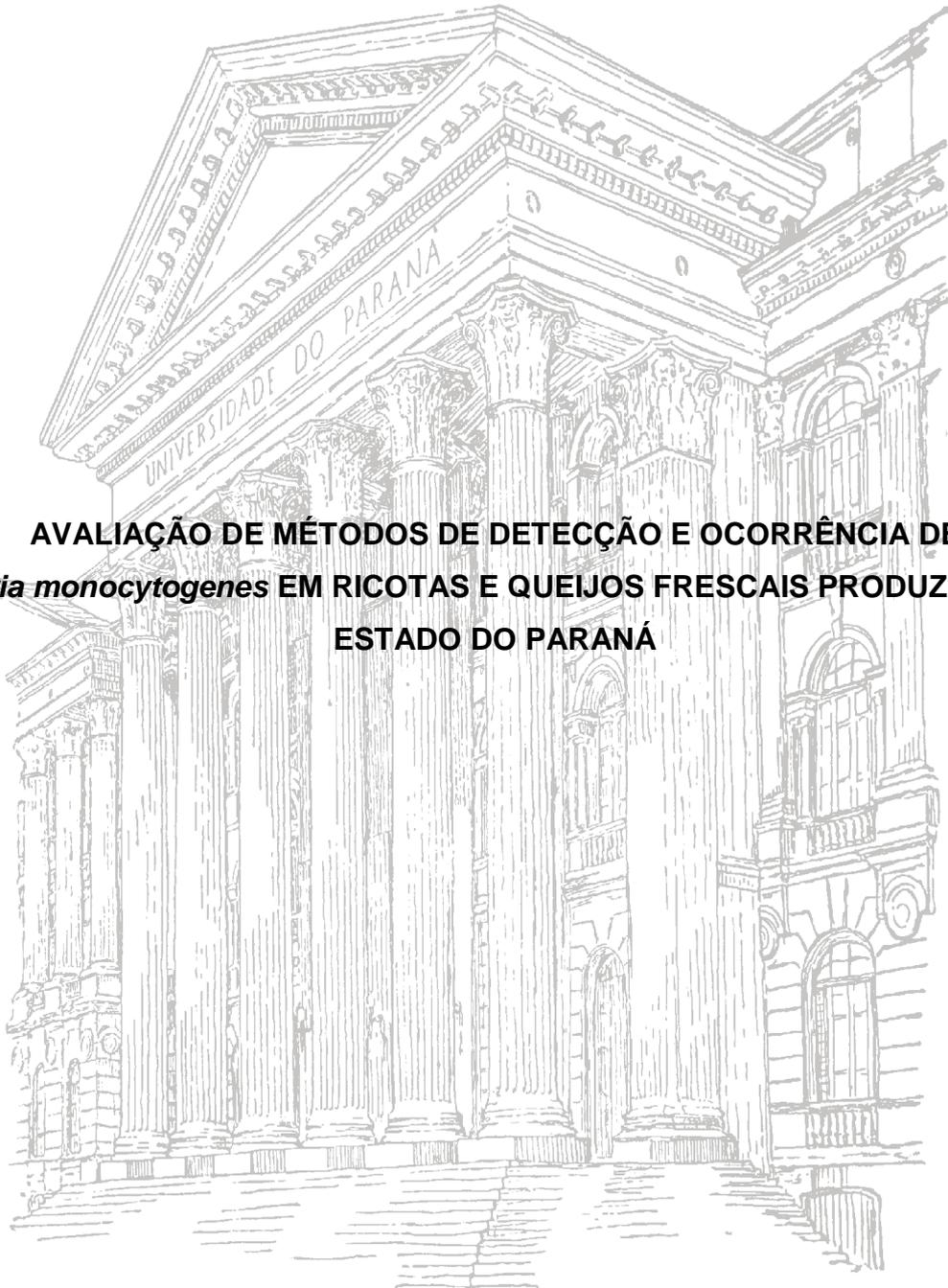


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**GISELE BERNARDI**



**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE DETECÇÃO E OCORRÊNCIA DE  
*Listeria monocytogenes* EM RICOTAS E QUEIJOS FRESCAIS PRODUZIDOS NO  
ESTADO DO PARANÁ**

**CURITIBA**

**2014**

GISELE BERNARDI

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE DETECÇÃO E OCORRÊNCIA DE *Listeria monocytogenes* EM RICOTAS E QUEIJOS FRESCAIS PRODUZIDOS NO ESTADO DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Insumos, Medicamentos e Correlatos da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Wanda Moscalewski Abrahão

**CURITIBA**

**2014**

Bernardi, Gisele

Avaliação de métodos de detecção e ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijos frescos e ricotas produzidos no Estado do Paraná / Gisele Bernardi – Curitiba, 2014.

83 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo

Coorientadora: Professora Dra. Wanda Moscalewski Abrahão

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2014.

Inclui bibliografia

1. Queijos. 2. Ricotas. 3. *Listeria*. 4. Mini-vidas. I. Pontarolo, Roberto. II. Abrahão, Wanda Moscalewski. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 576.163

# TERMO DE APROVAÇÃO

**GISELE APARECIDA BERNARDI**

**Título: "AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE DETECÇÃO E OCORRÊNCIA DE *Listeria monocytogenes* EM RICOTAS E QUEIJOS FRESCAIS PRODUZIDOS NO ESTADO DO PARANÁ"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.



Prof. Dr. Roberto Pontarolo  
Orientador



Prof. Dr. Carlos Eduardo Rocha Garcia  
Universidade Federal do Paraná



Dr<sup>a</sup>. Thais Martins Guimarães de Francisco  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 31 de março de 2014.

**Aos meus filhos, Luana e Diego  
minhas razões de viver.**

**À minha mãe,  
cujos motivos são impossíveis de  
numerar.**

**Ao meu querido pai  
saúde eterna.**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná por fomentar, construir e disseminar o conhecimento, contribuindo para a minha formação e desenvolvimento.

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

Ao orientador Roberto Pontarolo com quem tive os primeiros contactos neste mestrado com os massacres nas aulas de química orgânica, quem encaminhou meu projeto, por todos os ensinamentos, correções e sugestões neste trabalho e conselhos profissionais.

À querida Wanda que, mais do que coorientadora, tornou-se uma grande amiga, incentivadora e conselheira. Meus sinceros agradecimentos por toda a paciência e dedicação.

Aos servidores públicos da Secretaria de Estado da Saúde do Laboratório Central do Estado - LACEN, das secções de Microbiologia de Alimentos, Meios de Cultura, Reativos e Processamento de materiais, pelo acolhimento e apoio oferecido durante toda a parte experimental, sem os quais seria impossível a realização deste estudo.

À toda a equipe de professores do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelas maravilhosas aulas lecionadas.

Aos meus queridos filhos, Luana e Diego, por quem tenho vontade de lutar e vencer para poder proporcionar um futuro promissor. O sorriso deles é meu combustível a cada dia.

Ao meu pai, Nori, que, em memória, está sempre ao meu lado dando força e apoio em todos os momentos da minha vida, de quem sempre sentirei muita falta.

À minha mãe, Nilza, pela torcida, pelas orações, pelo apoio com as crianças e tudo mais que se possa imaginar.

Meu agradecimento ao Marcelo Ribaski, meu companheiro de todas as horas, pela paciência, compreensão e apoio, que está sempre torcendo pelo meu sucesso.

Ao meu querido irmão, Nosley, que ganhou mais responsabilidades e preocupações com a morte do pai, assumindo este papel desde então.

À minha irmã, Noely, que se tornou minha melhor amiga nos últimos anos.

À todas as pessoas, que mesmo não mencionadas, acrescentaram seus conhecimentos para a realização desta conquista, que me ajudaram a construir a escada que me trouxe até aqui.

"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende."

(Leonardo Da Vinci)

## RESUMO

Neste estudo foi realizada uma análise comparativa entre métodos de detecção para *Listeria* sp. em 106 amostras de queijos frescos e ricotas produzidos no estado do Paraná. Avaliou-se a ocorrência de *Listeria* sp. comparando os resultados obtidos das análises realizadas por metodologia convencional (método ISO 11290-1) com os resultados obtidos por sistema de análise qualitativa imunoenzimática automatizada (mini-VIDAS LIS®, mini-VIDAS LMO2® e mini-VIDAS LDUO®). A ocorrência de *Listeria* sp. foi de 11,3%, sendo 4,7% *L. monocytogenes*, 3,8% *Listeria seeligeri*, 1,9% *Listeria ivanovii* e 0,9% *Listeria innocua*. Entre as 26 marcas analisadas, 6 delas apresentaram alguma amostra contaminada. O maior número de amostras contaminadas sofria inspeção municipal e o menor número de amostras contaminadas sofria inspeção federal. A maioria das amostras contaminadas vieram da 11ª regional de saúde (Campo Mourão). Em avaliação comparativa entre os métodos que identificam o gênero *Listeria* (convencional, mini-VIDAS LIS® e LDUO-LIS®) o método convencional foi o sistema que apresentou maior número de resultados positivos (11 amostras), seguido do sistema mini-VIDAS LIS® (8 amostras) e o mini-VIDAS LDUO-LIS® (6 amostras). Em relação aos métodos que identificam *Listeria monocytogenes* (convencional, mini-VIDAS LMO2® e LDUO-LMO®) o método convencional foi capaz de detectar todas as amostras com *Listeria monocytogenes*. O sistema mini-VIDAS LMO2® resultou positivo para 4 amostras e o mini-VIDAS LDUO-LMO® detectou 2 amostras positivas. Todos os métodos avaliados neste estudo obtiveram 100% de especificidade. A sensibilidade foi de 92,3% para o método convencional na identificação do gênero *Listeria* e 100% na identificação de *Listeria monocytogenes*. Para os demais sistemas, a sensibilidade foi 75% para o mini-VIDAS LIS®, 83,3% para o mini-VIDAS LMO2®, 66,7% para o mini-VIDAS LDUO-LIS® e 62,5% para o mini-VIDAS LDUO-LMO®. Com base nos resultados encontrados sugere-se a utilização do sistema VIDAS LIS® para triagem em amostras de alimentos, uma vez que seus resultados são obtidos dentro de 2 dias e os produtos podem ser liberados para comercialização. Como as metodologias de análise do sistema VIDAS LIS® e LMO2® são semelhantes (mesmos caldos de enriquecimentos e temperaturas de incubação), sugere-se a utilização do VIDAS LMO2® somente para as amostras positivas pelo sistema LIS® reduzindo custo de insumos. Quanto ao sistema VIDAS LDUO® observou-se resultados pouco inferiores ao LIS® e LMO2® sendo que a maior desvantagem é a necessidade de caldo de enriquecimento diferente dos demais métodos aumentando o custo para o laboratório. Por se tratar de produto recente no mercado existem poucos trabalhos publicados para comprovar sua efetividade. A análise efetuada neste trabalho evidencia a ocorrência de falhas no processo de fabricação de queijos frescos e ricotas por parte de alguns produtores, representando grande risco à saúde do consumidor. Evidencia também que a rigidez no sistema de inspeção afeta diretamente a qualidade do produto final.

Palavras chaves: Queijos, ricotas, *Listeria*, sistema mini-VIDAS.

## ABSTRACT

In this study a comparative analysis was conducted among methods of detecting *Listeria* sp. in 106 samples of frescal cheese and ricotta produced in the state of Paraná, Brazil. It was evaluated the occurrence of *Listeria* sp. comparing the results achieved to the analyzes performed by conventional methodology (method ISO 11290-1) with results obtained through the automated immunoenzymatic qualitative system of analysis (mini-VIDAS LIS®, mini-VIDAS LMO2® and mini-VIDAS LDUO®). The occurrence of *Listeria* sp. was 11,3%, of which 4,7% *L. monocytogenes*, 3,8% *Listeria seeligeri*, 1,9% *Listeria ivanovii* and 0,9% *Listeria innocua*. Among the 26 brands analyzed, 6 of them presented some contaminated sample. The largest number of contaminated samples suffered from municipal inspection and the lowest number of contaminated samples suffered from federal inspection. Most of the contaminated samples came from the 11th regional health (Campo Mourão). Through a comparative evaluation between the methods that identify the genus *Listeria* (conventional, mini-VIDAS LIS® and LDUO-LIS®) the conventional method was the system that presented the highest number of positive results (11 samples), followed by mini-VIDAS LIS® system (8 samples) and the mini-VIDAS LDUO-LIS® (6 samples). Regarding the methods that identify *Listeria monocytogenes* (conventional, mini-VIDAS LMO2® and LDUO-LMO®) the conventional method was able to detect all samples with *Listeria monocytogenes*. The mini-VIDAS LMO2® system resulted positive for 4 samples and the mini-VIDAS LDUO-LMO® detected 2 positive samples. All methods evaluated in this study obtained 100% of specificity. The sensitivity was 92,3% for the conventional method in the identification of the genus *Listeria* and 100% for the identification of *Listeria monocytogenes*. For the other systems, the sensitivity was 75% for the mini-VIDAS LIS®, 83,3% for the mini-VIDAS LMO2®, 66,7% for the mini-VIDAS LDUO-LIS® and 62,5% for the mini-VIDAS LDUO-LMO®. Based on the results found it is suggested the usage of the mini-VIDAS LIS® system for screening of food samples, since the results are obtained within 2 days and the product can be released for sale. As the analysis methodologies of the VIDAS LIS® and LMO2® system are similar (same enrichment broth and incubation temperatures), it is suggested the usage of the VIDAS LMO2® only for the positive samples through LIS® system, reducing input costs. As for the VIDAS LDUO® system it was observed results slightly lower than LIS® and LMO2®, given the greatest disadvantage of the need for enrichment broth, different from other methods, increasing the cost for the lab. Since it is a recent product on the market, there are few published studies to prove its effectiveness. The analysis performed in this study demonstrates the occurrence of flaws in the frescal cheeses and ricotta fabrication process by some of the producers, representing great risk to the consumer health. It also shows that the stiffness in the inspection system directly affects the quality of the final product.

Key words: Cheeses, ricottas, *Listeria*, mini-VIDAS system.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	<i>Listeria</i> sp. NA COLORAÇÃO DE GRAM .....	24
FIGURA 2-	COLÔNIAS DE <i>Listeria monocytogenes</i> EM AGAR PALCAM .....	39
FIGURA 3-	COLÔNIAS DE <i>Listeria monocytogenes</i> EM AGAR ALOA.....	41
FIGURA 4-	SISTEMA REAGENTE COMERCIAL API <i>Listeria</i> UTILIZADO PARA IDENTIFICAÇÃO DE <i>Listeria</i> .....	42
FIGURA 5-	EQUIPAMENTOS VIDAS® E MINI-VIDAS® (BIOMERIEUX) .....	43
FIGURA 6-	BARRETE E CONE UTILIZADOS NO EQUIPAMENTO VIDAS E MINI-VIDAS.....	44
FIGURA 7-	REAÇÃO DA METODOLOGIA ELFA NA BARRETE.....	44
FIGURA 8 -	DIVISÃO ADMINISTRATIVA DA SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO PARANÁ SEGUNDO AS REGIONAIS DE SAÚDE (RS). EM DESTAQUE A 1ª, 2ª, 10ª, 11ª e 21ª RS PARTICIPANTES DO PROGRAMA DE COLETAS .....	50
FIGURA 9-	FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO DO MÉTODO ISO 11290-1	54
FIGURA 10-	FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO DO MÉTODO MINI-VIDAS LIS, LMO2 E LDUO.....	58
FIGURA 11-	FÓRMULA PARA AVALIAÇÃO DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DE MÉTODOS DE DETECÇÃO.....	61
FIGURA 12-	RESULTADO DAS ANÁLISES DE QUEIJOS (77 unidades) E RICOTAS (29 unidades) PARA O GÊNERO <i>Listeria</i> .....	67
FIGURA 13-	COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS CONTAMINADAS SEGUNDO O TIPO DE INSPEÇÃO.....	68
FIGURA 14-	COMPARAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO EM RELAÇÃO ÀS	

MARCAS ANALISADAS.....	69
FIGURA 15- AMOSTRAS CONTAMINADAS E NÃO CONTAMINADAS AGRUPADAS POR REGIONAL DE SAÚDE .....	69

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1- SURTOS DE LISTERIOSE ASSOCIADOS À INGESTÃO DE QUEIJOS NO PERÍODO DE 1983-2014.....	34
QUADRO 2- DESCRIÇÃO DOS DIFERENTES PROTOCOLOS DO MÉTODO CONVENCIONAL.....	38
QUADRO 3- AMOSTRAS POSITIVAS PARA <i>Listeria</i> sp. CONSIDERANDO MARCA, TIPO DE INSPEÇÃO, MUNICÍPIO DE PROCEDÊNCIA E DIFERENTES MÉTODOS DE DETECÇÃO .....	63
QUADRO 4- AMOSTRAS POSITIVAS PARA <i>Listeria</i> sp. CONSIDERANDO OS DIFERENTES MÉTODOS DE DETECÇÃO.....	71
QUADRO 5- RESULTADOS DA PESQUISA DE <i>Listeria</i> EM AMOSTRAS DE QUEIJOS E RICOTAS DE DIFERENTES MARCAS PRODUZIDOS NO ESTADO DO PARANÁ UTILIZANDO DIFERENTES MÉTODOS	72
QUADRO 6- RESULTADOS DA PESQUISA DE <i>Listeria monocytogenes</i> EM AMOSTRAS DE QUEIJOS E RICOTAS DE DIFERENTES MARCAS PRODUZIDOS NO ESTADO DO PARANÁ UTILIZANDO DIFERENTES MÉTODOS .....	73

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS NALISADAS.....	62
TABELA 2- DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS CONTAMINADAS.....	70
TABELA 3- VALORES FALSO-POSITIVOS E FALSO-NEGATIVOS CONSIDERANDO OS RESULTADOS OBTIDOS PELOS DIFERENTES MÉTODOS UTILIZADOS PARA IDENTIFICAR O GÊNERO <i>Listeria</i> .....	73
TABELA 4- VALORES FALSO-POSITIVOS E FALSO-NEGATIVOS CONSIDERANDO OS RESULTADOS OBTIDOS PELOS DIFERENTES MÉTODOS QUE IDENTIFICAM <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> .....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AIDS</b>	Síndrome da Imunodeficiência Humana
<b>AFNOR</b>	<i>Association Française of Normalisation</i>
<b>ALOA TM</b>	Agar <i>Listeria</i> de acordo com Ottaviani e Agosti
<b>AOAC</b>	<i>Association of Analytical Chemists</i>
<b>API</b>	<i>Analytab Products INC.</i>
<b>BAM</b>	<i>Bacteriological Analytical Manual</i>
<b>BLEB</b>	Caldo de enriquecimento de <i>Listeria</i> tamponado
<b>BPW</b>	Água peptonada tamponada
<b>BPF</b>	Boas Práticas de Fabricação
<b>CAM</b>	VIDAS <i>Campylobacter</i> ®
<b>CAMP</b>	Christie, Atkins e Munch-Petersen
<b>CDC</b>	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
<b>DTA</b>	Doenças Transmitidas por Alimentos
<b>ECO</b>	VIDAS <i>E. coli</i> O157®
<b>ELFA</b>	<i>Enzyme-Linked Fluorescent Assay</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FSANZ</b>	<i>Food Standards of Australian e New Zeland</i>
<b>FSIS</b>	<i>Food Safety and Inspection Service</i>
<b>ICE</b>	VIDAS Immuno-Concentration <i>E. coli</i> O157®
<b>ICS</b>	VIDAS Immuno-Concentration <i>Salmonella</i> ®
<b>ISO</b>	<i>International Organization for Standardization</i>
<b>LACEN - PR</b>	Laboratório Central do Estado do Paraná
<b>LDUO</b>	VIDAS <i>Listeria</i> DUO®
<b>LDUO-LIS</b>	Sistema VIDAS <i>Listeria</i> DUO parâmetro <i>Listeria</i> sp.
<b>LDUO-LMO</b>	Sistema VIDAS <i>Listeria</i> DUO parâmetro <i>Listeria monocytogenes</i>
<b>LIS</b>	VIDAS <i>Listeria</i> ®
<b>LMO2</b>	VIDAS <i>Listeria monocytogenes</i> 2®
<b>LMX</b>	VIDAS <i>Listeria monocytogenes</i> Xpress®
<b>LPM</b>	Litio-feniletanol-moxalactam
<b>LSX</b>	VIDAS <i>Listeria</i> Species Xpress®

