.52, p.15-23, 2001.
- PINI, P. N.; GILBERT, R.J. A comparison of two procedures for the isolation of *Listeria monocytogenes* from raw chickens and soft cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.7, n.4, p.331-337, 1988.
- PINI, P.N.; GILBERT, R.J. The occurrence in the U.K. of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 6, n. 4, p. 317-326, 1988.
- 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**, London, v. 22, p. 79-85, 2005.
- PINTO, P. S.A. et al. Queijo minas: problema emergente da vigilância sanitária. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 10, n. 44, p.22–27, jul.-ago. 1996.
- PIRIE, J.H.H. *Listeria*: change of name for a genus of bacteria. **Nature**, London, n.145, p.264, 1940.

- PORTNOY, D. A.; CHAKRABORTY, T.; GOEBEL, W.; COSSART, P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 60, n. 4, p.1263 -1267, 1992.
- PORTNOY, D.A., JACKS, P.S., HINRICHS, D. J. Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 167, p. 1459-1471, 1988.
- PORTO, A.C.S. **Capacidade de sobrevivência e termorresistência de *Listeria monocytogenes* em salsichas formuladas, com e sem a adição de lactato de potássio, embaladas a vácuo, e armazenadas a -18°C, 4°C e 10°C**. 176f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- PORTO, E.; UBOLDI-EIROA, M.N. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in vegetables. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Des Moines, v.21, n.4, p.282-286, Apr. 2001.
- POTTER, M. E.; TAUXE, R. V. Epidemiology of foodborne diseases: tools and applications. **Rapp. Trimest. Statist. Sanit. Mond.**, v. 50, p. 24-29, 1997.
- QVIST, S.; SEHESTED, K.; ZEUTHEN, P. Growth suppression of *Listeria monocytogenes* in a meat product. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 24, n.2, p.283-293, 1994.
- RAINALDI, L.; LUCIANI, M.A.; PICCONI, F. behavior of *Listeria spp.* in meat products. **Italian Journal of Food Science**, Roma, v.3, n.4, p.291-296, 1991.
- RALOVICH, B. Detection and epidemiological typing of *Listeria* strains - Diagnostic methods for *Listeria* infections. **Acta Microbiologica Hungarica**, v. 40, n. 1, p.3-38, 1993.
- RAMESH, A. et al. Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. **Molecular and Cellular Probes**, v.16, p. 307-14, 2002.
- RAMOS, S.N.M.; COSTA, C.A. DA. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijo artesanal tipo coalho comercializado na cidade de Manaus – AM, Brasil. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 33, n. 4, p. 613-618, 2003.
- REA, M. C.; COGAN, T. M.; TOBIN, S. Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.73, p.331-336, 1992.
- REDDY, S.; MOJICA, B.; GUIDO, F.; HUANG, A.; VICENT, C.; BUGENHAGEN, A.; **Report**, Atlanta, v.47 n.50, p.1085-1086, Dec., 1998.
- RIJPENS, N. et al. Unidentified *Listeria*-like bacteria isolated from cheese. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 27, p.198-202, 1998.
- RIJPENS, N.; HERMAN, L. Comparison of selective and nonselective primary enrichments for the detection of *Listeria monocytogenes* in cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, p. 15-22, 2004.
- RIJPENS, N.P.; JANNES, G.; HERMAN, L.M.F. Incidence of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat chicken and turkey products determined by polymerase chain reaction and line probe assay hybridization. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 60, n. 5, p. 548-550, 1997.
- RIPIO, M T.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; suÁREz, M.; BREHM, K.; BERCHE, P.; V ÁZQUEZ-BOLAND, 1. A Transcriptional activation of virulence genes in wild-type strains of *Listeria monocytogenes* in response to a change in the extracellular medium composition. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, n. 147, p.371-384, 1996.
- ROBERTS, P. An improved cultural/ immunoassay for the detection of *Listeria* species in foods and environmental samples. **Microbiology Europe**, v.2, n.5, p.18-21, 1994.