<b>LX</b>	<i>Listeria Xpress</i>
<b>MLA</b>	Agar McBride <i>Listeria</i>
<b>MLG</b>	<i>Microbiology Laboratory Guidebook</i>
<b>MOPS-BLEB</b>	Caldo e enriquecimento de <i>Listeria</i> tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico
<b>MOX</b>	Agar Oxford Modificado
<b>MSRV</b>	Meio semi-sólido modificado Rappaport-Vassiliadis
<b>NMP</b>	Número Mais Provável
<b>OCLA</b>	<i>Oxoid chromogenic Listeria Agar</i>
<b>ONP, PNP</b>	o- e p-nitrofenóis
<b>OXA</b>	Agar Oxford
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PI-PLC</b>	Fosfatidilinositol-fosfolipase C específica
<b>PNA</b>	p-nitroanilina
<b>RS</b>	Regionais de Saúde
<b>SIF</b>	Serviço de Inspeção Federal
<b>SIM<sup>1</sup></b>	Sulfito Indol Motilidade
<b>SIM<sup>2</sup></b>	Serviço de Inspeção Municipal
<b>SIP</b>	Serviço de Inspeção do Paraná
<b>SLM</b>	VIDAS <i>Salmonella</i> ®
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>TGI</b>	Trato gastrointestinal
<b>TSA-YE</b>	Ágar Trypticase de Soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura
<b>UFC/mL</b>	Unidades Formadoras de Colônias/mL
<b>USDA - FSIS</b>	<i>United State of Department of Agriculture – Food Safety and Inspection Service</i>
<b>UVM</b>	Caldo Universidade de Vermont
<b>VIDAS</b>	<i>Vitek Immuno Diagnostic Assay System</i>
<b>VIP</b>	Ensaio visual de imunoprecipitação
<b>X-β-D-glu</b>	Cromogênico 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-glucopiranosídeo
<b>X-Glu</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glicopiranisídeo

## SUMÁRIO

<b>1- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1- OBJETIVO GERAL.....	21
1.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
<b>2 – REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
2.1- DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTA).....	22
2.2- GÊNERO <i>Listeria</i> .....	23
2.3- LISTERIOSE.....	25
2.4- INDÚSTRIA DE PRODUTOS LÁCTEOS - LEITE NO PARANÁ.....	28
2.5- TECNOLOGIA DE FABRICAÇÃO DE QUEIJOS FRESCAIS E RICOTAS.....	30
2.6- A LISTERIOSE E CONTAMINAÇÃO DE QUEIJOS.....	32
2.7- DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	35
2.7.1- Metodologia tradicional para pesquisa de <i>Listeria</i> .....	37
2.7.2- Utilização do sistema VIDAS® na análise de alimentos.....	42
<b>3 – MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
3.1- MATERIAL.....	49
3.1.1- Área de abrangência do estudo.....	49
3.1.2- Obtenção das amostras.....	50
3.1.3- Meios de cultura, soluções, reagentes e insumos.....	51

3.2- MÉTODOS DE ANÁLISE PARA PESQUISA DE <i>Listeria</i> sp.....	52
3.2.1- Preparo das amostras.....	52
3.2.2- Realização da metodologia tradicional da cultura "in vitro".....	52
3.2.2.1- Enriquecimento primário.....	52
3.2.2.2- Enriquecimento secundário.....	53
3.2.2.3- Plaqueamento seletivo.....	53
3.2.3- Realização do ensaio mini-VIDAS®(Biomerieux) para detecção de <i>Listeria</i> sp. em alimentos.....	54
3.2.3.1- Mini-VIDAS LIS® (Biomerieux).....	54
3.2.3.2- Mini-VIDAS LDUO® (Biomerieux).....	55
3.2.3.3- Mini-VIDAS LMO2® (Biomerieux).....	56
3.2.4- Confirmatório das colônias típicas.....	58
3.2.5- Confirmatório de <i>Listeria</i> sp. pelo sistema API <i>Listeria</i> .....	59
3.2.5.1- Purificação das colônias suspeitas de <i>Listeria</i> spp.....	59
3.2.5.2- Preparo do inóculo .....	59
3.2.5.3- Preparação da câmara úmida .....	59
3.2.5.4- Distribuição do inóculo.....	60
3.2.5.5- Leitura e Interpretação da galeria.....	60
3.2.6- Indicadores usados para avaliação das metodologias utilizadas na pesquisa de <i>Listeria</i> sp.....	60

3.2.7-	Análise Estatística dos Dados.....	61
<b>4 -</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
4.1 -	OCORRÊNCIA DE <i>Listeria</i> spp. NOS QUEIJOS FRESCAIS E RICOTAS ANALISADOS.....	63
4.1.1-	Análise das amostras contaminadas com <i>Listeria</i> sp. quanto ao tipo de produto.....	66
4.1.2-	Correlação entre marca do produto, tipo de inspeção e contaminação...	67
4.1.3-	Amostras contaminadas considerando a região de origem.....	69
4.2 -	PESQUISA DE <i>Listeria</i> sp. PELOS DIFERENTES MÉTODOS.....	70
4.3-	COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS UTILIZADOS.....	71
<b>5-</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>77</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>

## 1 – INTRODUÇÃO

Apesar da utilização de diferentes técnicas para garantir a qualidade e a inocuidade de alimentos, as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) continuam sendo um problema de saúde pública (JAY, 2005).

Diversos micro-organismos podem causar DTA, contudo, a bactéria *Listeria monocytogenes* destaca-se devido a sua capacidade de sobreviver e proliferar em alimentos mantidos sob temperatura de refrigeração, além de se desenvolver em atmosferas modificadas devido a sua característica microaerófila (ROCOURT, 1999). Caracteristicamente esta bactéria possui ampla distribuição ambiental, embora sua faixa ótima de desenvolvimento seja entre 30 e 37°C, é favorecida pela capacidade de se desenvolver entre 0 e 44°C, podendo sobreviver em alimentos congelados. Tolerância a pHs extremos de 5 a 9, baixa atividade de água e concentrações de cloreto de sódio superiores a 10% (SILVA *et al.*, 2011).

A ricota, assim como os queijos tipo frescal, possuem alto teor de umidade, em geral de 70%, o que os torna bastante suscetíveis a contaminação e desenvolvimento microbiano, particularmente na etapa pós-tratamento térmico. Aliado a isto, fatores como temperatura de armazenamento e a possibilidade de contaminação das matérias-primas via transmissão ambiental podem, desta forma, comprometer a qualidade destes produtos, além de promoverem o desenvolvimento de patógenos como *Listeria monocytogenes* (ABRAHÃO, 2008).

A listeriose, patologia causada pela *Listeria monocytogenes*, tem sido responsável por casos de aborto, meningite e septicemia, acometendo preferencialmente gestantes, idosos, neonatos e pessoas imunodeprimidas. Em pessoas saudáveis os relatos de surtos têm evidenciado casos de gastroenterite (CRUZ *et al.*, 2009).

Devido à alta taxa de mortalidade nos casos graves, a *Listeria* é um agente que desperta atenção especial das autoridades governamentais responsáveis pelo controle sanitário e da comunidade científica da área de alimentos. Surto e casos de listeriose têm sido associados a diversos alimentos, tanto de origem vegetal como animal. Entre os causados por produtos lácteos, os queijos frescos e ricotas são considerados os de maior risco e já foram envolvidos em vários surtos (BORGES *et al.*, 2009).

A legislação brasileira em vigor reconhece a importância da pesquisa deste patógeno e estabelece o padrão de ausência de *Listeria monocytogenes* na porção de 25g de queijos de médio (36 a 45,9%), alto (46 a 54,9%) e muito alto teor de umidade (superior a 55%) (BRASIL, 2001).

A detecção de *Listeria* spp. é frequentemente realizada por meio de cultura, associada aos métodos bioquímicos de identificação. Esta técnica, conhecida como método convencional ou método clássico foi desenvolvida para a detecção deste patógeno em situações desfavoráveis como é o caso de alimentos com microbiota injuriada (BENETTI, 2009).

Além do método convencional, nos últimos anos várias alternativas têm sido propostas para a detecção de *Listeria* spp. em alimentos, dentre eles destacam-se as técnicas imunológicas como o sistema mini-VIDAS (Biomérieux) e os métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), devido a facilidade na identificação do agente, assegurando rapidez, sensibilidade e especificidade da técnica de análise (PERES *et al.*, 2010).

A escolha da metodologia a ser adotada na análise microbiológica de alimentos deve ser norteada pela precisão pretendida, custo, tempo de análise, aceitabilidade do método por órgãos oficiais e comunidade científica; operacionalidade, treinamento e qualificação do analista, disponibilidade e qualidade de reagentes, meios de cultura e outros suprimentos, disponibilidade de espaço no laboratório, entre outros (BENETTI, 2009).

O alto crescimento na área de produção de leite e produtos lácteos no estado do Paraná é um grande motivador desta pesquisa. Como forma de analisar a qualidade dos produtos produzidos o presente estudo busca contribuir com a saúde pública avaliando a inocuidade destes alimentos. Uma vez detectada a presença, bem como a incidência de *Listeria monocytogenes* em produtos lácteos, medidas de rastreamento poderão ser implantadas visando a detecção da fonte de contaminação e promovendo suporte para a Vigilância Sanitária e Epidemiológica, norteando ações de orientação, controle e prevenção. Além disso, espera-se que os dados encontrados neste estudo possibilitem uma forte correlação entre as metodologias, assim como, as informações obtidas expressem resultados confiáveis dentro de um curto espaço de tempo, viabilizando desta forma a precisão dos resultados emitidos.

### 1.1- OBJETIVO GERAL

- Avaliar os métodos de detecção (convencional ISO 11290-1 e mini-VIDAS) e a ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijos frescos e ricotas produzidos no estado do Paraná.

### 1.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar amostras de queijos e de ricotas do estado do Paraná obtidas a partir do programa estadual de coleta utilizando os métodos convencionais (ISO 11290-1) e mini-VIDAS (LIS, LMO2 e LDUO).
- Avaliar a contaminação de acordo com o tipo de produto, fabricante, tipo de inspeção e região de origem.
- Comparar os métodos de análise utilizados que identificam o gênero *Listeria* (convencional, VIDAS LIS e LDUO-LIS).
- Comparar os métodos de análise que identificam a espécie *Listeria monocytogenes* (convencional, VIDAS LMO2 e VIDAS LDUO-LMO).

## 2 – REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1- DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTA)

Doença Transmitida por Alimento é aquela atribuída pela ingestão de um alimento ou água contaminada por um agente infeccioso específico, ou pela toxina por ele produzida. DTA é um termo genérico, aplicado a uma síndrome geralmente constituída de anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia, acompanhada ou não de febre. Os sintomas digestivos, no entanto, não são as únicas manifestações dessas doenças, podendo ocorrer ainda afecções extra intestinais em diferentes órgãos e sistemas como: meninges, rins, fígado, sistema nervoso central, terminações nervosas periféricas e outros, de acordo com o agente envolvido. As DTA podem estar associada a casos de surtos (BRASIL, 2001; KIRK *et al.*, 2008 ; DE ALMEIDA, 2013).

Segundo o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), surto de DTA é o episódio em que duas ou mais pessoas apresentam doença semelhante após ingerirem alimentos de origem comum. A ocorrência de um surto de DTA caracteriza uma falha no controle da cadeia de produção do alimento (CVE, 2008; WELKER *et al.*, 2010).

Há surtos relacionados a alimentos, de grande potencial tanto em países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento. Mais de 200 doenças diferentes podem ser transmitidas através de alimentos ou água contaminados (KIRK *et al.*, 2008; DE ALMEIDA *et al.*, 2013).

As DTA são globalmente importantes devido a alta incidência e custos que impõem à sociedade. Conforme dados divulgados pelo Sistema Único de Saúde (SUS), no estado do Paraná, no ano de 2000, o governo gastou R\$ 1.870.000,00 somente com internações devido às DTA (DE ALMEIDA *et al.*, 2013).

Para a Vigilância em Saúde é fundamental a identificação de grupos e fatores de risco associados às DTA. O número de casos de DTA é difícil de estimar, porém o Ministério da Saúde aponta cerca de 8,8 mil doentes entre 2000 e 2013. A região com maior número de casos foi a Sudeste (39,8%) seguido pela região Sul (38,9%). Os alimentos mistos (lasanha, panqueca, pizza, nhoque, salgados, sanduiches, risotos, entre outros) foram os produtos principais envolvidos (SVS, 2013).

Em virtude da disseminação de patógenos no ambiente, o número de surtos relatados demonstra-se inferior ao esperado. Vários fatores provavelmente interferem nesta relação: subnotificação; o período de incubação de até 30 dias para alguns patógenos que dificulta a associação do quadro clínico com alimentos; a dificuldade de encontrar o alimento incriminado após a confirmação do caso, uma vez que o alimento contaminado foi consumido ou desprezado; a utilização de antibióticos no tratamento antes da coleta para análise microbiológica dificultando o isolamento do micro-organismo nos pacientes (BENETTI, 2009).

A investigação dos surtos de DTA é desafiadora. Os profissionais da área de saúde tem o dever de promover a notificação destes surtos buscando, desta forma, mudar a realidade atual onde nem a metade dos surtos são notificados. Cabe a esses profissionais, divulgar como e quando notificar a ocorrência destas enfermidades (SVS, 2014).

A Segurança Alimentar consiste no direito de todos ao acesso regular e permanente a alimentos de qualidade em quantidade suficiente, sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, tendo como base, práticas alimentares promotoras de saúde que respeitem a diversidade cultural e que seja ambiental, cultural, econômica e socialmente sustentáveis (CNSAN, 2006).

A garantia da saúde é expectativa da população, confiando assim na ação de regulação sanitária dos alimentos produzidos nas esferas industrial ou comercial visando proteção contra as doenças. Essa proteção depende dos produtores de alimentos que são responsabilizados por cumprimento às boas práticas de produção e nos requisitos para se garantir um produto saudável e livre de contaminantes; e de uma rápida detecção e controle de surtos, do conhecimento de seus agentes e fatores responsáveis pela doença (BRASIL, 2001).

## 2.2- GÊNERO *Listeria*

O gênero *Listeria* corresponde a um grupo de bactérias em forma de pequenos bacilos Gram-positivos curtos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, com extremidades arredondadas, medindo de 1,0 a 2,0 µm de comprimento por 0,5 µm de diâmetro que podem aparecer isolados, em cadeias

curtas ou formando agregados ou ainda dispostos em paliçadas (LAPENDA, 2010) (FIGURA 1).



FIGURA 1 - *Listeria* sp. NA COLORAÇÃO DE GRAM  
FONTE: LISTERIA (2014).

As bactérias do gênero *Listeria* apresentam motilidade a temperatura de 20-25°C com movimentos característicos de tombamento, e imóveis a 35°C. A motilidade pode ser observada quando inoculado por picada em agar semi-sólido onde desenvolve uma migração típica espalhando-se na parte superior do meio, 3 a 5 mm abaixo da superfície, matendo-se restrita à picada no fundo do tubo. Este tipo de migração produz um crescimento característico lembrando um guarda-chuva (DA SILVA *et al.*, 1998).

*Listeria* multiplica-se rapidamente na maioria dos meios bacteriológicos utilizados na rotina laboratorial. Quanto às características bioquímicas, bactérias desse gênero são: catalase positivos, oxidase negativos, hidrolisam a esculina e o hipurato de sódio, mas não hidrolisam a uréia, a gelatina e a caseína. Fermentam a glicose com produção de ácido láctico sem produção de gás, são indol e H<sub>2</sub>S negativo e apresentam reação positiva a provas de Voges Proskauer e vermelho de metila (SEELIGER, 1986). As colônias de *Listeria* são pequenas e circulares quando em meios de cultura claros e translúcidos que ao serem examinados sob luz oblíqua transmitida, apresentam-se com coloração azul esverdeada (BAHK e MARTH, 1990).

Apresentam crescimento na faixa de 0 e 44°C com temperatura ótima de 30 a 37°C, suportando repetidos congelamentos e descongelamentos. Podem crescer em pH variando entre 5 e 9, atividade de água ( $A_w$ ) mínima de 0,9 e toleram altas

concentrações de cloreto de sódio, sobrevivendo a concentrações de cloreto de sódio superiores a 10% (SILVA *et al.*, 2011).

As espécies reconhecidas são: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeliger*, *L. grayi* e *L. murrayi*. Algumas espécies são  $\beta$  hemolíticas em agar sangue e associadas como potencialmente patogênicas para humanos e animais sendo a hemolisina o principal fator de virulência (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri*) (LAPENDA, 2010).

A diferença entre as espécie baseia-se em testes de fermentação de carboidratos e produção de hemólise em agar sangue como o teste *Christie, Atkins* e *Munch-Petersen* (CAMP) que se baseia na formação de uma área retangular de hemólise acentuada ao semear um inóculo da colônia teste perpendicularmente a um inóculo de *Staphylococcus aureus*. Para a diferenciação das espécies hemolíticas (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri*) utiliza-se a fermentação de três açúcares: D-xilose, L-ramnose e  $\alpha$ -metil-D-manosídeo (KONEMAN *et al.*, 2001).

*L. monocytogenes* é a principal espécie patogênica a humanos e animais e *L. ivanovii* e *L. seeligeri* já foram relacionadas a casos de doenças em humanos (DESTRO, 2006).

### 2.3- LISTERIOSE

*Listeria monocytogenes*, agente causador da listeriose, é uma espécie bacteriana Gram-positiva que ocorre de forma ubíqua na natureza. É um dos poucos micro-organismos patogênicos que pode se multiplicar em substratos com baixa atividade de água, altas concentrações de NaCl e ampla faixa de pH (4,4 a 9,6) sendo relativamente resistente a acidez. Além disso, cresce a baixas temperaturas, inferiores ao ponto de congelamento sendo capazes de se multiplicar em alimentos refrigerados. Estas propriedades a favorece como um patógeno alimentar (FARBER *et al.*, 1991; SWAMINATHAN e GERNER-SMIDT, 2007).

*Listeria monocytogenes*, historicamente, tem sido uma das mais importantes, porém, menos reconhecidas bactérias transmitidas por alimentos. A bactéria tem recebido atenção aumentada devido à larga escala de surtos associados com produtos alimentares contaminados (NORRUNG *et al.*, 1999; WING, 2002).

Diversos alimentos têm sido envolvidos em casos esporádicos e surtos de listeriose, tais como leite cru ou pasteurizado, queijos, sorvetes, vegetais crus, embutidos de carne, frango cru e cozido, carne crua e peixes crus ou defumados. Entretanto, alguns grupos de alimentos são veiculadores mais importantes da doença. Entre eles, os produtos prontos para consumo estocados à temperatura de refrigeração e com vida de prateleira longa são considerados os de maior risco. Produtos lácteos têm sido associados a aproximadamente metade dos surtos de listeriose na Europa. Estes surtos estão ligados ao consumo de leite cru ou produtos feitos com leite não pasteurizado (LUNDÉN *et al.*, 2004; NORRUNG *et al.*, 1999).

*L. monocytogenes* é considerado um patógeno oportunista, uma vez que a ocorrência da infecção depende principalmente das condições imunológicas dos indivíduos afetados. Ocorre principalmente em pessoas pertencentes a certos grupos de risco, tais como mulheres grávidas, crianças, idosos e indivíduos imunodeprimidos como os submetidos à terapia prolongada com corticóides ou à quimioterapia, portadores de síndrome da imunodeficiência humana (AIDS), alcoólicos, diabéticos e os submetidos à diálise (BENETTI, 2009; CRUZ *et al.*, 2009).

Uma vez que os alimentos contaminados são as maiores fontes de transmissão do micro-organismo tanto nos surtos como nos casos esporádicos de listeriose, o trato gastrointestinal (TGI) é o principal ponto de entrada do patógeno e foco de colonização. A fim de colonizar o TGI, o micro-organismo deve sobreviver às condições adversas como a acidez estomacal, a alta osmolaridade e a presença de sais biliares no intestino delgado. Vários fatores influenciam o sucesso da colonização por *L. monocytogenes* no hospedeiro: presença de células *natural killers* e linfócitos T do sistema imune intestinal, integridade do epitélio intestinal, carga microbiana presente no alimento contaminado e grau de virulência das cepas (CRUZ *et al.*, 2009).

A hemolisina, principal fator de virulência da bactéria, provoca rompimento das membranas durante a infecção, especialmente aquelas formadas entre os

vacúolos fagocitários e os lisossomas, não permitindo, portanto a formação dos fagolisossomas, que poderiam destruir a bactéria por meio das hidrolases ácidas permitindo assim que a *Listeria* sobreviva e se multiplique dentro das células fagocitárias. As enzimas hidrolíticas, após a ruptura das membranas dos lisossomas, são liberadas e provocam a destruição dos macrófagos e monócitos (BENETTI, 2009).

A partir do TGI, *L. monocytogenes* pode ser responsável por duas formas clínicas de listeriose: infecção invasiva localizada ou sistêmica e infecção não invasiva limitada ao intestino (CRUZ *et al.*, 2009).

A maioria dos casos apresenta infecção invasiva localizada ou sistêmica, doença com risco de vida, em uma das três síndromes clínicas: listeriose materno-fetal (em torno de 25% dos casos de infecção invasiva podendo levar a abortos ou nascimentos prematuros) ou listeriose neonatal, infecção de corrente sanguínea e meningoencefalite em indivíduos imunodeprimidos. Além destas síndromes, a listeriose pode apresentar como uma infecção focal com um resultado de propagação hematogênica. Infecções focais mais comumente envolvem articulações do peritônio, endocárdio ou olhos. A dose infectante na listeriose invasiva não é conhecida mas pode ser baixa em indivíduos susceptíveis. A elucidação da epidemiologia da listeriose tem sido dificultada devido ao período de incubação prolongado da doença, frequentemente superior a 30 dias (SWAMINATHAN e GERNER-SMIDT, 2007).

A infecção não invasiva limitada ao intestino caracteriza-se por gastroenterite cujos sintomas comuns incluem febre, diarreia aquosa, náusea, dor de cabeça e dor articular e muscular. A doença ocorre tipicamente 24 horas após a ingestão de grande inóculo de bactéria e usualmente dura 2 semanas. Embora a diarreia antecedente tenha sido reportada em casos de listeriose invasiva, só recentemente que a *Listeria monocytogenes* foi estabelecida como um caso de gastroenterite aguda, autolimitada e febril em pessoas saudáveis. Pelo menos 7 surtos de gastroenterites nas quais a *L. monocytogenes* foi o patógeno mais provável já foram descritos. Isso mostra a importância de se considerar a *Listeria monocytogenes* como possível etiologia em surtos de gastroenterite febril quando se encontra negatividade na coprocultura tradicional (OOI e LORBER, 2005).

Outra manifestação clínica da doença cuja porta de entrada não se trata do TGI é a listeriose cutânea, uma infecção rara (0,1 a 1,1% das listerioses humanas) que, tipicamente se manifestam sem dor, sem prurido, autolimitada, localizada, com erupções papulopustular ou vesiculopustular em pessoas saudáveis. Na maioria dos casos é seguida de inoculação direta na pele de veterinários ou agricultores que são expostos a produtos animais de concepção. Menos comumente, as lesões de pele podem surgir de disseminação hematogênica em pessoas imunocomprometidas (GODSHAL *et al.*, 2013).

A gastroenterite por *Listeria*, assim como a listeriose cutânea são apresentações autolimitantes com sintomas inespecíficos sendo, portanto muito provavelmente subdiagnosticadas (SWAMINATHAN e GERNER-SMIDT, 2007).

A listeriose, embora seja rara (apenas 0,02% dos casos de DTA e incidência que varia entre 0,1 e 11,3/1.000.000 em diferentes países), é responsável por aproximadamente 28% das mortes resultantes dessa doença, sendo ainda a responsável pela maior taxa de hospitalização dentre as doenças de origem alimentar (SILVA *et al.*, 2011; SWAMINATHAN e GERNER-SMIDT, 2007).

O tratamento primário da listeriose humana é a associação de ampicilina a um aminoglicosídeo além de outros, em segunda escolha, representados por cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina e rifampicina. Portanto, cepas clínicas resistentes a cloranfenicol, eritromicina, streptomina, tetraciclina, vancomicina e trimetoprim já foram descritos recentemente (REIS *et al.*, 2011).

## 2.4- INDÚSTRIA DE PRODUTOS LÁCTEOS - LEITE NO PARANÁ

O leite é uma secreção da glândula mamária de mamíferos, de composição nutricional bastante rica, indispensável à alimentação de recém-nascidos humanos e animais. Contém componentes importantes para uma dieta saudável tais como água, proteínas, açúcares, sais minerais (especialmente o cálcio), gorduras e vitaminas (BEZERRA, 2008).

O Paraná é tradicionalmente um estado produtor de leite. O gosto pela bovinocultura de leite veio como herança da população europeia que se firmou no estado, consolidado pela estrutura fundiária, onde a prevalência de pequenas

propriedades é marcante. O Paraná tem aumentado de forma gradual o número de produtores e conseqüentemente a produção de leite tornando o estado que mais tem crescido neste ramo no Brasil (FAEP, 2012).

A produção de leite no Paraná expandiu 78% nos últimos 10 anos, crescimento de extrema relevância comparado ao Brasil cujo índice foi de 37%. Entre os fatores principais do contínuo crescimento está o forte aspecto socioeconômico que este ramo representa para o Estado, a melhoria genética dos rebanhos e a maior profissionalização na gestão das fazendas, sobretudo no que tange ao manejo e nutrição do rebanho. O desenvolvimento do CONSELEITE, conselho de iniciativa privada formada por 22 produtores de leite e 22 representantes das principais indústrias paranaenses de produtos lácteos (80% da produção), também é um grande responsável por este contínuo crescimento. Funcionando há mais de cinco anos o CONSELEITE trouxe maior estabilidade de preços e possibilidade de planejamento do setor (FAEP, 2012).

Grande volume de leite "in natura" produzido no Paraná é captado por indústrias de outros estados, principalmente Santa Catarina e São Paulo. Entre 2000 e 2006 o rebanho de vacas ordenhadas cresceu 20% e a produção de leite aumentou 25% em função da genética que prevalece no rebanho e do empenho dos produtores em buscar conhecimentos para alcançar melhores índices na atividade via condução correta dos fatores de produção (FAEP, 2012).

Segundo EMBRAPA (2012) o Paraná encontra-se em 3<sup>o</sup> lugar no "ranking" nacional com 3,6 bilhões de litros produzidos por ano perdendo apenas para Minas Gerais e Rio Grande do Sul. Assim o Paraná representa 11,7% da produção nacional e produtividade acima da média brasileira.

O Brasil é carente de informações estatísticas sobre a produção de lácteos segmentados por tipo de produto, levando estudiosos a utilizarem informações de organizações internacionais. Segundo números estatísticos do Serviço de Inspeção Federal (SIF), estima-se que do leite industrializado no Brasil em estabelecimentos sob este tipo de inspeção 6,3 bilhões de litros são destinados a fabricação de queijos, 4,9 bilhões para leite longa vida, 3,3 bilhões para leite em pó, 1,3 bilhão para leite pasteurizado e 2,8 bilhões para outros produtos lácteos. Entre os anos de 2005 e 2007 houve redução apenas na produção de leite pasteurizado em 4,1% enquanto cresceram a produção dos setores de queijo em 19,4%, leite longa vida em 1,8% e leite em pó em 8,4% (MILKPOINT, 2013).

O queijo paranaense possui qualidade reconhecida em todo o Brasil representando uma fatia importante para as indústrias paranaenses de produtos lácteos sendo que cerca de 30% é direcionado para a fabricação dos diversos tipos, desde a mussarela, o queijo mais comum e popular, de origem italiana, até o gouda, originária da Holanda, de paladar mais refinado (PARANÁ-ONLINE, 2013).

## 2.5- TECNOLOGIA DE FABRICAÇÃO DE QUEIJOS FRESCAIS E RICOTAS

Entre os derivados do leite, o queijo é um dos principais produtos, tendo, ademais, alta demanda de consumo. Trata-se de um concentrado protéico-gorduroso, obtido mediante coagulação do leite de alguns mamíferos pela adição de coalho ou enzimas coagulantes e/ou pelo ácido láctico produzido pela atividade de determinados micro-organismos presentes no leite ou adicionados intencionalmente; elimina-se o soro da coalhada por corte, aquecimento e/ou prensagem, dando-lhe forma em moldes (ORDONEZ, 2005).

O queijo minas frescal, tipicamente brasileiro, encontra-se entre os queijos mais consumidos no país. É produzido com leite de vaca pasteurizado; tem pouca acidez e baixa durabilidade - em torno de 9 dias sob refrigeração. É classificado como um queijo macio, semi-gordo e de alta umidade. Tem cor esbranquiçada e odor suave, característico. Apresenta massa crua, consistência mole e textura fechada. Normalmente é vendido na forma cilíndrica, com o peso variando em torno de 0,5 a 3 kg. O queijo acabado apresenta, em média 55% a 58% de umidade, 17% a 19% de gordura, teor de sal variando entre 1,4% e 1,6% e pH entre 5,0 e 5,3 (PERRY, 2004; EMBRAPA, 2012).

Sua produção compreende as seguintes etapas:

- **Pasteurização:** é a forma de garantir isenção de micro-organismos contaminantes prejudiciais à saúde, como bactérias e fungos. Trata-se de tratamento térmico obtido pelo aquecimento do leite à temperatura de 62 a 65°C por 30 minutos ou 72°C por 15 segundos; seguido de resfriamento imediato a 35°C.
- **Preparo do leite para coagulação:** são feitos os procedimentos necessários para coagular a caseína (principal proteína do leite) pela adição de fermento lácteo e coalho, dando origem à massa do queijo (coalhada).

- Tratamento da massa: é estabelecido pela determinação do ponto de corte a fim de facilitar a eliminação do soro.
- Agitação: etapa importante para preservar a alta umidade do queijo, característica do queijo minas frescal.
- Enformagem: necessária para dar ao queijo sua forma característica. Para esse procedimento, as fôrmas de plástico são ideais por permitirem fácil manuseio e limpeza, tem formato redondo e furos no fundo (do tipo coador), que permitem a saída do soro.
- Salga: o sal garante o desenvolvimento do sabor, o controle da umidade e a conservação do produto.
- Embalagem: geralmente, o queijo minas frescal é embalado em sacos plásticos. Nesse tipo de queijo, é comum a presença de soro na embalagem, decorrente do alto teor de umidade.
- Armazenamento: sob refrigeração para aumentar seu tempo de validade (BEZERRA, 2008).

Segundo o regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem animal - RIISPOA art. 610, a ricota fresca é o produto lácteo obtido da albumina do soro de queijos, adicionado de até 20% de leite do seu volume, tratado termicamente e tendo o máximo de três dias de fabricação. Deve apresentar formato cilíndrico, e peso variando entre 300 g a 1 Kg, apresentar crosta rugosa não formada ou pouco nítida, bem como consistência mole, não pastosa e friável, textura fechada ou com alguns buracos mecânicos e cor branca ou branco-creme, além de odor e sabor próprios (BRASIL, 1997).

O processamento da ricota engloba as etapas de mistura do soro de queijo com o soro do leite, ou apenas de um desses com leite fresco a 65°C, acidificação direta da mistura em temperaturas elevadas (85 a 90°C) e posterior repouso de aproximadamente 25 minutos para a promoção da precipitação das proteínas do soro e do leite (SANSONETTI, 2009). Sua coalhada, produto da coagulação gerada durante o processamento, sobrenada na superfície, e deve ser coletada delicadamente e depositada em fôrmas de polipropileno perfuradas para que o excesso de soro seja drenado, podendo ser elaborada com soros e leites caprinos, ovinos, bovino ou bubalinos (PIRISI *et al.*, 2011).

O aquecimento a altas temperaturas aplicado ao soro destrói a microbiota natural, incluindo bactérias ácido lácticas, que agem como antagonistas de micro-organismos patogênicos que poderiam alcançar o produto durante a manipulação, embalagem e armazenagem (GOVARIS *et al.*, 2001). Em adição, as características de alta umidade e pH geralmente elevados, também favorecem a suscetibilidade destes produtos aos agentes deteriorantes (DEL NOBILE *et al.*, 2009). Portanto, estes produtos devem ser cuidadosamente caracterizados quanto aos padrões de qualidade visando à proteção dos consumidores de adulterações e falsificações, bem como a garantia de qualidade nutricional e higiênico-sanitária (PINTADO *et al.*, 2001).

Tendo em vista o grande volume de soro de queijos produzido, e considerando o interesse do consumidor por produtos diferenciados, a elaboração de ricota representa uma alternativa promissora e viável para a utilização deste co-produto (HEICK *et al.*, 2010).

## 2.6- A LISTERIOSE E CONTAMINAÇÃO DE QUEIJOS

O queijo é um importante derivado do leite, apreciado tanto pelo seu valor nutritivo como pelo seu sabor, que atende aos mais exigentes paladares. No entanto, as condições de processamento, armazenamento e comercialização podem comprometer suas características organolépticas, bem como torná-lo impróprio para o consumo, em virtude da contaminação por micro-organismos responsáveis por toxinfecções alimentares (ARAÚJO *et al.*, 2001).

Queijos são produtos alimentares prontos para consumo que não sofrem nenhum tratamento antes de serem ingeridos. A contaminação destes produtos com patógenos pode ocorrer em vários estágios. Informações sobre as principais fontes de agentes patogênicos e os mecanismos pelos quais estes contaminam os alimentos são necessárias na cadeia leiteira a fim de que aja prevenção ou controle desta contaminação. Além disso, a necessidade de conhecimento sobre os vetores e sua rota de contaminação em produtos prontos para consumo e dados quantitativos de recontaminação para estabelecer com precisão a avaliação do risco microbiano são de extrema importância (KOSTA *et al.*, 2010).

Há vários casos de listeriose resultantes do consumo de queijos. Embora *L. monocytogenes* esteja muito difundida no ambiente, é considerada intolerante a temperaturas atingidas durante a produção da maioria dos tipos de queijos tais como cozimento e pasteurização. Portanto, a contaminação pós processo com cepas associadas com o ambiente de produção pode ocorrer. Além disso, vários estudos indicam que certas cepas de *L. monocytogenes* sobrevivem dentro do ambiente de produção e a persistência de tais cepas na planta de processamento de alimentos é de particular interesse devido ao potencial de atuar como foco contínuo de contaminação do produto processado (CAGRI-MEHMETOGLU *et al.*, 2011).

A confirmação de vários casos esporádicos e surtos de listeriose ocorridos no Canadá, Estados Unidos e Europa na década de 80 associados ao consumo, principalmente de queijos e de vegetais crus, levou a inclusão de *L. monocytogenes* na lista de patógenos causadores de DTA. A partir dessa década, um grande número de surtos e casos de listeriose vêm sendo relatados na literatura, muitos deles relacionados a leite e produtos lácteos (BORGES *et al.*, 2009). O QUADRO 1 apresenta casos de listeriose notificados no mundo no período de 1983 a 2014.

No Brasil, a listeriose humana é subdiagnosticada e subnotificada não havendo registros de casos transmitidos por alimentos. Porém, diversos trabalhos mostram a circulação de *L. monocytogenes* na espécie humana provocando infecções e revelando portadores assintomáticos (BARANCELLI *et al.*, 2011).

É possível supor que nas próximas décadas ocorra elevação destes números, apesar dos esforços das indústrias de alimentos e das autoridades, uma vez que o número de indivíduos susceptíveis e grupos vulneráveis na população tendem a crescer. Outro fator que pode contribuir para esta elevação é a demanda, por parte dos consumidores, de alimentos processados cada vez mais semelhantes ao produto "in natura" e com vida de prateleira mais longa (CRUZ *et al.*, 2009).

Uma importante ferramenta para o alcance de níveis adequados de segurança alimentar é o uso das Boas Práticas de Fabricação (BPF) que são definidas como um conjunto de regras, normas e atitudes, as quais, quando aplicadas ao manuseio de alimentos contribuem significativamente para garantir a qualidade do produto final (BEZERRA, 2008; FAEP, 2012).

Ano	Local	Invasiva / não invasiva	Nº de casos (mortes)	Tipo de queijo	Referência
1983-1987	Suíça	Invasiva	122 (31)	Queijo macio	Bille <i>et al.</i> , 1990; Büla <i>et al.</i> , 1995; Farber e Peterkin, 1991.
1985	EUA	Invasiva	142 (48)	Queijo fresco estilo mexicano	Anonymous, 1985; Linnan <i>et al.</i> , 1988.
1989-1990	Dinamarca	Invasiva	26 (6)	Queijo de mofo azul ou queijo duro azul	Jensen <i>et al.</i> , 1994.
1995	França	Invasiva	37 (11)	Queijo macio com leite cru	Goulet <i>et al.</i> , 1995; Rocourt <i>et al.</i> , 1997; Lundén <i>et al.</i> , 2004.
1997	França	Invasiva	14	Queijo macio	Jacquet <i>et al.</i> , 1998.
2000-2001	EUA	Invasiva	13	Queijo fresco estilo mexicano	Boggs <i>et al.</i> , 2001; MacDonald <i>et al.</i> , 2005.
2001	Suécia	Não invasiva	>120	Queijo fresco feito com leite cru	Carrique-Mas <i>et al.</i> , 2003; Danielsson-Tham <i>et al.</i> , 2004.
2001	Japão	Não invasiva	38	Queijo	Makino <i>et al.</i> , 2005.
2002	Canadá	Invasiva	47	Queijo	Pagotto <i>et al.</i> , 2006.
2002	Canadá	Invasiva	17	Queijo macio feito com leite cru	Gaulin <i>et al.</i> , 2003; Pagotto <i>et al.</i> , 2006.
2002	Canadá	Não invasiva	86	Queijo feito com leite pasteurizado	Pagotto <i>et al.</i> , 2006.
2003	EUA	Invasiva	13 (2)	Queijo fresco estilo mexicano	Carriedo, 2003; Swaminathan e Gerner-Smidt, 2007.
2005	Suíça	Invasiva	10 (3)	Queijo macio	Bille <i>et al.</i> , 2006
2008	Canadá	Invasiva	38 (2)	Queijo	MSSS, 2009.
2009	Áustria, Alemanha e República Tcheca	Invasiva	34 (8)	Queijo "Quargel"	Fretz <i>et al.</i> , 2010.
2014	EUA	Invasiva	8 (1)	Queijo fresco estilo mexicano	CDC, 2014.