- ROBISON, B.J. Immunodiagnosics in the detection of foodborne pathogens In: TORTORELLO, M.L.; GENDEL, S.M. **Food Microbiological Analysis**. New York: Marcel Dekker, 1997, p. 69-89.
- ROCOURT, J. Risks factors for listeriosis. **Food Control**, Oxford, , v.7, 4/5, p.195-202, 1996.
- ROCOURT, J. Taxonomie du genre *Listeria* et typage de *L. monocytogenes*. **Path. Diol.**, v. 44, n. 9, p.749-756, 1996.
- ROCOURT, J. Taxonomy of the genus *Listeria*. **Infection**, v.16, p.89-91, 1988.
- ROCOURT, J. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. (Ed). **Listeria, listeriosis and food safety**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1999. p.1-20.
- ROCOURT, J.; CATIMEL, B. Caractérisation biochimique des especes du genre *Listeria*. **ZbL Dakt. Hyg. A**, n. 260, p.221-231, 1985.
- ROCOURT, J.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. (Eds). **Food microbiology fundamental and frontiers**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press, 1997. p. 337-352.
- ROCOURT, J.; SCHRETTENBRUNNER, A; SEELIGER, H. P. R. Diflérenciation biochimique des groupes génomiques de *L. monocytogenes (sensu lato)*. **Ann. Microbiol.** (Inst. Pasteur), n. 134 A, p.65-71, 1983.
- RODRIGUES, D.A. ***Listeria sp e Listeria monocytogenes em indústria processadora de nuggets de frango: estudo de ocorrência e avaliação de metodologias de análise.*** 104 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos), Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- RODRIGUES, D.A.; FRANCO, B.D.G.de M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T. Avaliação da eficiência de três ágares seletivos no isolamento de *Listeria monocytogenes*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, supl, dez. 2003. (SciELO Brazil).
- 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
- RORVICK, L.M.; YNDESTAD, M. *Listeria monocytogenes* i foods in Norway. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.13, n.2, p. 97-104, June 1991.
- ROSAS, C. de O.; CARDARELLI, P.; WARNKEN, M.; MEDEIROS, V.; MEDEIROS, L.; MACHADO, M.E. **Isolamento e caracterização sorológica de *L. monocytogenes* isolados a partir de corte.** [Rio de Janeiro]: [FIOCRUZ/INCQS/Microbiologia], [2002].
- ROSENOW, E. M.; MARTH, E. H. Growth of *Listeria monocytogenes* in skim, whole and chocolate milk, and in whipping cream during incubation at 4, 8,13 and 35°C. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 50, p.452-459, 1987.
- ROSSEN, L. et al. A rapid polymerase chain reaction (PCR)-based assay for the identification of *Listeria monocytogenes* in food samples. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 14, p. 145- 152, 1991.
- ROSSO, L. et al. Simple relationship between acid dissociation constant and minimal pH for microbial growth in laboratory medium. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.35, p.75-81, 1997.
- ROWAN, N.J. et al. Virulent rough filaments of *Listeria monocytogenes* from clinical and food samples secreting wild-type levels of cell-free p60 protein. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.38,

n.7, p.2643-2648, July 2000.

RUDOLF, M.; SCHERER, S. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 63, p. 91-98, 2001.

RUPPENTHAL, R. D. **Aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico clínico**. 67f. Monografia (Curso de Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

RYSER, E. T. ; MARTH, E. H. Occurrence of *Listeria* in foods: milk and dairy foods. In: MILLER, A.J.; SMITH, J. L.; SOMKUTI, G.A. (Eds.). **Topics in industrial microbiology: foodborne listeriosis**. London: Elsevier, 1990. Cap. 23, p.151-163.

RYSER, E. T.; MARTH, E. H. **Listeria, listeriosis, and food safety**. New York: Marcel Dekker, 1991. 631 p.

RYSER, E.T. Foodborne Listeriosis. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. (Eds.). **Listeria, Listeriosis and Food safety**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1999. Cap.10, p. 299-358.

RYSER, E.T.; DONNELLY, C. W. *Listeria*. In: DOWNES, F. P.; KEITH, I. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Assoc., 2001. p.343-356.

RYSER, E.T.; MARTH, E. H. Listeriosis in humans. In: RYSER, E.T.; MARTH, E. H. (Eds.). **Listeria, listeriosis and food safety**. New York: Marcel Dekker, 1991. p.45-65.

SAGOO, S.K.; LITTLE, C.L.; MITCHELL, R.T. Microbiological quality of open ready-to-eat salad vegetables: effectiveness of food hygiene training of management. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.66, n.9, p.1581-1586, 2003b.

SAGOO, S.K.; LITTLE, C.L.; WARD, L.; MITCHELL, R.T. Microbiological study of ready-to-eat. salad vegetables from retail establishments uncovers a national outbreak of salmonellosis. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.66, n.3, p.403-409, 2003a.

SALVATORI, R.U.; BESSA, M.C.; CARDOSO, M.R. de I. Qualidade sanitária de embutidos coletados no mercado público central de Porto Alegre – RS. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 4, p. 771-773, jul./ago. 2003.

SAMPATHKUMAR, B.; XAVIER, I. L.; YU, L.S.L.; KHACHATOURIANS, G.G. Production of Listeriosyn O by *Listeria monocytogenes* (Scott A) under heat-shock conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 48, p.131–137, 1999.