QUADRO 1 - SURTOS DE LISTERIOSE ASSOCIADOS A INGESTÃO DE QUEIJOS NO PERÍODO DE 1983-2014

FONTE: DIRECTORATE (2011), CDC (2014).

## 2.7- DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial das DTA visa o esclarecimento de ocorrências de natureza epidemiológica e sanitária relacionada ao consumo de alimentos. A implementação combinada de ações tanto em nível governamental quanto na rede produtora e distribuidora de alimentos é de interesse das políticas públicas de saúde, beneficiando diretamente o público consumidor.

Garantir a qualidade higiênica dos alimentos é uma grande preocupação de autoridades sejam elas governamentais ou industriais. Para isso é necessário definir alguns critérios como o método de análise, sendo este essencial para se conduzir um controle de alimentos confiável e reprodutível (JADHAV *et al.* 2012).

A princípio, ensaios fenotípicos, bioquímicos e imunológicos, bem como métodos genotípicos são usados para detecção, diferenciação e identificação de *Listeria* spp. Tempo de análise, habilidade, objetividade ao avaliar resultados e custo consistentemente diferem entre estes métodos (LOMBARD *et al.*, 1996; GASANOV *et al.*, 2005).

Os métodos tradicionais para a detecção de *Listeria monocytogenes* em alimentos baseiam-se na utilização de meios de cultivos específicos para o isolamento de micro-organismos viáveis seguidos por testes confirmatórios bioquímicos e sorológicos. Estes métodos foram estabelecidos como oficiais por entidades regulamentadoras para os laboratórios de microbiologia de alimentos e estão descritos em publicações consideradas de referência, internacionalmente aceitas. Estas metodologias são extremamente trabalhosas, além de requerer condições rígidas de biossegurança em virtude da virulência deste agente, bem como o longo tempo para sua realização que leva em média de 5 a 10 dias (ZUNABOVIC *et al.*, 2012).

A busca por métodos rápidos está sendo cada vez mais intensa, particularmente na indústria, para que os alimentos liberados para comercialização sejam livres de contaminantes. A questão da vida de prateleira dos alimentos tem sido outra grande prioridade nas indústrias. Numerosos métodos estão atualmente sendo comercializados. O maior desafio na análise de alimentos é a interferência do teste por seus componentes. Devido a isso novos métodos tais como imunocaptura

foram desenvolvidos para purificar analitos de componentes inibitórios bem como aumentar a sensibilidade (GASANOV *et al.*, 2005).

Métodos de imunoenensaio são amplamente usados devido a sua simplicidade, moderado custo e análise simultânea de grande quantidade de amostras. Anticorpos alvo baseados em proteínas específicas de *Listeria monocytogenes* e utilização de substratos colorimétricos e fluorescentes no meio para detectar atividade dos fatores de virulência têm sido introduzidos para diferenciar entre espécies patogênicas e não patogênicas (LOMBARD *et al.*, 1996; GASANOV *et al.*, 2005).

Métodos moleculares são atualmente mais usados para identificação de cepas presuntivas e são baseados na detecção prévia do patógeno alvo presente em matrizes específicas. Para monitoramento de ambiente industrial, métodos dependentes de cultura permanecem aceitos e, em combinação com técnicas moleculares, obtém-se resultados acurados e compreensivos. Portanto técnicas moleculares usando segmentos de DNA permitem identificações mais rápidas porém, falta informação sobre a viabilidade, uma vez que a molécula de DNA tem boa estabilidade mesmo após a morte celular (ZUNABOVIC *et al.*, 2012).

Considerando a evolução da tecnologia de produção de alimentos no Brasil aliada ao aumento do comércio exterior, torna-se de fundamental importância a incorporação de novas técnicas para identificação de patógenos microbianos pelos laboratórios oficiais de controle de qualidade de alimentos.

Embora a dose mínima de infecção para causar listeriose seja pelo menos 100 UFC/g de alimento, a maioria dos países tem política de tolerância zero quanto a quantidade de *Listeria monocytogenes* em alimentos prontos para consumo devido às possíveis consequências severas da doença. Corpos regulatórios como o *Food and Drug Administration* (FDA), departamento de agricultura dos Estados Unidos (USDA) e *Food Standards* da Austrália e Nova Zelândia (FSANZ) não distinguem entre *Listeria* spp. uma vez que a presença de *Listeria* spp. não patogênica sugere o possível envolvimento de espécies patogênicas (JADHAV *et al.*, 2012).

A regulamentação europeia de critérios microbiológicos no gênero alimentício tem duas políticas para a presença de *Listeria monocytogenes* em produtos prontos para consumo: um para produtos destinados a lactentes e especialidades médicas a qual não permite sua presença em 25 g de alimento, e

outra que engloba os demais produtos aos quais permitem até 100 UFC/g do organismo durante sua vida de prateleira. Isto implica que a indústria requer técnicas robustas, sensíveis e reprodutíveis para detecção de *Listeria monocytogenes* em alimentos (JADHAV *et al.*, 2012).

A legislação brasileira não prevê limites de tolerância para a presença do micro-organismo em carnes e produtos cárneos. A Resolução nº 12 (BRASIL, 2001) somente estabelece a pesquisa de *L. monocytogenes* (ausência em 25g) para queijos de média (36 a 45,9%), alta (46 a 54,9%) e muito alta umidade (superior a 55%). Porém, tem-se observado que a presença desse micro-organismo no ambiente de processamento de alimentos é inevitável, por isso o controle do patógeno deve ser realizado, essencialmente, nos pontos de origem da matéria-prima, através de medidas que minimizem a contaminação (VECCHIA *et al.*, 2011).

#### 2.7.1- Metodologia tradicional para pesquisa de *Listeria*

A metodologia convencional para análise de *Listeria* em alimentos é demorada e compreende diversas etapas. Embora apresentem algumas variações na seleção dos meios de cultura e na forma de preparação das amostras, envolvem basicamente quatro etapas que podem ser aplicadas a qualquer tipo de alimento: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento em meios seletivos sólidos (plaqueamento diferencial) e identificação completa das colônias por meio de testes bioquímicos e sorológicos (SILVA *et al.*, 2010).

O isolamento é feito por semeadura após enriquecimento em pelo menos dois ágaros seletivo-diferenciais. A seguir, as colônias suspeitas são submetidas a diferentes avaliações bioquímicas para a identificação da espécie. Este processo é longo e trabalhoso, levando de 5 a 10 dias para obtenção de resultados (DESTRO, 2006).

Apesar das técnicas convencionais de cultura requererem maior tempo de análise comparado a métodos alternativos, elas continuam sendo o padrão ouro para isolamento, detecção e identificação de patógenos alimentares, inclusive *L. monocytogenes* (CALLAWAY, 2009).

Um grande número de métodos de detecção de *L. monocytogenes* em alimentos foram desenvolvidos nos últimos anos, sendo mais amplamente utilizados

o método do *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) descrito pelo *Food and Drug Administration* (FDA), o método do *Microbiology Laboratory Guidebook* (MLG) do *United States Department of Agriculture* (USDA/FSIS, 2005) e *International Standards Organization* (ISO). O QUADRO 2 compara os diferentes protocolos.

Método	Pré enriquecimento	Enriquecimento seletivo	Plaqueamento diferencial
BAM / FDA (2003)	BLEB sem os agentes seletivos a 30°C/4 h	BLEB com os reagentes seletivos completando 48h a 30°C	OXA* a 35°C/24-48 h
MLG / FSIS / USDA (2009)	UVM a 30±2°C / 22±2 h	Caldo Fraser a 35±2°C / 26-48±2h ou MOPS-BLEB a 35±2°C/ 18-24h	MOX a 30±2°C / 22±2h
ISO 11290-1:1996 Amendment 1:2004	Half-Fraser a 30±1°C / 24 h	Caldo fraser a 35±1°C/ 48h ou 37°C+/-1°C / 48h	ALOA a 37±1 °C 24±3h ou 48±6h Segundo meio opcional**
ISO 11290-2:1998 Amendment 1:2004	BPW ou Half-Fraser a 20±2°C / 1h±5min	Não tem	ALOA a 37±1°C / 24 ±3h ou 48±6 h (plaqueamento em superfície de diluições para contagem)

QUADRO 2 - DESCRIÇÃO DOS DIFERENTES PROTOCOLOS DO MÉTODO CONVENCIONAL

FONTE: SILVA *et al.* (2010).

NOTA:

Half-fraser: Caldo Fraser com metade da concentração dos agentes seletivos ácido nalidíxico e acriflavina HCl

Palcam: *Palcam Listeria Selective Agar*

\*pode ser usado outros meios de cultura para o plaqueamento seletivo diferencial, sendo recomendados em ordem de preferência: Moxalactam suplementado com esculina e Fe<sup>+3</sup> (LPM) 30°C / 24-48h

\*\* segundo meio é de livre escolha do laboratório complementar ao ALOA, como o OXA ou Palcam.

Vários são os caldos de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivos descritos na literatura, assim como meios de isolamento seletivo. Os caldos de enriquecimento descritos apresentam composição básica muito semelhantes, variando apenas a concentração e combinação dos agentes seletivos. Já os meios de isolamento de *Listeria* apresentam uma gama maior de variáveis. De maneira geral, exploram a resistência de *Listeria* a vários antibióticos como por exemplo, ácido nalidíxico, polimixina B, moxalactam, cefotetan, cicloheximida, entre outros. Estes antibióticos são utilizados em conjunto com outros agentes seletivos tais como feniletanol, cloreto de lítio, acriflavina, anidrido glicínico e telurito de potássio a fim de inibir o crescimento de microbiota competitiva (RODRIGUES *et al.*, 2003).

Vários meios seletivos e diferenciais vêm sendo desenvolvidos para detectar

*L. monocytogenes* em alimentos. Estes meios têm a vantagem de serem específicos para *L. monocytogenes* ou *Listeria* sp. e permitir diferenciação de bactérias relacionadas. Por exemplo, agar LPM, agar Oxford, Oxford modificado (MOX), e agar Palcam fazem uso da enzima  $\beta$ -D-glucosidase em *Listeria* sp. Esta enzima atua hidrolisando a esculina e o resultado da reação bioquímica é a formação de colônias negras circundadas com uma região negra (FIGURA 2). A atividade da esculinase associada com  $\beta$ -D-glucosidase está presente em todas as espécies de *Listeria* principalmente aquela *L. monocytogenes* que não pode ser diferenciada de outra espécie de *Listeria* não patogênica com crescimento nos meios acima citados (GASANOV *et al.*, 2004).



FIGURA 2 - COLÔNIAS DE *Listeria monocytogenes* EM AGAR PALCAM  
FONTE: PALCAM (2013).

Muitos meios cromogênicos vêm sendo desenvolvidos para diferenciar entre espécies patogênicas e não patogênicas. Estes meios detectam a presença de enzimas bacterianas específicas pelo uso de substratos cromogênicos que são incorporados ao meio, permitindo a identificação direta das colônias pela sua cor característica. O fosfatidilinositol-fosfolipase C específica (PI-PLC) é uma enzima que é produzida só por cepas de *Listeria* patogênicas (*L. monocytogenes* e *L. ivanovii*). Ambas as espécies podem ser diferenciadas pelo seu perfil de fermentação de açúcares. Os substratos enzimáticos cromogênicos são principalmente derivados a base de fenol que são incorporados no meio seletivo e a atividade colorimétrica resultante são adsorvidas pelas colônias ou difundidas ao redor da colônia no meio. O uso de substratos enzimáticos no meio seletivo pode minimizar ou eliminar a necessidade de subculturas ou testes bioquímicos adicionais para identificação do organismo alvo, uma vez que é feita diretamente na placa.

Muitos meios seletivos e diferenciais vêm sendo desenvolvidos para *L. monocytogenes* baseados na incorporação destes substratos, inclusive BCM, agar *Listeria* de acordo com Ottaviani e Agosti (ALOA™) e agar Rapid'L. mono foram aprovados para uso pelo FDA (CALLAWAY, 2009).

O ALOA™ contém como substrato cromogênico 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (X- $\beta$ -D-glu) que é clivado pela  $\beta$ -D-glucosidase. O meio também contém L- $\alpha$ -fosfatidilinositol, que é clivado pela PI-PLC. As espécies de *Listeria* patogênicas formam colônias azuis esverdeadas circundadas por um halo turvo quando cultivadas neste meio. Espécies não patogênicas não produzem este halo (FIGURA 3). O ALOA contém uma mistura de agentes seletivos que objetivam inibir bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (ácido nalidíxico, ceftazidima, polimixina), bem como bolores e leveduras (cicloeximida ou anfotericina). Dois agentes diferenciais foram incorporados. Um é o X-Glu (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glicopiranosídeo), substrato cromogênico para a enzima  $\beta$ -glicosidase de *Listeria*, cujo produto da reação confere às colônias uma coloração verde azulada. O outro é o fosfatidilinositol, para detectar a atividade da enzima fosfatidilinositol fosfolipase C (PI-PLC) reconhecida como um fator de virulência de *L. monocytogenes*. No meio de cultura, a atividade dessa enzima provoca a formação de um halo opaco ao redor das colônias. *L. ivanovii* também produz fosfatidilinositol fosfolipase, desenvolvendo colônias similares no ALOA, porém, seu crescimento é retardado nesse meio. *L. innocua* cresce bem no ALOA, mas não forma o halo de fosfolipase, enquanto *L. seeligeri* é inibida (SILVA *et al.*, 2010).

O método da ISO 11290-1:1996 *Amendment* 1:2004 sugere a combinação para detecção de *Listeria* de um meio padrão (Palcam ou Oxford) e um meio cromogênico (ALOA) (SILVA *et al.*, 2010).



FIGURA 3 - COLÔNIAS DE *Listeria monocytogenes* EM AGAR ALOA  
FONTE: PRO-ANALISE (2014)

Os métodos de identificação centrados em marcadores bioquímicos e fenotípicos ainda são amplamente utilizados. As bactérias suspeitas são usualmente classificadas como *Listeria* se elas apresentarem as seguintes características: bacilos Gram-positivos curtos, aeróbios e anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, catalase positiva, oxidase negativa, fermentadores de açúcares e produtores de ácido sem gás, móveis a 28°C e imóveis a 37°C. Os sistemas reagentes comerciais são amplamente utilizados como alternativa aos testes bioquímicos tradicionais de utilização de açúcares que consomem muito tempo levando uma semana para diferenciação das espécies. Testes em tiras como o API *Listeria*® (Biomerieux) e Micro-ID *Listeria*® (Organon Teknika Corp.) têm sido extensivamente validados sendo já incorporados na metodologia padrão (GASANOV *et al.*, 2005).

O sistema reagente comercial mais amplamente utilizado para identificação de *Listeria* é o API *Listeria*® (*Analytab Products INC.*) da Biomerieux (FIGURA 4), 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  $\alpha$ -manosidase, e fermentação de D-arabitol, D-xilose, L-ramnose,  $\alpha$ -metil-D-glicose, D-ribose, glicose-1-fosfato e D-tagatose. Através deste sistema reagente os 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 em 18 a 24 horas (ABRAHÃO, 2008).



FIGURA 4 - SISTEMA REGENTE COMERCIAL API *Listeria* UTILIZADO PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Listeria*  
 FONTE: BIOMERIEUX (2013)

Há vantagens e desvantagens entre os vários métodos de cultura usados, mas quase todos são laboriosos. Muitos métodos rápidos têm sido desenvolvidos para efetiva detecção de *L. monocytogenes*. Eles são qualitativos e de determinação simples para a presença do patógeno em alimentos. Muitos deles finalizam dentro de 24 horas, com alta confiança, e assim reduzindo o grande trabalho envolvido no processo do teste. Estes ensaios podem ser amplamente agrupados em 3 categorias incluindo métodos imunológicos, moleculares e biossensores. É importante observar que muitos testes rápidos são presuntivos e a presença de *L. monocytogenes* em uma dada amostra deve ser confirmada usando métodos aprovados (CALLAWAY, 2009) .

#### 2.7.2- Utilização do sistema VIDAS® na análise de alimentos

O *Vitek Immuno Diagnostic Assay System* (VIDAS®) (Biomerieux) trata-se de um sistema automatizado amplamente utilizado nas análises de amostras clínicas e de alimentos através da imunodetecção de antígenos baseado na técnica *Enzyme-Linked Fluorescent Assay* (ELFA) (AZNAR e SOLÍS, 2006). A FIGURA 5 ilustra as duas versões do equipamento, sendo o primeiro chamado de VIDAS propriamente dito com cinco seções diferentes, tendo cada uma 6 posições de teste, o que permite que diversos parâmetros sejam efetuados simultaneamente; e o segundo, mini-VIDAS®, uma versão compacta do VIDAS contendo 2 seções com 6 posições cada (FIGURA 5).



FIGURA 5 - EQUIPAMENTOS VIDAS® E MINI-VIDAS® (BIOMERIEUX)  
FONTE: BIOMERIEUX (2013)

A metodologia ELFA é uma técnica de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) em "sanduíche" de alta sensibilidade e especificidade para detecção de antígenos, com leitura final de fluorescência, proporcional a quantidade de antígeno presente na amostra. Os reagentes requeridos são pré-dispensados pelo fabricante em tiras seladas prontas para uso (barretes) (FIGURA 6). O analista introduz informações pertinentes no sistema de acordo com instruções do fabricante. A amostra é inoculada neste barrete sendo então introduzida numa posição previamente identificada no equipamento. Um receptáculo em forma de cone serve com dois propósitos, como dispositivo de pipetagem movendo a amostra de um reagente ao outro e como fase sólida onde os anticorpos estão aderidos (FIGURA 6). Se o antígeno pesquisado estiver presente na amostra, ele se ligará nestes anticorpos. Toda amostra não aderida é removida por lavagem. A pipeta é ciclada dentro e fora do poço contendo anticorpos ligados com fosfatase alcalina que são capturados pelos antígenos. Finalmente, a enzima conjugada catalisa a hidrólise do substrato (4-metil-umbeliferona fosfato) que é medida a 450 nm (FIGURA 7). Resultados positivos devem ser confirmados por metodologia convencional e seguidos os procedimentos padrões de isolamento (SEWEL *et al.*, 2003).