SANDERY, M.; STINEAR, T.; KAUCNER, C. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in environmental waters by PCR. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 80, n. 3, p. 327–332, March, 1996.

SANTOS, E. S.; CARVALHO, E. P. Presença de *Bacillus megaterium* em leite pasteurizado resfriado inoculado com *Pseudomonas fluorescens*. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n.78/79, p.63-67, nov.-dez., 2000.

SARGONI, A. E.; FRANCO, M. A.; TORRES, R. A. Viabilidad y multiplicación de *Listeria monocytogenes* cepa Murray frente a antimicrobianos de usos en medios seletivos. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 39-46, jan.-mar., 1986.

SASAHARA, K. C.; ZOTTOLA, E. A. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 56, n.112, p.1022-1028, 1993.

- SCHAACK, M.M.; MARTH, E.H. Behavior of *Listeria monocytogenes* in skim milk during fermentation with mesophilic lactic starter cultures. **J. Food. Prot.**, v. 51, n.8, p.600-606, 1988.
- SCHAFFNER, E.; MUHLEMANN, M.; SPAHR, U.; SCHALLIBAUM, M. Quantification of the probability of milk contamination by *Listeria monocytogenes* during manufacture of hard cheese. **Rev. Epidemiol. Sante Publique**, v. 51, n. 5, p. 493-503, Oct. 2003.
- SCHEU, P. M.; BERGHOF, K.; STAHL, U. Detection of pathogenic and spoilage microorganisms in food with the polymerase chain reaction. **Food Microbiology**, v.15, p.13 -31.
- SCHLECH, W. F. Foodborne listeriosis. **Clin Infect. Dis., Chicago**, v.31, p.770-775, 2000.
- SCHLECH, W. F. Overview of listeriosis. **Food Control**, Oxford,, v.7, n.4/5, p.183-186, 1996.
- SCHLECH, W.F.; LAVIGNE, P.M.; BORTOLUSSI, R.A.; ALLEN, A.C.; HALDANE, E.V.; WORT, A.J.; HIGHTOWER, A.W.; JOHNSON, S.E.; KING, S.H.; NICHOLLS, E.S.; BROOME, C.V. Epidemic listeriosis – Evidence for transmission by food. **New Eng. J. Med.**, v.308, n.4, p.203 -8, 1983.
- SCHMIDT, U. Sliced, vacuum-packed frankfurter-type sausage: technological measures to inhibit the growth of listeriae. **Fleischwirtsch.**, Frankfurt, v. 75, n.6, p.804-807, 1995.
- SCHMIDT, U.; KAYA, M. Behaviour of *L. monocytogenes* in vacuum-packed sliced frankfurter-type sausage. **Fleischwirtsch.**, Frankfurt, v.70, n.11, p.1294-1295, 1990.
- SCHODER, D.; WINTER, P.; KAREEM, A.; BAUMGARTNER, W.; WAGNER, M. A case of sporadic ovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes* and its effect on contamination of raw milk and raw-milk cheeses produced in the on-farm dairy. **Journal Dairy Res.**, v. 70, n. 4, p. 395-401, Nov. 2003. (Abstract).
- SCHOKEN-ITURRINO, R.P. et al. Ocorrência de bactérias esporuladas dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* em amostras de leite longa vida. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.10, n.42, p.25–27, mar./abr. 1996.
- SCHUCHAT, A.; DEEVER, K.A.; WENGER, J.D.; PLIKAYTIS, B. D.; MASCOLA, L.; PINNER, R. W.; REIGOLD, A. L.; BROOME, C.V. Role of foods in sporadic listeriosis. I. Casecontrol study of dietary risk factors. **Journal American Medical Association**, Chicago, v. 267, p.2041-2045, 1992.
- SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C. V. Epidemiology of human listerioses. **Clinical Microbiology Review**, v.4, p.169-183, 1991.
- SCHWAB, J.P. **Listeria monocytogenes em queijo colonial artesanal comercializado em Porto Alegre**. 101 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente), Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Porto Alegre, RS, 1994.
- SCHWAB, J.P.; EDELWEISS, M.I.A. Identification of *Listeria monocytogenes* in human placentas and abortion species through immunohistochemical technique. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 39, n. 2, p. 111-114, Apr/June 2003.
- SCHWARZKOPF, A. *Listeria monocytogenes*: aspects of pathogenicity. **Pathologie Biologie**, v. 44, p. 770- 774, Nov., 1996.
- SCOTTER, S.L.; LANGTON, S.; LOMBARD, B.; LAHELLEC, C.; SCHULTEN, S.; NAGELKERKE, N., VELD, P.H. I.; ROLLIER, P. Validation of ISO method 11290 Part 2: enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 70, p. 121-129, 2001.
- SCOTTER, S.L.; LANGTON, S.; LOMBARD, B.; SCHULTEN, S.; NAGELKERKE, N., VELD, P.H. I.; ROLLIER, P.; LAHELLEC, C. Validation of ISO method 11290 Part I: detection of *Listeria*

monocytogenes in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 64, p. 295-306, 2001.