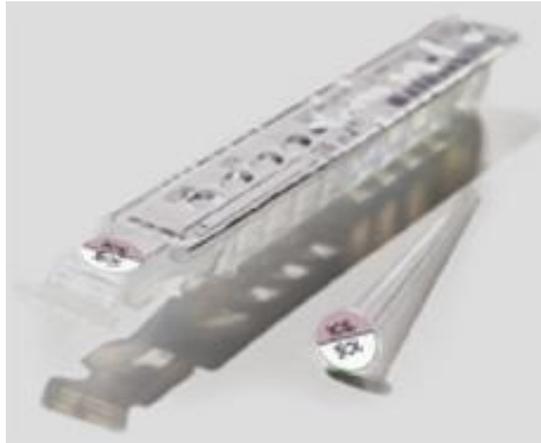


FIGURA 6 - BARRETE E CONE UTILIZADOS NO EQUIPAMENTO VIDAS E MINI-VIDAS  
 FONTE: BIOMERIEUX (2013)

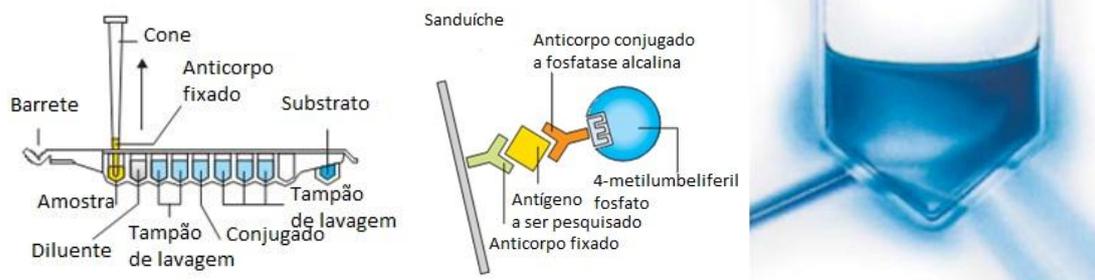


FIGURA 7 - REAÇÃO DA METODOLOGIA ELFA NA BARRETE

NOTA:

O Anticorpo captura o patógeno alvo, um segundo anticorpo conjugado com uma enzima fixa-se ao antígeno capturado, a intensidade da fluorescência é interpretada pelo sistema.

FONTE: VIDAS (2012).

Yolken e Stopa (1979), buscando melhorar a sensibilidade do ELISA, desenvolveram o sistema ELFA postulando que a sensibilidade do ELISA seria melhorada empregando um substrato que pudesse ser detectado em menores concentrações que aqueles que geram produtos colorimétricos. Analisando 25 amostras frente ao rotavírus humano, este trabalho foi capaz de detectar 6 amostras positivas que foram negativas pelo ELISA.

Historicamente, o sistema VIDAS foi validado pela *Association Française de Normalisation* (AFNOR), em 17 de junho de 1994 como um método de análise rápida para todos os produtos destinados a alimentação humana. Esta validação foi obtida de acordo com o método de referência descrito na França NF EN ISO 11290-1 padrão. O método também foi validado como oficial N° 999,06 pela *Association of Analytical Chemists* (AOAC), em maio de 1999 (BENETTI, 2009).

Para análise de *Listeria* spp. em alimentos o VIDAS® compreende os seguintes sistemas reagentes:

- VIDAS *Listeria*® (LIS): Permite a detecção de *Listeria* sp. nos produtos alimentares e nas amostras ambientais. O tempo de teste é de 45 minutos e os resultados são obtidos em 2 dias.
- VIDAS *Listeria* Species Xpress® (LSX): Permite a detecção de *Listeria* sp. em carnes e produtos lácteos. O tempo de teste é de 70 minutos e os resultados são obtidos no dia seguinte.
- VIDAS *Listeria monocytogenes* 2® (LMO2): Permite a detecção de *Listeria monocytogenes* em produtos alimentícios e amostras ambientais. O tempo de teste é de 70 minutos e os resultados são obtidos em 2 dias.
- VIDAS *Listeria monocytogenes* Xpress® (LMX): Permite a detecção de *Listeria monocytogenes* em carnes e produtos lácteos. O tempo de teste é de 70 minutos e os resultados são obtidos no dia seguinte.
- VIDAS *Listeria* DUO® (LDUO): Permite a detecção simultânea de *Listeria monocytogenes* e *Listeria* sp. em alimentos e amostras ambientais. O tempo de teste é de 127 minutos e os resultados são obtidos em 2 dias.

Após a etapa de enriquecimento das amostras alimentares, elas são aquecidas por fervura com a finalidade de aumentar a sensibilidade do método ELFA pois este aquecimento age sobre a estrutura das proteínas aumentando a acessibilidade dos epítomos (ligação antígeno-anticorpo ou proteína fago-antígeno). Este tempo de aquecimento deve ser controlado uma vez que quando superiores a 15 minutos podem danificar os antígenos. A outra finalidade do aquecimento é reduzir a interferência da matriz que pode conter fosfatase alcalina levando a resultados falso-positivos. O sistema reagente VIDAS LMO2 dispensa esta etapa de aquecimento pois o teste se baseia na busca da proteína de virulência da bactéria e esta pode ser degradada ou destruída por aquecimento (BIOMERIEUX2, 2013).

O VIDAS compreende outros parâmetros na área de alimentos: para detecção de *Salmonella* (VIDAS *Salmonella*® - SLM, VIDAS *Immuno-Concentration Salmonella*® - ICS), *Escherichia coli* O157 (VIDAS *E. coli* O157® - ECO, VIDAS *Immuno-Concentration E. coli* O157® - ICE), *Campylobacter* (VIDAS *Campylobacter*® - CAM) e enterotoxina estafilocócica (VIDAS *Staphenterotoxin II*® - SET2) (VIDAS, 2012).

Muitos trabalhos comparando o VIDAS com outras metodologias vêm sendo publicados com grande frequência.

O sistema VIDAS-ICS® obteve resultados bastante eficazes no trabalho de De Medici *et al.* (1998) que o compararam ao meio semi-sólido modificado Rappaport-Vassiliadis (MSRV®) (Oxoid) e o teste convencional em amostras de frango de campo e artificialmente contaminadas com *Salmonella* sp. e não-*Salmonella* como cepas competidoras. Eles ainda destacam a vantagem de ser o mais rápido, fato este importante quando se analisa alimentos de curto prazo de validade e na necessidade de urgência nos resultados. Outra grande vantagem citada é a versatilidade do equipamento permitindo analisar outros patógenos alimentares.

Vaz-Velho *et al.* (2000) avaliaram a eficácia do mini-VIDAS LMO2® para detecção de *Listeria monocytogenes* em amostras ambientais e de peixes em três indústrias portuguesas de peixes defumados e em seus fornecedores, em paralelo com o protocolo tradicional ISO 11290-1. Este trabalho obteve especificidade de 0,96 e sensibilidade de 0,73 utilizando o protocolo tradicional como padrão ouro. Esta sensibilidade diminuída foi relacionada com a presença de *Listeria innocua* e/ou grande quantidade de microflora contaminante nestas amostras.

Uma comparação do sistema VIDAS SLM® para identificação de *Salmonella* sp. usando o método recomendado pelo fabricante e um método modificado, swab de Moore, foi feita por Walker *et al.* (2001). O swab de Moore aumentou a positividade das amostras (83% vs. 67%) mostrando assim que seu uso pode melhorar a sensibilidade do sistema VIDAS. Este trabalho mostrou também, vantagens do sistema VIDAS quanto ao tempo de detecção e técnica menos laboriosa que as técnicas convencionais.

Aznar e Solis (2006) detectaram *Listeria monocytogenes* por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) comparando ao sistema mini-VIDAS LMO2® e o procedimento padrão ISO 11290-1. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o método mini-VIDAS e o ISO 11290-1 foram igualmente sensíveis. Comparando-os ao PCR, este foi claramente o método mais acurado e eficiente para detecção de *Listeria monocytogenes* em alimentos e, além disso, não mostrou resultados falso negativos. Isso mostra a realidade atual aonde os métodos moleculares vêm ganhando credibilidade e tornando-se a cada dia mais populares e acessíveis.

Oktay e Heperkan (2006) compararam o método ISO 11290 e VIDAS para identificação de *Listeria* (LMO2) e *Salmonella* (SLM) em queijos, manteigas e batatas cozidas. Nas amostras naturalmente contaminadas encontraram 100% de sensibilidade e especificidade para o VIDAS. Nas amostras artificialmente contaminadas, o VIDAS foi capaz de identificar a presença de bactérias tanto no inóculo baixo quanto no alto.

Reiter *et al.* (2010) compararam o VIDAS (CAM® para *Campylobacter* sp., LMO2® para *Listeria monocytogenes* e SLM® para *Salmonella* sp.) , SimPlate® (Biocontrol), Reveal® (Neogen), VIP® (Biocontrol) e métodos tradicionais frente a *Campylobacter* sp., *Listeria monocytogenes*, e *Salmonella* spp. As amostras foram coletadas de abatedouros e de diferentes partes de frango. O VIDAS CAM® foi melhor que o Simplate® e o tradicional para *Campylobacter* sp. Para *Listeria monocytogenes*, o VIDAS LMO2® obteve resultados similares ao Reveal® e VIP®. Quanto a *Salmonella* sp. os resultados do VIDAS SLM® foram semelhantes ao tradicional, com a vantagem do menor tempo de detecção do primeiro. O autor conclui que o VIDAS parece ser uma alternativa efetiva ao método convencional.

Ueda e Kuwabara (2010) analisaram especificidade, sensibilidade e tempo de análise do VIDAS LMO2 em amostras de alimentos artificialmente contaminadas. Das 31 cepas de *Listeria monocytogenes* analisadas, todas foram positivas. Analisou-se também amostras contaminadas com outras espécies bacterianas e outras espécies de *Listeria*, sendo todas negativas, exceto para uma cepa de *Salmonella* sp. cuja leitura foi limítrofe. Desta forma, confirmaram que o VIDAS é um teste preciso e rápido para detecção de *L. monocytogenes* em vários tipos de alimentos.

Em um estudo multilaboratorial, Johnson e Jechorek (2011) compararam o VIDAS *Listeria* Xpress® (LSX) a métodos tradicionais. Este trabalho objetivou avaliar a eficácia deste equipamento já validado, frente a diferentes tipos de alimentos artificialmente contaminados. No processo do VIDAS eles analisaram a diferença de resultados utilizando a etapa de fervura da amostra em banho-maria e o método a seco realizado pelo equipamento desenvolvido pela Biomerieux, VIDAS *Heat and Go*®. Dentro de 1134 testes realizados, 490 amostras foram positivas pelo VIDAS LSX® usando a etapa de fervura da amostra, 483 usando o sistema *Heat and Go*® e 439 pelo método de cultura tradicional. Os resultados deste estudo demonstraram que o equipamento apresentou sensibilidade superior ao do método tradicional uma

vez que as amostras analisadas eram artificialmente contaminadas, sendo recomendada sua utilização para detecção de *Listeria* sp. apesar de reconhecer que este método deve ser aplicado como triagem para a presença desta bactéria em alimentos.

Cruz *et al.* (2012) compararam o desempenho do VIDAS LDUO® dentre seis sistemas de teste rápido para detecção de *Listeria monocytogenes* em frutos do mar e amostras ambientais artificialmente contaminadas com o método convencional *Bacteriological Analytical Manual* (BAM). Converteram os resultados presença/ausência nestes substratos em Número Mais Provável (NMP) estimado usando a planilha BAM - NMP com a finalidade de proporcionar uma maneira simples de obter os dados quantitativos a partir dos resultados de incidência permitindo que os dados de diferentes testes fossem comparados estatisticamente. Para esta avaliação, dois parâmetros foram avaliados: sensibilidade e limite de detecção. A sensibilidade foi determinada pela habilidade dos métodos em medir a concentração original que foi inoculada em cada alimento. O limite de detecção foi verificado pela capacidade de detectar a concentração de *Listeria* presente no inóculo mais diluído. Assim como com outros sistemas de detecção rápida, este estudo mostrou que apesar da aparente eficiência na análise de amostras alimentares, os sistemas são insuficientes ao analisar amostras ambientais.

A comparação de resultados entre diferentes trabalhos é difícil devido a vários fatores como tipo de amostra analisada, se naturais ou artificialmente contaminadas, incidência da variante bacteriana nos produtos alimentares, influência da matriz alimentar e microbiota contaminante e testes confirmatórios usados para identificação de isolados (AZNAR e SOLÍS, 2006).

A tecnologia ELFA utilizada no sistema VIDAS trouxe inúmeras vantagens na microbiologia de alimentos uma vez que tem demonstrado resultados satisfatórios frente aos protocolos tradicionais os quais liberam resultados tardios. Assim ele une a praticidade e o curto tempo nas análises. Logicamente, como na área clínica, as metodologias moleculares vêm tomando espaço e prometem melhorar diagnósticos e acurácia de resultados.

### 3 – MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1- MATERIAL

##### 3.1.1- Área de abrangência do estudo

Para delimitar a área de abrangência do presente estudo, realizou-se a pesquisa dos municípios produtores de queijos e ricotas no estado do Paraná. Tal delimitação foi realizada através de pesquisa de campo, via web e histórico de laudos de análise do Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN - PR).

Após a localização dos municípios produtores, as Regionais de Saúde (RS) referentes a eles foram identificadas. 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 Procopio (18ª RS), Jacarezinho (19ª RS), Toledo (20ª RS), Telêmaco Borba (21ª RS) e Ivaiporã (22ª RS) (ABRAHÃO, 2008).

A FIGURA 8 apresenta a divisão administrativa de Saúde do Paraná e destaca a 1ª, 2ª, 10ª, 11ª e 21ª RS que fizeram parte do programa de coletas.

Através das RS, 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 RS 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 (ABRAHÃO, 2008).

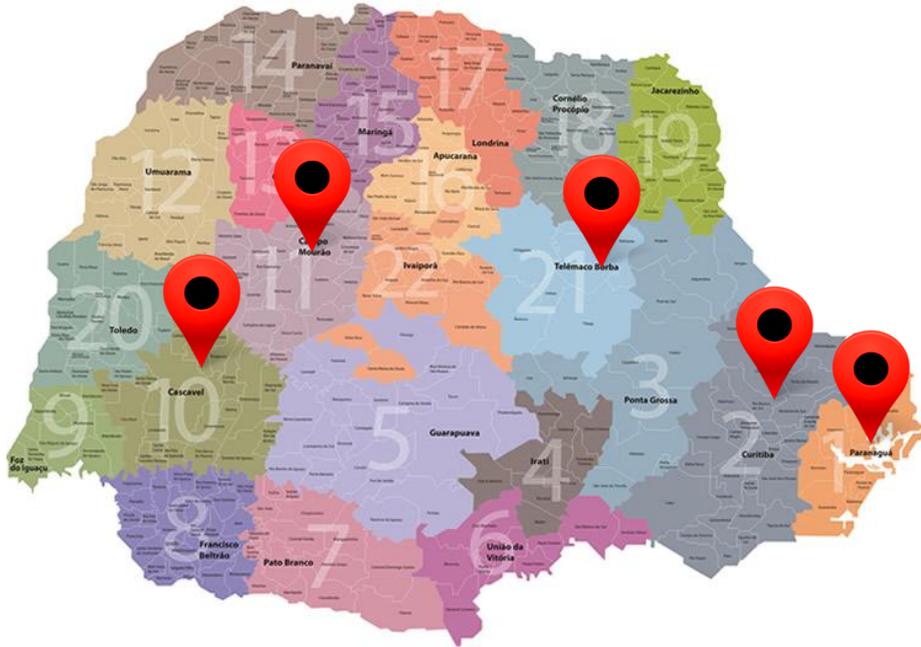


FIGURA 8 - DIVISÃO ADMINISTRATIVA DA SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO PARANÁ SEGUNDO AS REGIONAIS DE SAÚDE (RS). EM DESTAQUE A 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 10<sup>a</sup>, 11<sup>a</sup> e 21<sup>a</sup> RS PARTICIPANTES DO PROGRAMA DE COLETAS  
 FONTE: SESA (2013).

### 3.1.2- Obtenção das amostras

Foi solicitado à Vigilância Sanitária e LACEN - PR a inclusão de queijos e ricotas na Programação Estadual de Coleta. A partir disto, foi delineado organograma para envio das amostras coletadas.

As amostras de queijos e ricotas foram enviadas pela Vigilância Sanitária das RS no período de janeiro a fevereiro de 2013, a partir dos postos de vendas (supermercados) e diretamente do produtor, ao LACEN - PR para análise laboratorial.

As amostras foram transportadas até o laboratório sob refrigeração dentro de um envelope devidamente identificado e lacrado. Somente foram analisadas as amostras que apresentaram a embalagem totalmente íntegra e dentro do prazo de validade.

### 3.1.3- Meios de cultura, soluções, reagentes e insumos

- Caldo Half Fraser pré-enriquecido seletivo de *Listeria* para produtos alimentares ou no ambiente, frascos com 225mL (Biomerieux).
- Caldo Fraser pré-enriquecido seletivo de *Listeria* para produtos alimentares ou ambientais, tubos com 9 mL (Biomerieux).
- Placas de Ágar Palcam suplementado com SR 0150E (Polimixina B 5mg, Acriflavina HCl 2,5 mg) (Oxoid);
- Placas de Ágar Oxford seletivo para *Listeria* suplementado com Suplemento Seletivo *Listeria* (Formulação Oxford) SR0140E (Cicloheximida 200mg, Sulfato de Colistina 10mg, Acriflavina 2,5mg, Cefotetana 1mg, fosfomicina 5mg) (Oxoid);
- Placas de Ágar Base *Listeria* Cromogênico (OCLA) CM 1080 (Oxoid) suplementado com Suplemento Seletivo *Listeria* Cromogênico SR 0227E (ácido nalidíxico 13mg, Polimixina B 38,350 IU, Anfotericina 5mg, Ceftazidima 3mg) e SR 0228E Suplemento Diferencial *Listeria* Cromogênico (Solução de lecitina 20mL);
- Placas de Ágar Base *Listeria* Cromogênico (ISO) CM 1084 (Oxoid) suplementado com SR 0244E Suplemento Diferencial *Listeria* Cromogênico (Solução de L- $\alpha$ -fosfatidilinositol 20mL) e Suplemento Seletivo *Listeria* Cromogênico (ISO) SR 0226E (ácido nalidíxico 10 mg, polimixina B 38.350 UI, anfotericina 5 mg, ceftazidima 10 mg);
- Sistema reagente VIDAS LMO *Listeria monocytogenes* 2<sup>®</sup> (Biomerieux);
- Sistema reagente VIDAS LIS<sup>®</sup> (Biomerieux);
- Sistema reagente VIDAS LDUO<sup>®</sup> (Biomerieux);
- Caldo *Listeria* Xpress (LX)<sup>®</sup>, enriquecimento seletivo da *Listeria*, frascos com 225mL (Biomerieux);
- Caldo *Listeria* Xpress (LX)<sup>®</sup>, enriquecimento seletivo da *Listeria*, tubos com 9 mL (Biomerieux);
- Tubos Sulfito Indol Motilidade com adição de 0,05% de cloreto de trifeniltetrazolium (SIM<sup>1</sup> modificado);
- Tubos inclinados de Ágar Trypticase de Soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE);
- Peróxido de hidrogênio 10 V (Laborclin);

- API *Listeria*<sup>®</sup> (Biomerieux), sistema para identificação de *Listeria*;

### 3.2- MÉTODOS DE ANÁLISE PARA PESQUISA DE *Listeria* sp.

As amostras foram submetidas a análise pelo método convencional para a pesquisa de *Listeria* sp. segundo protocolo ISO 11290-1 e pelo sistema mini-VIDAS<sup>®</sup> (Biomerieux) LIS (*Listeria* sp.), LMO2 (*Listeria monocytogenes*) e LDUO (detecção simultânea de *Listeria* sp. e *Listeria monocytogenes*) que caracterizam a presença ou ausência do micro-organismo em 25 gramas da amostra analisada.

#### 3.2.1- Preparo das amostras

As amostras foram conservadas em câmara científica marca Indrel modelo RC 804 B a temperatura de 4,0 a 5,0 °C até o início do preparo. As amostras foram pesadas em cabine de segurança biológica marca Veco modelo Bioprotector plus - 18 classe II tipo B2 com utilização de balança semi-analítica AC 100 marca Libror. Para cada amostra foram realizadas 3 pesagens de 25 g em saco estéril para homogeneizador tipo *Stomacher*. As pesagens destinaram-se à pesquisa de *Listeria* pelos métodos convencional (ISO 11290-1), LIS, LMO2 e LDUO.

#### 3.2.2- Realização da metodologia tradicional da cultura "in vitro"

Para detecção, isolamento e identificação de *Listeria* sp. e *Listeria monocytogenes* foi utilizado o método ISO 11290-1 segundo o critério de presença ou ausência em 25 g da amostra descrita, a seguir:

##### 3.2.2.1- Enriquecimento primário

Para o enriquecimento primário, em 25 g da amostra foram adicionados 225 mL de Caldo Half Fraser suplementado (Biomerieux). Após homogeneização em *Stomacher* marca Seward modelo 400 por 2 minutos, as amostras foram incubadas em estufa J.Prolab modelo B3 a 30°C durante 24 horas.

##### 3.2.2.2- Enriquecimento secundário

Nesta etapa, 0,1 mL do enriquecimento primário foi adicionado em 9 mL de caldo Fraser suplementado (Biomérieux) e incubado em estufa marca Fanem a 37°C por 48 horas.

### 3.2.2.3- Plaqueamento seletivo

Após enriquecimento secundário foi realizado o estriamento em cabine de segurança biológica, marca Veco modelo Biosafe plus, classe II tipo B2 em placas de Petri contendo os seguintes meios seletivos:

- Ágar Palcam suplementado;
- Ágar Oxford seletivo para *Listeria* suplementado;
- Ágar Base *Listeria* Cromogênico CM 1080 (OCLA) (Oxoid) suplementado;
- Ágar Base *Listeria* Cromogênico CM 1084 (ISO) (Oxoid) suplementado.

Estes meios foram submetidos à incubação em estufa marca Fanem de 37°C por 48 horas. As colônias típicas de *Listeria* em Ágar Oxford e Palcam apresentam-se esféricas e circundadas por halo preto resultantes de hidrólise da esculina. Em ágar cromogênico (ISO e OCLA) as colônias típicas apresentam-se azul-esverdeadas sendo observado um halo opaco ao redor da colônia na *Listeria monocytogenes*. Foram selecionadas 3 a 5 colônias de cada placa contendo colônias típicas para posterior confirmação por prova de catalase, motilidade a 25°C em SIM<sup>1</sup> modificado e testes enzimáticos e de fermentação de açúcares (sistema API *Listeria*).

O procedimento do método ISO 11290-1 está esquematizado na figura 9. O tempo mínimo de análise é de 5 dias.

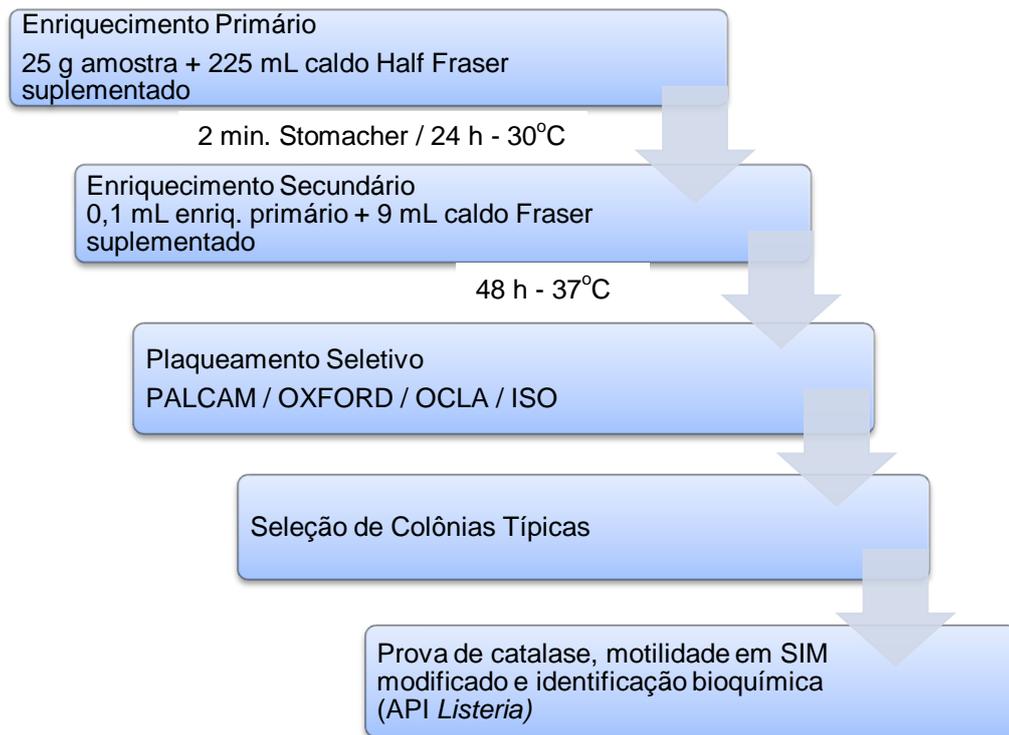


FIGURA 9 - FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO DO MÉTODO ISO 11290-1

3.2.3- Realização do ensaio mini-VIDAS<sup>®</sup> (Biomerieux) para detecção de *Listeria* sp. em alimentos

3.2.3.1- Mini-VIDAS LIS<sup>®</sup> (Biomerieux)

- Enriquecimento primário

Para o enriquecimento primário, em 25 g da amostra foram adicionados 225 mL de caldo Half Fraser suplementado (Biomerieux). Após homogeneização em *Stomacher* marca Seward modelo 400 por 2 minutos, incubou-se em estufa J.Prolab modelo B3 a 30°C por 24 horas.

- Enriquecimento secundário

Nesta segunda etapa, 1mL do enriquecimento primário foi adicionado em 9mL de Caldo Fraser suplementado e incubado em estufa J.Prolab modelo B3 a 30°C por 24 horas.

- Inativação celular

Uma alíquota de 2 mL do caldo de enriquecimento secundário foi transferido para tubo estéril, o qual foi aquecido em banho-maria a 95 - 100°C por 15 minutos e em seguida arrefecido num banho de água fria.

- Sistema mini-VIDAS

Uma alíquota de 0,5 mL da amostra inativada foi transferida para o poço-amostra do barrete mini-VIDAS LIS<sup>®</sup> (Biomerieux). Foi realizada a metodologia conforme preconizado pelo fabricante. O restante do caldo de enriquecimento não inativado foi conservado a 4°C para confirmação em caso de resultado positivo. Nesta situação procedeu-se o plaqueamento seletivo em meios de cultura (Palcam, Oxford, OCLA e ISO) e identificação bioquímica, adotando a mesma metodologia do procedimento convencional, e por fim identificação confirmatória pelo sistema API *Listeria*<sup>®</sup> (Biomerieux).

Os resultados são obtidos em 2 dias e o tempo de corrida no equipamento é de 45 minutos.

### 3.2.3.2- Mini-VIDAS LDUO<sup>®</sup> (Biomerieux)

- Enriquecimento primário

Para o enriquecimento primário, em 25 g da amostra foram adicionados 225 mL de Caldo LX<sup>®</sup> (Biomerieux). Após homogeneização em *Stomacher* marca Seward modelo 400 por 2 minutos, incubou-se a 30°C em estufa J.Prolab modelo B3 por 24 horas.

- Enriquecimento secundário

Nesta etapa, 0,1mL do enriquecimento primário foi adicionado em tubos contendo 9mL de Caldo LX<sup>®</sup> (Biomerieux), e incubado em estufa J.Prolab modelo B3 a 30°C por 24 horas.

- Inativação celular

Uma alíquota de 2 mL do caldo de enriquecimento secundário foi transferido para tubo estéril, o qual foi aquecido em banho-maria a 95 - 100°C por 15 minutos e em seguida arrefecido num banho de água fria.

- Sistema mini-VIDAS

Uma alíquota de 0,5 mL da amostra inativada foi transferida para o poço-amostra do barrete mini-VIDAS LDUO<sup>®</sup> (Biomerieux). Foi realizada a metodologia conforme preconizado pelo fabricante. O restante do caldo de enriquecimento não inativado foi conservado a 4°C para confirmação em caso de resultado positivo. Nesta situação procedeu-se o plaqueamento seletivo em meios de cultura (Palcam, Oxford, OCLA e ISO) e identificação bioquímica, adotando a mesma metodologia do procedimento convencional, e por fim identificação confirmatória pelo sistema API *Listeria*<sup>®</sup> (Biomerieux).

Os resultados são obtidos em 2 dias e o tempo de corrida no equipamento é de 120 minutos.

### 3.2.3.3- Mini-VIDAS LMO2<sup>®</sup> (Biomerieux)

- Enriquecimento primário

Para o enriquecimento primário, em 25 g da amostra foram adicionados 225 mL de caldo Half Fraser suplementado (Biomerieux). Após homogeneização em *Stomacher* marca Seward modelo 400 por 2 minutos, incubou-se em estufa J.Prolab modelo B3 a 30°C por 24 horas.

- Enriquecimento secundário

Nesta segunda etapa, 1mL do enriquecimento primário foi adicionado em 9mL de Caldo Fraser suplementado e incubado em estufa J.Prolab modelo B3 a 30°C por 24 horas.

- Sistema mini-VIDAS

Transferiu-se 0,5 mL do enriquecimento secundário para o poço-amostra do barrete mini-VIDAS LMO2<sup>®</sup> (Biomerieux). Realizou-se a metodologia conforme preconizado pelo fabricante. O restante do caldo foi conservado a 4° C para confirmação em caso de resultado positivo. Nesta situação procedeu-se o plaqueamento seletivo e identificação bioquímica, adotando a mesma metodologia do procedimento convencional, e por fim identificação confirmatória pelo sistema API *Listeria*<sup>®</sup> (Biomerieux).

Os resultados são obtidos em 2 dias e o tempo de corrida no equipamento é de 70 minutos. O procedimento do método mini-VIDAS LIS<sup>®</sup>, LDUO<sup>®</sup> e LMO2<sup>®</sup> está esquematizado na figura 10.

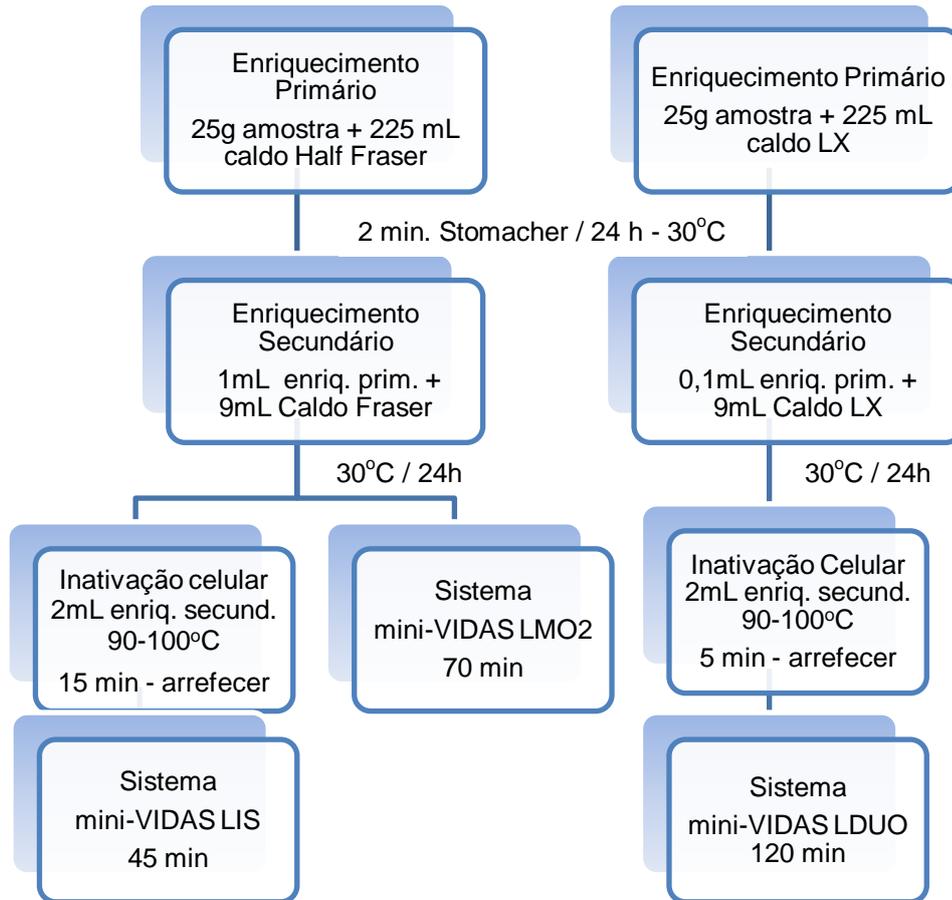


FIGURA 10 - FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO DOS MÉTODOS MINI-VIDAS LIS, LMO2 E LDUO

### 3.2.4- Confirmatório das colônias típicas

A confirmação das colônias típicas desenvolveu-se por meio da seleção destas, obtidas após plaqueamento, seguida pelo estriamento em tubos de Agar Trypticase de Soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE), e incubadas a 30°C em estufa J.Prolab modelo B3 por 24 a 48 horas destinado a purificação dos isolados.

Para a prova da catalase transferiu-se uma alçada da cultura a partir do tubo de TSA-YE para uma lâmina de microscopia, e esta foi coberta com uma gota de peróxido de hidrogênio 10 volumes sendo observado a ocorrência de borbulhamento imediato (teste positivo) ou não borbulhamento (teste negativo). As cepas de *Listeria* spp. são catalase positivas.

Para a prova da motilidade, inoculou-se as cepas, a partir do enriquecimento, em tubos de Sulfito Indol Motilidade com adição de 0,05% de cloreto de trifeniltetrazolium (SIM<sup>1</sup> modificado), e incubou-se em estufa J.Prolab modelo B3 a 25°C por até 7 dias observando-se diariamente. As cepas de *Listeria* spp. são móveis a temperatura de 25°C e desenvolvem uma zona de migração típica espalhando-se na parte superior do meio e mantendo-se restritas à picada no fundo do tubo. Este tipo de migração produz uma massa de crescimento característico lembrando um guarda-chuva.

### 3.2.5- Confirmatório de *Listeria* sp. pelo sistema API *Listeria*

#### 3.2.5.1- Purificação das colônias suspeitas de *Listeria* spp.

As colônias típicas selecionadas foram identificadas através do API *Listeria*. Com uma alça bacteriológica, transferiu-se uma colônia para um tubo de TSA-YE inclinado seguido de incubação em estufa marca Fanem a 35° C por 24 horas.

#### 3.2.5.2- Preparo do inóculo

Com uma alça bacteriológica transferiu-se uma pequena quantidade de crescimento bacteriano do tubo de TSA-YE inclinado para uma ampola contendo 2 mL de água purificada estéril, obtendo-se uma suspensão bacteriana com turbidez de 0,5 pontos na escala de McFarland.

#### 3.2.5.3- Preparação da câmara úmida

Com o propósito de criar condições favoráveis de umidade, a galeria contendo os microtubos com ágar desidratado foi incubada em atmosfera úmida formada pela própria bandeja e tampa plástica do sistema API *Listeria* adicionando-se 5 mL de água destilada.

#### 3.2.5.4- Distribuição do inóculo

A suspensão bacteriana foi distribuída em cada microtubo, evitando-se a formação de bolhas. No primeiro teste, DIM, foram adicionados 100µL do inóculo e, nos demais, 50 µL. A exatidão da inoculação é muito importante, uma vez que, um microtubo com inóculo insuficiente, ou em excesso pode causar resultado falso-positivo ou falso-negativo. A câmara úmida, contendo a galeria inoculada, foi incubada em estufa marca Fanem a 35 - 37° C por 18 – 24 horas em condições aeróbicas.

#### 3.2.5.5- Leitura e Interpretação da galeria

Uma (1) gota de reagente ZYM B foi adicionada ao teste DIM e, após 3 minutos, foi realizada a leitura de todos os testes, conforme instruções do fabricante. Os resultados obtidos foram anotados em uma ficha como positivo ou negativo, de acordo com a coloração formada. Os resultados obtidos foram transcritos em uma combinação numérica a qual revela a identificação da espécie do micro-organismo.

#### 3.2.6- Indicadores usados para avaliação das metodologias utilizadas na pesquisa de *Listeria* sp.

A sensibilidade de um método está relacionada com a sua capacidade de não apresentar resultados falso-negativos e, a especificidade, com sua capacidade de não apresentar resultados falso-positivos. Neste experimento foram considerados verdadeiros positivos, os resultados identificados como *Listeria* pelo método convencional ou pelo sistema mini-VIDAS com posterior confirmação pelo método convencional. A sensibilidade e especificidade dos métodos foram avaliadas pela equação de BEUMER *et al.*, (1991) (FIGURA 11).

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

Onde:  
VP: verdadeiramente positivo  
VN: verdadeiramente negativo  
FN: falso negativo  
FP: falso positivo

FIGURA 11- FÓRMULA PARA AVALIAÇÃO DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DE MÉTODOS DE DETECÇÃO

### 3.2.7- Análise Estatística dos Dados

Para a análise estatística dos dados foi utilizado método não paramétrico (qui-quadrado) pelo programa Excel 2007 e SPSS 17.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*) e estatística descritiva através de cálculos de percentagem, proporções e gráficos.

#### 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de queijos frescais e ricotas analisados foram produzidos no estado do Paraná, coletados pela Vigilância Sanitária dos municípios em estabelecimentos comerciais ou diretamente do fabricante em diferentes regiões e encaminhadas pelas RS ao LACEN-PR. As 106 amostras coletadas e analisadas são provenientes das seguintes RS: 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 10<sup>a</sup>, 11<sup>a</sup> e 21<sup>a</sup> sendo 6, 30, 31, 12 e 27 amostras de cada RS respectivamente. Os produtos analisados eram constituídos de 77 (72,6 %) queijos e 29 (27,4%) ricotas de 26 marcas diferentes que foram identificadas por letras (TABELA 1).