SEELIGER, H. P. R.; JONES, D. genus *Listeria*. In: SNEATH, P. H. A. (Ed). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9thed. Baltimore, USA: The Williams Wilkins Co., 1986. v. 2, p.1235-1245.

SEELIGER, H. P. R.; JONES, D. *Listeria*. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994. v. 2, p. 1235-1245.

SENEVIRATNA, P.; ROBERTSON, J.; ROBERTSON, I.D.; HAMPSON, D.J. *Listeria* species in foods of animal origin. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 67, p. 384, 1990.

SENEFF, A.M. **Pesquisa de toxina diarréica de *Bacillus cereus* isolados das amostras de alimentos envolvidas nos surtos, analisados pelo LACEN do Paraná no ano de 2006**. 44 p. Monografia (Especialização em Processamento e Controle de Qualidade em Carne, Leite e Ovos) – Departamento de Ciências dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras, 2007.

SERAFIM, A. et al. *Listeria spp.* em águas residuais de quatro indústrias de laticínios, localizadas nas cidades de Goiânia e Anápolis, Goiás. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.11, n. 50, p.39-41, 1997.

SERAFINI, A. B. et al. Isolamento de *Listeria spp.* de amostras de águas residuais de quatro indústrias de laticínios, localizadas nas cidades de Goiânia e Anápolis, Goiás. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 10, n. 46, p. 48–50, nov.-dez. 1996.

SERDELIDIS, D.; ABRAHIM, A.; SARIMVEI, A.; PANOULIS, C.; KARAIOANNOGLOU, P.; GENIGEORGIS, C. Temperature distribution and prevalence of *Listeria spp.* in domestic, retail and industrial refrigerators in Greece. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 34, p. 171-177, 1997.

SEVIL, A. E. et al. Production of monoclonal antibodies to *Listeria monocytogenes* and their application to determine the virulence of isolates from channel catfish. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.7, p.2827 – 2832, July, 1999.

SHAACK, M; MARTH E. Behavior of *Listeria monocytogenes* in skim milk during fermentation with mesophilic lactic starter cultures. **J Food Prot.**, v.51, n.8, p.600-606, 1988.

SHAHAMAT, M.; SEAMAN, A., WOODBINE, M. Influence of sodium chloride, pH and temperature on the inhibitory activity of sodium nitrite on *Listeria monocytogenes*. In: GOULD, G.W.; CORRY, J.E.L. Growth and survival in extremes of environment. London, Academic Press, 1980. p.227.

SHANK, F.R.; ELLIOT, E.L.; WACHSMUTH, I.K.; LOSIKOFF, M.E. US position on *Listeria monocytogenes* in foods. **Food Control**, Oxford, v. 7, n.4/5, p.229-234, 1996.

SHEEHAN, B.; KOCKS, C.; DRAMSI, S.; GOUIN, E.; KLARSFELD, A. D.; MENGAUD, J.; COSSART, P. Molecular and genetic determinants of the *Listeria monocytogenes* infectious process **Current Topics of Microbiology and Immunology** n. 192, p.187-216, 1994.

SHEIKH-ZEINODDIN, M.; PEREHINEC, T. M.; HILL, S. E.; REES, E.D. Maillard reaction causes suppression of virulence gene expression in *Listeria* Oxford, *monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, n. 61, p. 41-49, 2000.

SHEPARD, B. D.; GILMORE, M.S. Identification of aerobically and anaerobically induced genes in *Enterococcus faecalis* by random arbitrarily primed PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n.4, p. 1470-1476, Apr., 1999.

SILK, T. M.; ROTH, T. M. T.; DONNELLY, C.W. Comparison of growth kinetics for healthy and heat-injured *Listeria monocytogenes* in eight enrichment broths. **Journal of Food Protection**, v. 65, p.1333-1337, 2002.

- SILLIKER, J.H. New bacteria in the news: a special symposium *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, Champaign, v.40, n. 8, p.24, Aug. 1986.
- 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, p. 241-248, 2003.
- SILVA, J.A. As novas perspectivas para o controle sanitário dos alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.65, p.19-25, out. 1999.
- SILVA, M.C.D. da.; DESTRO, M.T.; HOFER, E.; TIBANA, A. Characterization and evaluation of some virulence markers of *Listeria monocytogenes* strains isolated from Brazilian cheeses using molecular, biochemical and serotyping techniques. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 63, p. 275-280, 2001
- SILVA, M.C.D. da; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, Ames, v.61, n. 3, p.354- 356, 1998.
- SILVA, M.C.D.; DESTRO, M.T.; HOFER, E.; TIBANA, A . Characterization and evaluation of some virulence markers of *Listeria monocytogenes* strains isolated from brazilian cheeses using molecular, biochemical and setotyping techniques. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.63, p.275–280, 2001.
- SILVA, M.C.D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, Ames v.61, n.3, p.354 –356., 1998.
- SILVA, M.C.D.; VILARDI, T.C.C.; TIBANA, A. Avaliação de métodos para a detecção de *Listeria* em queijos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 149-256, maio-jul., 1998.
- SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.P.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997.
- SILVA, W.P. da; LIMA, A.S. de; GANDRA, E.A.; ARAÚJO, M.R. de; MACEDO, M.R.P. de; DUVAL, E.H. *Listeria* spp. no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n.3, p. 911-916, mai./jun. 2004.
- SIZMUR, K.; WALKER, C.W. *Listeria* in prepacked salads. **Lanced**, London, v.1, n.8595, p.1167, 1988. [Letter].
- SKALKA, B.; SMOLA, J.; ELISCHEROVÁ, K. Hemolytic phenomenons under the cultivation of *L. innocua*. **Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A.**, n. 253, p. 559-565, 1983.
- SKALKA, B.; SMOLA, J.; ELISCHEROVÁ, K. Different haemolytic activities of *L. monocytogenes* strains determined on erythrocytes of various sources and exploiting the synergism of equi-factor. **Zbl. Veto Med. B.**, n. 29, p. 642-649, 1982.
- SKALKA, B.; SMOLA, J.; ELISCHEROVÁ, K. Routine test for in vitro differentiation of pathogenic and apathogenic *Listeria monocytogenes* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 503-507, 1982.
- SKOVGAARD, N.; MORGEN, C.A. Detection of *Listeria spp.* in faeces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.6, p.229-242, 1988.
- SKOVGAARD, N.; NORRUNG, B. The incidence of *Listeria spp.* in faeces of Danish pigs and minced pork meat. **International Journal of Food Microbiology**, Netherlands, v.8, n.1, p. 59-63, 1989.
- SLADE, P. J., COLLINS-THOMPSON, D. L.; FLETCHER, F. Incidence of *Listeria* species in Ontário raw milk. **Canadian Institute Of Food Science And Technology Journal**, v.21, n.4, p. 425-429, 1988.

- SLEATOR, R. D.; GAHAN, C. G.M.; ABEE, T.; HILL, C. Identification and disruption of BeetL, a secondary glycine betaine transport system linked to the salt tolerance of *Listeria monocytogenes* LO28. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.5, p.2078-2083, May 1999.
- SMITH, A. R. B.; ARCHER, D. L. Heat- induced injury in *Listeria monocytogenes*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 3, n.1, p.105-110, 1988.
- SMUHAROV Á P.; RUPRICH, J. Application of a chromogenic medium and the PCR method for the rapid confirmation of *L. monocytogenes* in foodstuffs. **J. Microbiol Med.**, n.41, p. 267-271, 2000.
- SOKOLOVIC, Z.; GOEBEL, W. Synthesis of listeriolysin in *Listeria monocytogenes* under heat shock conditions. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 1, p. 295-298, Jan., 1989.
- SOKOLOVIC, Z.; RIEDEL, J.; WUENSCHER M.; GOEBEL, W. Surface-associated, PrfA-regulated proteins of *Listeria monocytogenes* synthesized under stress conditions. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 2, p. 219-227, 1993.
- SOLANO-LÓPEZ, C.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Manchego and Chihuahua Mexican cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 62, p. 149-153, 2000.
- SOOD, S.K.; KAUR, J. PCR –based detection of *Listeria monocytogenes* in dairy foods. **Current Science**, v.71, n.6, p.449-456, Sept.1996.
- SORIANO, J.M.; RICO, H.; MOLTÓ, J.C.; MAÑES, J. *Listeria* species in raw and ready-to-eat foods from restaurants. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.64, n.4, p.551-553, 2001.
- SOUZA, R.A. **Incidência de *L. monocytogenes* em queijo tipo coalho artesanal comercializado à temperatura ambiente em Fortaleza - CE.** 78 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.
- SOUZA, V.M.; ALVES, V.F.; DESTRO, M.T.; MARTINIS, E.C.P.. Quantitative evaluation of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed surubim fish (*Pseudoplatystoma* sp). **Braz. J. Microbiol.** [online]., v. 39, n. 3, p. 527-528, 2008.
- STAINFIELD, J.T. et al. Potencial role of refrigerated milk packaging in the transmission of listeriosis and salmonellosis. **Journal of Food Protection**, Ames, v.50, n.9, p.730–732, Sept. 1987.
- STECCHINI, M.L.; TORRE, M. del; VENIR, E. Growth of *Listeria monocytogenes* as influenced by viscosity and water activity. , v. 96, n. 2, p. 181-187, Nov. 2004.
- STEWART, D.; GENDEL, S.M. Specificity of the Bax Polymerase Chain reaction system for detection of the food borne pathogen *Listeria monocytogenes*. **Journal of AOAC International**, v. 81, n.4, p.817-822, 1998.
- STONE, D. L. A survey of raw whole milk for *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*. **Journal of Dairy Science and Technology**, v. 22, n.3, p.247-249, 1987.
- STONE, D. L. A survey of raw whole milk for *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*. **New Zealand Journal of Dairy Science and technology**, Hamilton, v.22, p. 257-64,1987.
- SWAMINATHAN, B.; FENG, P. Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria. **Annual Review of Microbiology** , v.48, 401-426.
- SWAMINATHAN, B.; HAYES, P.S.; PRZYBYSZEWSKI, A. Evaluation of enrichment and planting media for isolating *Listeria monocytogenes*. **Journal Assoc. Off. Chemical**, v.71, p.664-668, 1988.