TABELA 1- DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS ANALISADAS

Produto	Marca - tipo de inspeção	RS	Município de coleta	Nº de peças analisadas
Ricota	A - SIP	2 <sup>a</sup>	Campo Largo	2
Queijo frescal	B - SIP	2 <sup>a</sup>	Campo Largo	2
Queijo frescal	C - SIP	2 <sup>a</sup>	Campo Largo	2
Queijo frescal	D - SIP	21 <sup>a</sup>	Telêmaco Borba	11
Ricota	A - SIP	21 <sup>a</sup>	Telêmaco Borba	4
Ricota	E - SIP	11 <sup>a</sup>	Campo Mourão	2
Queijo frescal	E - SIP	11 <sup>a</sup>	Campo Mourão	2
Queijo frescal	F - SIM <sup>2</sup>	11 <sup>a</sup>	Campo Mourão	8
Ricota	G - SIM <sup>2</sup>	10 <sup>a</sup>	Cascavel	4
Queijo frescal	H - SIM <sup>2</sup>	10 <sup>a</sup>	Quedas do Iguaçu	2
Queijo frescal	G - SIM <sup>2</sup>	10 <sup>a</sup>	Cascavel	4
Queijo frescal	I - SIM <sup>2</sup>	10 <sup>a</sup>	Cascavel	2
Ricota	J - SIP	2 <sup>a</sup>	Campo Largo	2
Queijo frescal	K - SIF	21 <sup>a</sup>	Telêmaco Borba	10
Queijo frescal	L - SIM <sup>2</sup>	10 <sup>a</sup>	Cascavel	2
Queijo frescal	M - SIM <sup>2</sup>	10 <sup>a</sup>	Quedas do Iguaçu	5
Queijo frescal	N - SIM <sup>2</sup>	10 <sup>a</sup>	Cascavel	2
Ricota	O - SIP	2 <sup>a</sup>	Campo Largo	5
Queijo frescal	P - SIM <sup>2</sup>	10 <sup>a</sup>	Cascavel	2
Queijo frescal	Q - SIP	10 <sup>a</sup>	Cascavel	2
Ricota fresca	R - SIF	21 <sup>a</sup>	Telêmaco Borba	2
Ricota fresca	S - SIF	2 <sup>a</sup>	Campo Largo	2
Queijo frescal	T - SIM <sup>2</sup>	2 <sup>a</sup>	Campo Largo	2
Queijo frescal	B - SIP	1 <sup>a</sup>	Morretes	2
Queijo frescal	U - SIF	1 <sup>a</sup>	Morretes	2
Queijo frescal	V - SIM <sup>2</sup>	10 <sup>a</sup>	Quedas do Iguaçu	2
Queijo frescal	O - SIP	10 <sup>a</sup>	Cascavel	2
Queijo frescal	X - SIF	2 <sup>a</sup>	Campo Largo	5
Ricota	Y - SIM <sup>2</sup>	1 <sup>a</sup>	Guaratuba	2
Queijo frescal	Z - SIP	2 <sup>a</sup>	Quatro Barras	2
Ricota	B - SIP	2 <sup>a</sup>	Quatro Barras	2
Ricota	A - SIP	2 <sup>a</sup>	Quatro Barras	2
Queijo frescal	O - SIP	2 <sup>a</sup>	Campo Largo	2
Queijo frescal	W - SIM <sup>2</sup>	10 <sup>a</sup>	Quedas do Iguaçu	2

#### 4.1 - OCORRÊNCIA DE *Listeria* spp. NOS QUEIJOS FRESCAIS E RICOTAS ANALISADOS

Neste trabalho foi considerado o método convencional como padrão ouro para a detecção de *Listeria*. As amostras positivas para *Listeria* pelo sistema mini-VIDAS que foram posteriormente confirmadas por semeadura em meio seletivo a partir do enriquecimento secundário também foram consideradas como verdadeiramente positivas. Os resultados são apresentados no quadro 3.

AM	Marca / produto	Tipo de insp.	RS - Mun. de procedência	Conv	Sistema mini-VIDAS				API <i>Listeria</i>
					LIS	LMO 2	LDUO		
							LIS	LMO	
1	L / queijo	SIM <sup>2</sup>	10 <sup>a</sup> - Cascavel	X	X	X	X	X	<i>L. monocytogenes</i>
2	F / queijo	SIM <sup>2</sup>	11 <sup>a</sup> - Campo Mourão	X	X				<i>L. seeligeri</i>
3	F / queijo	SIM <sup>2</sup>	11 <sup>a</sup> - Campo Mourão	X					<i>L. seeligeri</i>
4	F / queijo	SIM <sup>2</sup>	11 <sup>a</sup> - Campo Mourão	X	X				<i>L. seeligeri</i>
5	F / queijo	SIM <sup>2</sup>	11 <sup>a</sup> - Campo Mourão	X	X		X		<i>L. seeligeri</i>
6	O / ricota	SIP	2 <sup>a</sup> - Campo Largo	X	X	X	X	X	<i>L. monocytogenes</i>
7	O / ricota	SIP	2 <sup>a</sup> - Campo Largo	X	X	X			<i>L. monocytogenes</i>
8	O / ricota	SIP	2 <sup>a</sup> - Campo Largo	X	X	X	X		<i>L. monocytogenes</i>
9	K / queijo	SIF	21 <sup>a</sup> - Telêmaco Borba	X					<i>L. monocytogenes</i>
10	D / queijo	SIP	21 <sup>a</sup> - Telêmaco Borba	X	X				<i>L. ivanovii</i>
11	D / queijo	SIP	21 <sup>a</sup> - Telêmaco Borba				X		<i>L. ivanovii</i>
12	U / queijo	SIF	1 <sup>a</sup> - Morretes	X			X		<i>L. innocua</i>

QUADRO 3 - AMOSTRAS POSITIVAS PARA *Listeria* sp. CONSIDERANDO MARCA, TIPO DE INSPEÇÃO, MUNICÍPIO DE PROCEDÊNCIA E DIFERENTES MÉTODOS DE DETECÇÃO

Nota:

AM - amostra

Insp.- inspeção

Mun.- município

Conv. - Método convencional (ISO 11.290-1): crescimento em meio seletivo, catalase positiva, motilidade em forma de guarda-chuva, bile-esculina positiva

Das 106 amostras analisadas em 12 (11,3%) compreendendo nove queijos e três ricotas foi detectada a presença do gênero *Listeria*. Em cinco (4,7%) sendo dois queijos e três ricotas, foi isolada *Listeria monocytogenes* procedentes três amostras da 2ª RS – Campo Largo, uma amostra da 10ª RS – Cascavel e uma amostra da 21ª RS – Telêmaco Borba. As demais espécies encontradas foram quatro (3,8%) *Listeria seeligeri*, duas (1,9%) *Listeria ivanovii* e uma (0,9%) *Listeria innocua*.

A presença de *L. monocytogenes* em 25 g de amostra classifica estes produtos como impróprios para o consumo humano conforme legislação brasileira a qual preconiza ausência de *L. monocytogenes* para queijos de média, alta e muito alta umidade (BRASIL, 2001). Um total de 4,7% das amostras de queijos e ricotas produzidos nas diferentes regiões do estado do Paraná estavam impróprias para o consumo de acordo com o padrão legal vigente.

Em 6,6% das amostras de queijos e ricotas outras espécies de *Listeria* foram isoladas. Este resultado é indicativo de que o processo de produção pode também permitir a contaminação com *L. monocytogenes* o que serve de alerta para que seja desencadeada uma revisão do processo de produção de forma a prevenir a contaminação nos pontos críticos. Além disso, a presença de outras espécies de *Listeria* não descarta a possibilidade de a *Listeria monocytogenes* estar presente mesmo que não detectada. Outro fato a ser considerado é que as espécies *L. ivanovii* e *L. seeligeri*, que também foram isoladas nesta pesquisa (1,9 e 3,8% respectivamente), já foram relatadas estando relacionadas a casos de doenças em humanos (DESTRO, 2006).

Dados publicados nos últimos 10 anos quanto a ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijos e similares demonstram índices de contaminação tanto superiores quanto inferiores ao presente trabalho, quer seja em dados nacionais quanto internacionais.

Estudos de incidência de *Listeria monocytogenes* no Brasil reportam contaminação de 0 a 6,7%, sendo que a maior taxa de contaminação (6,7%) foi encontrada por Abrahão (2008) que analisou diferentes tipos de queijos e ricotas comercializados no estado do Paraná pelo ensaio visual de imunoprecipitação (VIP). Neste mesmo trabalho o número de amostras positivas para *Listeria monocytogenes* utilizando o método convencional foi de 3,3%. Duarte *et al.* (2005) encontraram a segunda maior taxa de contaminação (5,5%) analisando amostras de queijo de

coalho produzidas e comercializadas no estado de Pernambuco. Bernardy *et al.* (2006), no Rio Grande do Sul, obtiveram 3,8% dos queijos coloniais (artesanais e industrializados) contaminados. Por outro lado, Pinto *et al.* (2011) não encontraram nenhuma amostra contaminada ao analisar queijos frescais comercializados em Santa Helena no Paraná.

Ao observar dados internacionais publicados nos últimos 10 anos a variação foi de 0 a 46% de contaminação. A maior taxa foi encontrada por Pintado *et al.* (2005) quando analisaram queijos macios produzidos a partir de leite cru em Portugal. Este trabalho chama a atenção ao risco acentuado de adquirir listeriose no consumo de queijos produzidos a partir de leite cru. Osaili *et al.* (2012) na Jordânia encontraram 11,1% dos queijos brancos analisados contaminados com *Listeria monocytogenes*. Mena *et al.* (2004) analisaram queijos produzidos a partir de leite pasteurizado e não pasteurizado em Portugal e encontraram 1,6% e 4% respectivamente, provando a efetividade da pasteurização na destruição do micro-organismo. Lambertz *et al.* (2012), na Suécia, encontraram resultados bem baixos (0,4%) quando analisaram queijos macios e semi-macios e Cagri-Mehmetoglu *et al.* (2011) não isolaram o micro-organismo nas amostras de queijos e coalhadas analisados na Turquia.

A avaliação comparativa entre os diferentes trabalhos publicados quanto à ocorrência de *Listeria monocytogenes* torna-se difícil devido a variedade de métodos analíticos utilizados bem como diferentes meios de cultura e padrões de amostragem adotados na obtenção dos resultados, podendo resultar em níveis de detecção diferentes. Além disso, os diferentes resultados de ocorrências podem também ser explicados pela distribuição e especificidade geográfica do gênero *Listeria* spp. Outro fato a ser considerado é a grande diversidade de tipos de queijos analisados nos trabalhos. Em relação aos trabalhos brasileiros, tal dificuldade é agravada pelo fato de que existem produtos tipicamente brasileiros, como o queijo minas frescal e o queijo de coalho não existindo produto similar estrangeiro para comparação (ABRAHÃO, 2008).

O processo de pasteurização é considerado efetivo na destruição do gênero *Listeria*, portanto a causa de contaminação de queijos produzidos a partir de leite pasteurizado pode ser por falhas no processo de pasteurização, contaminações ambientais ou de equipamentos (LAMBERTZ *et al.*, 2012). A contaminação cruzada

que pode ocorrer com produtos prontos para consumo, seja diretamente ou via superfícies de equipamentos em contato com o alimento cru, são também consideradas fontes importantes. Estudos prévios demonstraram que a colonização de refrigeradores por *Listeria monocytogenes* é um foco potencial de contaminação (MENA *et al.*, 2004). Fox *et al.* (2011) observaram a persistência de *Listeria monocytogenes* em vários processos de produção mostrando particularidades de alguns subtipos que foram associados a doenças. O tempo de persistência observado foi de poucos meses a 10 anos. Estes autores definiram a persistência como o isolamento repetido de amostras em pelo menos seis meses, e mostraram que 4 dos 52 subtipos estudados foram persistentes. A persistência pode estar relacionada com uma variedade de características fisiológicas incluindo poder de fixação e formação de biofilmes, resistência a sanitizantes e respostas adaptativas.

Em síntese, a contaminação de queijos e ricotas por *Listeria* spp. pode começar na fazenda onde o leite cru pode ser contaminado por animais com mastite e através da manipulação durante estocagem e transporte. Sendo assim o micro-organismo pode sobreviver em decorrência de falhas no processo de pasteurização. A contaminação pode vir a ocorrer, ainda, na planta do processo em suas diversas etapas podendo também facilmente ser transmitida para o alimento quando em contato com superfícies contaminadas (OSAILI *et al.*, 2012).

A listeriose é uma doença grave que atinge principalmente gestantes, idosos e pessoas imunocomprometidas. Tendo em vista a tendência ao aumento potencial do número de idosos, devido ao aumento da expectativa de vida pelos avanços na medicina, e imunocomprometidos devido a AIDS, transplantes e pessoas submetidas à quimio e radioterapia, é de suma importância que se dê maior atenção a esta doença. A importância do trabalho sob o ponto de vista de saúde pública é mostrar que existe um risco potencial à população.

#### 4.1.1 Análise das amostras contaminadas com *Listeria* sp. quanto ao tipo de produto

Das 106 amostras analisadas em 12 (11,3%) delas foi detectada a presença do gênero *Listeria*. Quando se faz a comparação das amostras contaminadas por *Listeria*, considerando o tipo de produto observa-se que dos 77 queijos frescais

analisados, 9 (11,7%) estavam contaminados enquanto que das 29 amostras de ricotas, 3 (10,3%) estavam contaminadas (FIGURA 12).

A avaliação estatística realizada não acusou diferença significativa na contaminação entre queijos e ricotas ( $p=0,846$ ) mostrando que independentemente da natureza da amostra a porcentagem de contaminação nos dois produtos é semelhante.

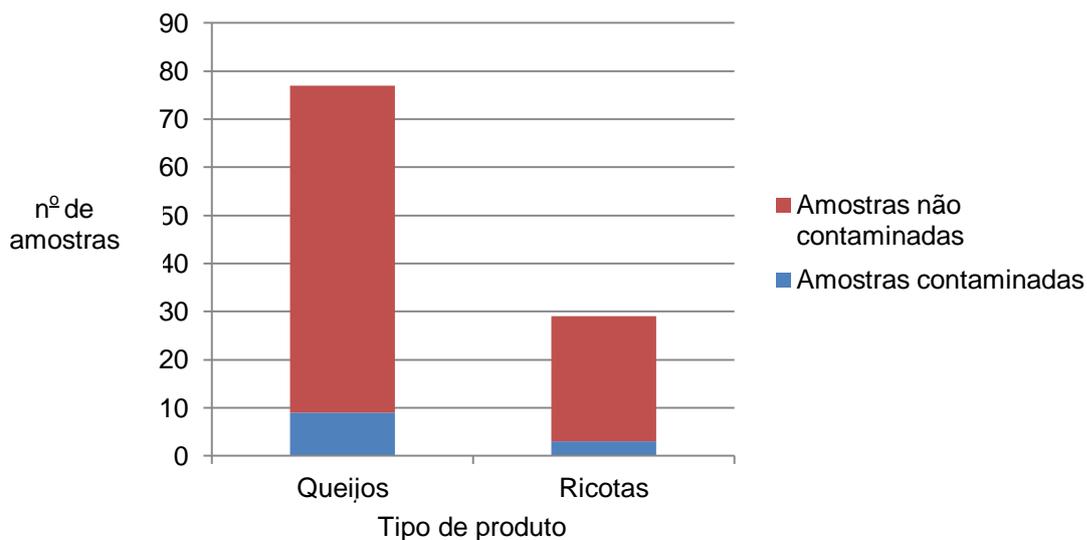


FIGURA 12 - RESULTADO DAS ANÁLISES DE QUEIJOS (77 unidades) E RICOTAS (29 unidades) PARA O GÊNERO *Listeria*

#### 4.1.2- Correlação entre marca do produto, tipo de inspeção e contaminação

Quanto ao tipo de inspeção, dos 26 fabricantes analisados, 12 sofriam inspeção do tipo SIM<sup>2</sup> (serviço de inspeção municipal) correspondendo a 39 amostras, sendo que 12,8% destas estavam contaminadas por *Listeria* spp., 9 fabricantes sofriam inspeção do tipo SIP (serviço de inspeção do Paraná) correspondendo a 46 amostras, sendo que 10,8% estavam contaminadas, e 5 fabricantes sofriam inspeção do tipo SIF (serviço de inspeção federal) correspondendo a 21 amostras, sendo que 8,0% destas estavam contaminadas (FIGURA 13).

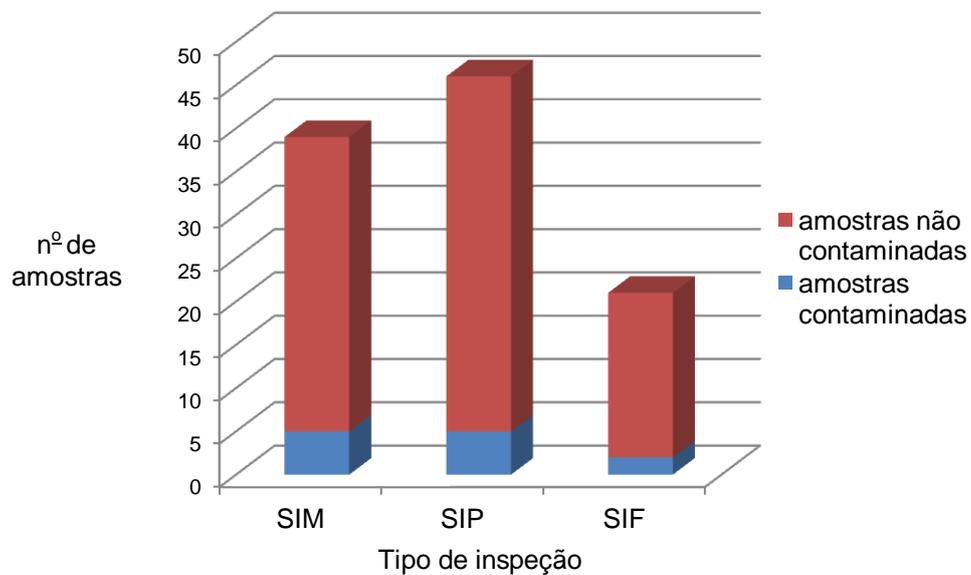


FIGURA 13 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS CONTAMINADAS SEGUNDO O TIPO DE INSPEÇÃO

Um total de 23% das marcas analisadas de queijos e ricotas (D, F, K, L, O e U) apresentou contaminação por *Listeria* spp. Das marcas contaminadas, duas (F, L) tinham registro do tipo SIM<sup>2</sup>, duas (D,O) registro do tipo SIP e duas (K, U) registro do tipo SIF. Um grande número de amostras contaminadas foi observado nas marcas F e O (37,5% e 33,3 % respectivamente), enquanto que as marcas K e D foram as que apresentaram menor número de amostras contaminadas (10% e 18,2% respectivamente). As marcas L e U, apesar de apresentarem taxa elevada (55,6%) este pode não refletir um dado real tendo em vista o pequeno número de amostras analisadas (FIGURA 14).

Cabe destacar que as marcas com inspeção federal foram as com menor porcentagem de amostras contaminadas enquanto que as marcas com inspeção municipal obtiveram o maior índice. Esses dados podem indicar uma maior rigidez da inspeção federal em relação aos demais sistemas de inspeção ou indicar uma melhor estrutura de boas práticas de produção destas empresas.

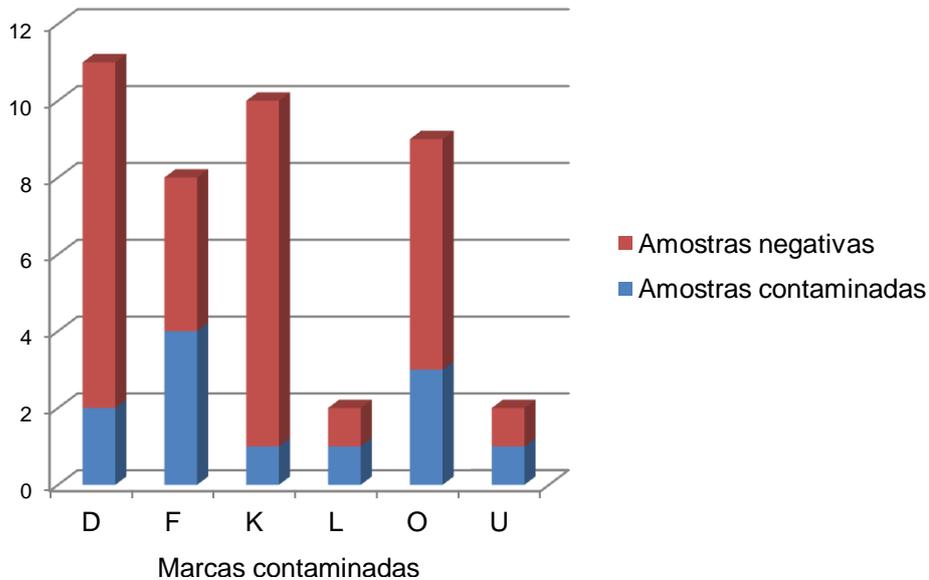


FIGURA 14 - COMPARAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO EM RELAÇÃO ÀS MARCAS ANALISADAS

#### 4.1.3- Amostras contaminadas considerando a região de origem

Analisando o número de amostras contaminadas por RS os resultados foram: 16,7% das amostras provenientes da 1ª RS cujo município de coleta foi Morretes; 10% da 2ª RS cujo município de coleta foi Campo Largo; 3,2% da 10ª RS cujo município de coleta foi Cascavel; 33,3% da 11ª RS cujo município de coleta foi Campo Mourão e 11,1% da 21ª RS cujo município de coleta foi Telêmaco Borba. As amostras provenientes da 11ª RS foram as que apresentaram o maior número de amostras contaminadas (FIGURA 15).