- SWANENENBURG, M. et al. Validation of ERIC PCR as a tool in epidemiologic research of *Salmonella* in slaughter pigs. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v 21. p. 141-4, 1998.
- TAKEUCHI, C. et al. Isolamento de *Listeria monocytogenes* de líquido cefalorraquidiano. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 34, n.1, p.101-107, jan., 1974.
- TANG, Y.-W.; PROCOP, G.W.; PERSING, D. H. Molecular diagnostics of infectious diseases. **Clinical Chemistry**, v. 43, n. 11, p. 20211-2038, 1997
- TAPPERO, J.W.; SCHUCHAT, A.; DEEVER, K.A.; MASCOLA, L.; WENGER, J.D. Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States. Effectiveness of prevention efforts? The listeriosis study group. **JAMA J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.273, p.1118-1122, 1995.
- TENOVER, F.C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.33, n.9, p.2233-39, Sept., 1995.
- TERPLAN, G.; SCHOEN, R.; SPRINGMEYER, W. *et al.* Vorkommen, verhalten und bedeutung von *Listeria* in milch und milchprodukten. **Arch. Lebensmittelhyg**, v.37, n.6, p.131-137, 1986.
- TERPLAN, G.; SCHOEN, R.; SPRINGMEYER, W.; DEGLE, I.; BECKER, H. Occurrence, behaviour and significance of *Listeria* in milk and dairy products. (Vorkommen, Verhalten und Bedeutung von Listerien in Milch und Milchprodukten). **Arch. Lebensmittelhyg.**, v. 37, p.131-137, 1986.
- THE OXOID manual. 6.ed. Basingstoke: Unipath, 1990. p. 133-134.
- THOMAS, E.J.G.; KING, R.; BURCHAK, J.; GANNON, V.P.J. Sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* in milk and ground beef with the polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p.2576-2580, 1991.
- TIWARI, N. P.; ALDENRATH, S.G. Occurrence of *Listeria* species in food and environmental samples in Alberta. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, Ottawa, v. 223, n 2/3, p.109-13, Jun, 1990b.
- TOBIA, M.B.; MENGONI, G.B.; PELION, H.S. *Listeria monocytogenes* e *Listeria sp* em produtos termoprocessados. **Revista Argentina de Microbiologia**, Buenos Aires, v.29, p.109-113, 1997.
- TOMPKIN, R.B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. **J.Food Prot.**, v. 65, p. 709-725, 2002.
- TORRES, K. ; SIERRA, S. ; POUTOU, R. ; CARRASCAL, A. ; MERCADO, M. Pathogenesis of *Listeria monocytogenes*, microorganism zoonotic emergent. **Rev.MVZ Cordoba**, v.10, n.1, p.511-543, Jan./Jun , 2005.
- TORTORA, G.D.J. et al. **Classificação de microrganismos**. 6.ed. Porto Alegre: ARTMED, 2000.
- TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999.
- TRUSCOTT, R. B.; MCNAB, W.B. Comparison of media and procedures for the isolation of *Listeria monocytogenes* from ground beef. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 51, p.626-628, 1988.
- TSIOTSIS, A.; SAVVAIDIS, I.; VASSILA, A.; KONTOMINAS, M.; KOTZEKIDOU, P. Control of *Listeria monocytogenes* by low-dose irradiation in combination with refrigeration in the soft whey cheese 'Anthotyros'. **Food Microbiology**, v. 19, p. 117-126, 2002.
- TWEDT, R. M. et al. Determination of the presence of *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products: IDF collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.77, n.2, p.395 – 402, 1994.

- TYLER, K.D.; WANG, G.; TYLER, S.D.; JOHNSON, W.M. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.35, n.2, p.339–346, Feb. 1997.
- UNNERSTAD, H.; BANNERMANN, E.; BILL, J. Prolonged contamination of a dairy with *Listeria monocytogenes*. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v.50, p.493 – 499, 1996.
- USER`S GUIDE. **BAX System PCR assay with aytinated detection for bacterial screening**. Wilmington, DE.: Du Pont Qualicon, 2000.
- UYTTENDAELE, M.; HOORDE, I. Van.; DEBEVERE, J. The use of immuno-magnetic separation (IMS) as a tool in a sample preparation meted for direct detection of *L. monocytogenes* in cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam , v. 54, p. 205-212, 2000.
- VAN DENVER, A.G.F. *Listeria monocytogenes*: um problema em leite e produtos lácteos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 13, n. 155, p.19-23, 1988.
- VAN NETTEN, P.; PERALES, I.; MOSSEL, D.A.A. An improved selective and diagnostic medium for isolation and counting of *Listeria spp.* in heavily contaminated foods. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.7, n.1, p.17-21, July 1988a.
- VAN NETTEN, P.; VAN DE VEN, A.; PERALES, I.; MOSSEL, D.A.A. A selective and diagnostic medium for use in the enumeration of *Listeria spp.* in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 6, p.187-188, 1988b.
- VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3thed. Washington, DC: American Public Health Association, 1218 p. 1992.
- VARABIOFF, Y. Incidence of *Listeria* in smallgoods. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.14, p.167-169, 1992.
- VARNAM, A. H.; EVANS, M.G. **Foodborne pathogens: a illustrated text**. London: Wolfe Publising, 1991
- VARNAN, A. H. **Consultant Microbiologist Southern Biological Reading. Food borne pathogens an illustrated text**. Mosby Year Book, 1991.
- VÁSQUEZ-BOLAND, J.A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.;VASSEUR, C.; BAVEREL, L.; HÉBRAUD, M.; LABADIE, J. Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, New York, v. 86, p.469-476, 1999.
- VÁSQUEZ-BOLAND, J.A. et al., *Listeria* patogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**. Washington, v. 14, n 3 p. 584-640, 2001.
- VASSUEUR, C.; BAVEREL, L.; HÉBRAUD, M.; LABADIE, J. Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n.3, p.469-476, Mar, 1999.
- VÁZQUEZ-BOLAND, J.A; DOMINGUEZ, L.; FERNANDEZ, J.F.; RODRIGUEZ-FERRI, E. F.; BRIONES, V.; BLANCO, M.; SUAREZ, G. Revision of the validity of CAMP tests for *Listeria* identification. Proposal of an alternative method for the determination of haemolytic activity by *Listeria* strains. **Acta Microbiologica Hungarica** , v. 37, n. 2 p. 201-206, 1990.
- VAZ-VELHO, M.; DUARTE, G.; GIBBS, P. Evaluation of mini-VIDAS rapid test for detection of *Listeria monocytogenes* from production lines of fresh to cold-smoked fish. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, p. 147-151, 2000.
- 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**, Amsterdam, v. 90, p. 349-356, 2004.

VLAEMYNCK, G.; MOERMANS, R. Comparison of EB and Fraser enrichment broths for the detection of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* in raw-milk dairy products and environmental samples. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 59, n. 11, p. 1172 –1175, 1996.

VLAEMYNCK, G.; MOERMANS, R. Comparison of EB and Fraser enrichment broths for the detection of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* in raw-milk dairy products and environmental samples. **Journal of Food Protection**, Ames, v.59, n.11, p.1172–1175, 1996.

VLAEMYNCK, G.M.; MOERMANS, R. Comparison of EB and fraser enrichment broths for the detection of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* in raw-milk dairy products and environmental samples. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 59, n. 11, p. 1172-1175, 1996.

VLAHOVIC, M.S.; PANTIC, D.; PAVICIC, M.; BRYNER, J.H. Transmission of *Listeria monocytogenes* from mother's milk to her baby and to puppies. **Lancet**, London, v. 2, p. 1201, 1988.

WAAK, E.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M.L. Comparison of the ISO and IDF methods for detection of *Listeria monocytogenes* in blue veined cheese. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 9, p. 149-155, 1999.

WAGNER, M. et al. The influence of cheese matrix, microbial flora and enrichment broths on the detection of *Listeria monocytogenes* by PCR and the Vidas assay®. **Milchwissenschaft**, v. 54, n.6, p.310 – 314, 1999.

WAGNER, M. et al. The influence of cheese matrix, microbial flora and enrichment broths on the detection of *Listeria monocytogenes* by PCR and the Vidas assay R. **Milchwissenschaft**, v. 54, n.6, p. 310–314, 1999.

WAGNER, M.; MADERNER, A.; BRANDL, E. Random amplification of polynorphic DNA for tracing and molecular epidemiology of *Listeria* contamination in a cheese plant. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 59, n.4, p. 384-389, 1996.

WAGNER, M.; MADERNER, A.; BRANDL, E. Random amplification of polynorphic DNA for tracing and molecular epidemiology of *Listeria* contamination in a cheese plant. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 59, n.4, p. 384-389, 1996.

WANG, C.; HONG, C. A rapid PCR-based hybridization assay for the detection of *Listeria monocytogenes* in channel catfish. **Food Microbiology**, London, v.16, p. 291-297, 1999.

WANG, R.F.; CAO, W.W.; CERNIGLIA, C.E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. **Journal of Applied Microbiology**, New York, v.83, p.727–736, 1997.

WANG, R.F.; CAO, W.W.; JOHNSON, M. G. 16Sr RNA-based probes and polymerase chain reaction method to detect *Listeria monocytogenes* cells added to foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.9, p. 2827-2831, Sept. 1992.

WARBURTON, D. W.; FARBER, J. M.; POWELL, C.; TIWARI, N. P.; READ, S. et al. Comparison of methods for optimum detection of stressed and low levels of *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, London, v. 9, p.127-145, 1992.

WATKINS, J.; SLEATH, K.P. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage sludge and river water. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.50, n.1, p.1-19, 1981.

WEBER, A.; BAUMANN, C.; POTEL, J.; FRIESS, H. Incidence of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in cheese. (Nachweis von *Listeria monocytogenes* und *Listeria innocua* in Käse). **Berl. Münch. Tierarztl. Wschr.**, v.101, p.373 -375, 1988.

WERNARS, K. et al. Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 70, p. 121-126, 1991. IGUAL AO ANTERIOR DELETAR.

WERNARS, K.; HEUVELMAN, C.J.; CHAKRABORTY, T.; NOTERMANS, S.H.W. Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 70, p. 121-126, 1991.

WHO. **Informal working group**. Geneva: WHO/EHE/FOS/88.S, 1988a. 18 p.

WIEDMANN, M. et al. Investigation of a listeriosis epizootic in sheep in New York State. **American Journal Veterinary Research**, v. 58, n. 7, p.733-737, July, 1997.

WIEDMANN, M. et al. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 7, p. 2707-2716, July 1997.

WIEDMANN, M.; BARANY, F.; BATT, C.A. Detection of *Listeria monocytogenes* with a nonisotopic polymerase chain reaction- coupled ligase chain reaction assay. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p.2743-2745, 1993.

WINDRANTZ, P.; ARIAS, M.L. Evaluation of the bacteriological quality of ice cream sold at San Jose, Costa Rica. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.50, n.3, p. 301-303, Sept. 2000.

WONG, H.C.; CHAO, W.L.; LEE, S.J. Incidence and characterization of *L. monocytogenes* in foods available in Taiwan. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p.3101-3104, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Foodborne listeriosis. **Bulletin of the World Health Organization**, New York, v.66, n.4, p.421-428, 1988.

XIAOMING, L. et al. Combined PCR and slot blot assay for detection of Salmonella and *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.56, n. 2/3, p.167-77, 2000.

YOUSEF, A. E.; MARTH, E. H. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of parmesan cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.73, p. 3351-3356, 1990.

YOUSEF, A.E.; RYSER, E. T.; MAARTH, E. H. Methods for improved recovery of *Listeria monocytogenes* from cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n.11, p.2643-2649, Nov. 1988.

ZEMSER, R B.; MARTIN, S. E. Heat stability of virulence-associated enzymes from *Listeria monocytogenes* SLCC 5764. **Journal of Food Protection**, Ames , v. 61, n. 7, p. 899-902, 1998.

ZHENG, G.; YAN, L. Z.; VEDERAS, J.C. et al. Genes of the sob-alb locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin subtilisin. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, n.23, p.7346-7355, Dec., 1999.