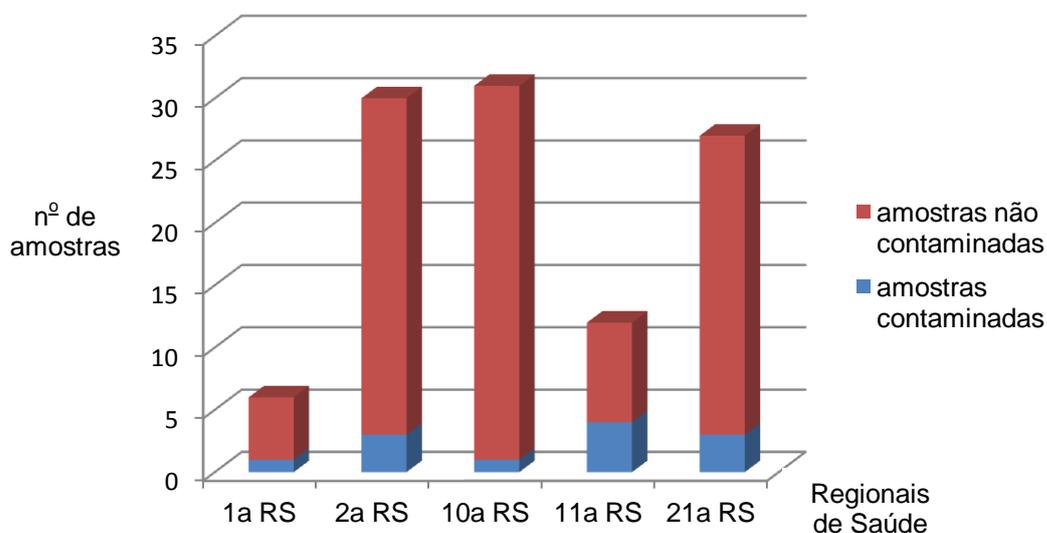


FIGURA 15 - AMOSTRAS CONTAMINADAS E NÃO CONTAMINADAS AGRUPADAS POR REGIONAL DE SAÚDE

Das 12 amostras contaminadas, 4 (33,3%) eram procedentes de Campo Mourão (11<sup>a</sup> RS), 3 (25%) de Campo Largo (2<sup>a</sup> RS), 3 (25%) de Telêmaco Borba (21<sup>a</sup> RS), 1 (8,3%) de Cascavel (10<sup>a</sup> RS) e 1 (8,3%) de Morretes (1<sup>a</sup> RS) (TABELA 2). Estes dados demonstram que a maior parte das amostras contaminadas veio de Campo Mourão.

TABELA 2 - DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS CONTAMINADAS

RS	Nº de amostras analisadas	Nº de amostras contaminadas	Município de coleta das amostras contaminadas
1 <sup>a</sup>	6	1	Morretes
2 <sup>a</sup>	30	3	Campo Largo
10 <sup>a</sup>	31	1	Cascavel
11 <sup>a</sup>	12	4	Campo Mourão
21 <sup>a</sup>	27	3	Telêmaco Borba
	<b>106</b>	<b>12</b>	

#### 4.2 - PESQUISA DE *Listeria* sp. PELOS DIFERENTES MÉTODOS

Com a utilização do método convencional, 11 amostras (10,4%) dentre as 106 analisadas foram presuntivas para *Listeria* sp. Destas, 5 (4,7%) foram identificadas pelo sistema API como *Listeria monocytogenes* (2 queijos e 3 ricotas), 4 (3,8%) como *Listeria seeligeri*, 1 (0,9%) *Listeria ivanovii* e 1 (0,9%) *Listeria innocua*. Todas as espécies não *monocytogenes* foram isoladas de amostras de queijos.

Nas provas de identificação bioquímica, todas as cepas isoladas apresentaram resultado positivo nas características do gênero *Listeria* (catalase positiva, motilidade em forma de guarda-chuva, bile-esculina positiva).

Observando apenas os resultados obtidos pelo sistema mini-VIDAS encontrou-se 10 (9,4%) amostras com positividade em pelo menos um dos 3 sistemas reagentes (LIS, LMO2 e LDUO). Em todos os casos houve confirmação posterior pelo isolamento em meios seletivos e confirmação bioquímica pelo sistema API a partir do enriquecimento secundário. Duas amostras (1 e 6) foram positivas nos 3 sistemas reagentes confirmando *Listeria monocytogenes*. Uma amostra (8) foi positiva pelos três sistemas reagentes (LIS, LMO2 e LDUO), porém no sistema LDUO-LMO não acusou a presença de *Listeria monocytogenes* (falso-negativo).

Entretanto, após o isolamento em meio seletivo a partir do caldo de enriquecimento secundário, a identificação pelo API confirmou *L. monocytogenes*. Três amostras (2,4 e 10) foram positivas apenas pelo sistema LIS e o sistema API *Listeria* identificou duas delas (2 e 4) como *L. seeligeri* e uma (10) como *L. ivanovii*. Duas amostras (11 e 12) foram positivas apenas pelo LDUO-LIS tendo como identificação pelo API *L. ivanovii* e *L. innocua*. Uma amostra (5) foi positiva para LIS e LDUO-LIS cuja identificação foi *L. seeligeri* e outra amostra (7) foi positiva para LIS e LMO2 e o sistema API identificou como *L. monocytogenes*. Portanto, o sistema mini-VIDAS permitiu identificar 4 amostras (3,8%) com *Listeria monocytogenes*, 3 (2,8%) com *Listeria seeligeri*, 2 (1,9%) com *Listeria ivanovii* e 1 (0,9%) com *Listeria innocua*. Todos os dados são apresentados no QUADRO 4.

Amostra	Conv.	Sistema mini-VIDAS				API <i>Listeria</i>
		LIS	LMO2	LDUO		
				LIS	LMO	
1	X	X	X	X	X	<i>L. monocytogenes</i>
2	X	X				<i>L. seeligeri</i>
3	X					<i>L. seeligeri</i>
4	X	X				<i>L. seeligeri</i>
5	X	X		X		<i>L. seeligeri</i>
6	X	X	X	X	X	<i>L. monocytogenes</i>
7	X	X	X			<i>L. monocytogenes</i>
8	X	X	X	X		<i>L. monocytogenes</i>
9	X					<i>L. monocytogenes</i>
10	X	X				<i>L. ivanovii</i>
11				X		<i>L. ivanovii</i>
12	X			X		<i>L. innocua</i>

QUADRO 4 - AMOSTRAS POSITIVAS PARA *Listeria* sp. CONSIDERANDO OS DIFERENTES MÉTODOS DE DETECÇÃO

Nota:

Conv. - Método convencional (ISO 11.290-1): crescimento em meio seletivo, catalase positiva, motilidade em forma de guarda-chuva, bile-esculina positiva

#### 4.3- COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS UTILIZADOS

Ao comparar os métodos que identificam o gênero *Listeria* (convencional, mini-VIDAS LIS e mini-VIDAS LDUO-LIS) das 106 amostras analisadas, 12 foram positivas em pelo menos um deles. O método convencional foi o sistema que apresentou maior número de resultados positivos (11 amostras), seguido do sistema mini-VIDAS LIS (8 amostras) e o mini-VIDAS LDUO-LIS sendo o sistema com menor detecção (6 amostras). Houve concordância de positividade entre estes três

métodos para apenas 4 das amostras (1, 5, 6 e 8). Considerando que as 12 amostras que apresentaram resultado positivo por algum dos métodos testados (convencional, mini-VIDAS LIS e LDUO-LIS) houve a confirmação da presença de *Listeria* por provas bioquímicas e API *Listeria* conclui-se, portanto que o sistema mini-VIDAS LIS falhou ao detectar a positividade de 4 amostras e o sistema mini-VIDAS LDUO-LIS falhou ao detectar 6 amostras (falsos-negativos). O método convencional apresentou apenas um falso-negativo, amostra essa com resultado positivo para o gênero *Listeria* pelo sistema LDUO-LIS (QUADRO 5). Estes resultados indicam que o método convencional foi mais sensível que o sistema mini-VIDAS LIS e este mais sensível que o mini-VIDAS LDUO-LIS.

Am	Marca	Convencional	mini-VIDAS LIS	mini-VIDAS LDUO-LIS	API
1	L	X	X	X	<i>L. monocytogenes</i>
2	F	X	X		<i>L. seeligeri</i>
3	F	X			<i>L. seeligeri</i>
4	F	X	X		<i>L. seeligeri</i>
5	F	X	X	X	<i>L. seeligeri</i>
6	O	X	X	X	<i>L. monocytogenes</i>
7	O	X	X		<i>L. monocytogenes</i>
8	O	X	X	X	<i>L. monocytogenes</i>
9	K	X			<i>L. monocytogenes</i>
10	D	X	X		<i>L. ivanovii</i>
11	D			X	<i>L. ivanovii</i>
12	U	X		X	<i>L. innocua</i>

QUADRO 5 - RESULTADOS DA PESQUISA DE *Listeria* EM AMOSTRAS DE QUEIJOS E RICOTAS DE DIFERENTES MARCAS PRODUZIDOS NO ESTADO DO PARANÁ UTILIZANDO DIFERENTES MÉTODOS

Nota: Em destaque, as amostras positivas nos 3 métodos.

Comparando os sistemas que identificam *Listeria monocytogenes* (convencional, mini-VIDAS LMO2 e mini-VIDAS LDUO-LMO), do total das amostras analisadas, 5 foram positivas em pelo menos um dos métodos. O método convencional foi capaz de detectar todas as amostras com *Listeria monocytogenes*. O sistema mini-VIDAS LMO2 resultou positivo para 4 amostras e o mini-VIDAS LDUO-LMO detectou 2 amostras positivas. Houve concordância de positividade entre todos os métodos para apenas 2 das amostras. Considerando que dentre as 5 amostras que apresentaram resultado positivo por algum dos métodos testados (convencional, mini-VIDAS LMO2 e LDUO-LMO) houve a confirmação de *Listeria monocytogenes* pelo sistema API, é possível concluir que o sistema mini-VIDAS

LMO2 falhou ao detectar a positividade de 1 amostra e o sistema mini-VIDAS LDUO-LMO falhou em detectar 3 amostras (falsos-negativos) (QUADRO 6).

Am	Marcas	Convencional	Mini-VIDAS LMO2	Mini-VIDAS LDUO-LMO	API
1	L	X	X	X	<i>L. monocytogenes</i>
6	O	X	X	X	<i>L. monocytogenes</i>
7	O	X	X		<i>L. monocytogenes</i>
8	O	X	X		<i>L. monocytogenes</i>
9	K	X			<i>L. monocytogenes</i>

QUADRO 6 - RESULTADOS DA PESQUISA DE *Listeria monocytogenes* EM AMOSTRAS DE QUEIJOS E RICOTAS DE DIFERENTES MARCAS PRODUZIDOS NO ESTADO DO PARANÁ UTILIZANDO DIFERENTES MÉTODOS

Nota: Em destaque, as amostras positivas nos 3 métodos.

Com a aplicação das equações de Beumer *et al.* (1991) destinadas à comparação da sensibilidade e especificidade entre as metodologias constatou-se 100% de especificidade para todos os métodos que identificam o gênero *Listeria* (Convencional, mini-VIDAS LIS e mini-VIDAS LDUO-LIS) uma vez que nenhum resultado falso positivo foi observado. Considerando que no universo de 106 amostras apenas 12 foram positivas, a sensibilidade foi de 92,3% para o método convencional, 75% para o mini-VIDAS LIS e 66,7% para o mini-VIDAS LDUO-LIS (TABELA 3).

TABELA 3 - VALORES FALSO-POSITIVOS E FALSO-NEGATIVOS CONSIDERANDO OS RESULTADOS OBTIDOS PELOS DIFERENTES MÉTODOS UTILIZADOS PARA IDENTIFICAR O GÊNERO *Listeria*.

Método	Amostras positivas	Amostras negativas	Amostras falso-negativas <sup>a</sup>	Amostras falso-Positivas	Total
Convencional	11	95	1	0	106
mini-VIDAS LIS	8	98	4	0	106
mini-VIDAS LDUO-LIS	6	100	6	0	106

a = Quando uma mesma amostra apresentou resultado positivo para *Listeria* spp. em um método e negativo em outro

O presente trabalho mostrou desempenho inferior de sensibilidade e superior de especificidade do sistema reagente mini-VIDAS LIS em relação ao método convencional quando comparado ao trabalho de Benetti (2009) que utilizou amostras de linguiças frescas e obteve sensibilidade de 96,7% e especificidade de 94,7%. O

mesmo foi observado no trabalho de Sewell *et al.* (2003) que analisou amostras naturalmente contaminadas frente ao método convencional e mini-VIDAS LIS. Seus resultados foram 98,1% de sensibilidade e 97% de especificidade enquanto a eficiência foi de 97,5%.

Gangar *et al.* (2000) compararam VIDAS LIS e o método tradicional de cultura para detecção de *Listeria* sp. em 6 tipos de alimentos, entre eles, queijos, contaminados artificialmente com diferentes concentrações da bactéria. Os resultados com o VIDAS-LIS foram tão bons quanto, ou melhores que os resultados obtidos pelo método tradicional. A taxa de falso negativo foi 10,3 e 13,5% para o VIDAS e o método de cultura, respectivamente. A taxa de falso positivo para o VIDAS-LIS foi 1,4%. A concordância entre o VIDAS-LIS e o método convencional para todas as amostras foi de 86%. Comparando com o presente trabalho observou-se também melhor desempenho, pois a taxa de falso-negativo foi de 2,8% e nenhum resultado falso-positivo foi encontrado. A concordância entre os dois métodos também foi superior (97,2%).

Em relação aos métodos que detectam *Listeria monocytogenes* (convencional, mini-VIDAS LMO2 e mini-VIDAS LDUO-LMO) constatou-se 100% de especificidade para todos uma vez que nenhum resultado falso positivo foi observado. Considerando que no universo de 106 amostras apenas 5 eram positivas a sensibilidade foi de 100,0% para o método convencional, 83,3% para o mini-VIDAS LMO2 e 62,5% para o mini-VIDAS LDUO-LMO (TABELA 4).

Trabalhos utilizando o sistema VIDAS LMO2 são os mais frequentes na literatura quando comparado ao VIDAS LIS e VIDAS LDUO. Este fato, provavelmente está relacionado à importância da espécie *Listeria monocytogenes*, sendo que o isolamento das demais espécies, na maioria das vezes, não é considerado relevante em alimentos.

TABELA 4 - VALORES FALSO-POSITIVOS E FALSO-NEGATIVOS CONSIDERANDO OS RESULTADOS OBTIDOS PELOS DIFERENTES MÉTODOS QUE IDENTIFICAM *Listeria monocytogenes*

Método	Amostras positivas	Amostras negativas	Amostras falso-negativas <sup>a</sup>	Amostras falso-positivas	Total
Convencional	5	101	0	0	106
mini-VIDAS LMO2	4	102	1	0	106
mini-VIDAS LDUO-LMO	2	104	3	0	106

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

O desempenho do sistema mini-VIDAS LMO2 é amplamente avaliado em trabalhos mostrando segurança na sua utilização como uma alternativa de praticidade e rapidez frente ao método convencional.

Maistro *et al.* (2012) ao comparar diferentes métodos rápidos, entre eles VIDAS LMO e o método convencional encontrou desempenho similar entre eles ao analisar amostras de legumes.

Reiter *et al.* (2010) comparou a sensibilidade de diferentes métodos para identificação de *Listeria monocytogenes* em carcaças de aves, vísceras, diferentes partes do frango, água e ambiente e encontrou menor sensibilidade com o método convencional comparado ao sistema VIDAS-LMO.

Oktay e Heperkan (2006) obteve desempenho superior ao presente trabalho com 100% de sensibilidade e especificidade. Eles analisaram queijos, manteigas e batatas cozidas pelo sistema VIDAS LMO e pelo método convencional (protocolo ISO11290-1). Seus resultados não acusaram diferença estatística entre os dois métodos, porém o sistema VIDAS mostrou-se mais eficiente para identificação de *Listeria monocytogenes* em amostras com contagens bacterianas baixas desta espécie.

Vaz-Velho *et al.* (2000) avaliou a eficácia do VIDAS LMO2 em amostras ambientais e de peixes frescos em paralelo com o método convencional ISO 11290-1. A sensibilidade foi de 73% e especificidade foi de 96%.

Trabalhos comparando o desempenho do sistema VIDAS LDUO a outros métodos de identificação são bastante escassos provavelmente pelo fato de ser um produto recente no mercado.

Temelli *et al.* (2012) pesquisou *Listeria sp.* e *Listeria monocytogenes* em produtos lácteos, entre eles queijos, pelo sistema VIDAS LDUO e ISO 11290-1 e encontrou concordância em todos os resultados.

Os resultados de sensibilidade obtidos no presente trabalho, em especial do sistema VIDAS LDUO podem ter sido prejudicados devido ao pequeno número de amostras positivas (12) onde qualquer falha de detecção gera resultados baixos. Outro fato a se considerar é que as amostras analisadas eram naturalmente contaminadas diferentemente de trabalhos de validação de equipamentos onde normalmente são utilizadas amostras artificialmente contaminadas, ou seja, a contaminação encontrada na amostra de análise já é conhecida. Além disso, existe o fato do contaminante não estar presente na amostra de forma homogênea, sendo assim, a porção utilizada na análise pode não conter a bactéria.

O presente trabalho apresenta resultados bastante concordantes quando comparado às publicações avaliadas. Devido ao pequeno número de amostras positivas em determinados grupos de comparação não é possível analisar os resultados estatisticamente sendo considerado nestes casos somente a estatística descritiva.

## 5- CONCLUSÃO

Um total de 11,3% das amostras obtidas de queijos frescos e ricotas estavam contaminadas com *Listeria* sp., sendo 4,7% com *L. monocytogenes*, 3,8% com *L. seeligeri*, 1,9% com *L. ivanovii* e 0,9% com *L. innocua*. Destas, 11,7% eram queijos e 10,3% ricotas. A análise estatística não acusou diferença de contaminação entre queijos e ricotas.

Das 26 marcas comerciais analisadas, 6 (D, F, K, L, O e U) apresentaram contaminação sendo que as amostras da marca F foram as mais contaminadas (37,5%).

Quanto ao tipo de inspeção, entre as marcas contaminadas 12,8% tinham registro SIM<sup>2</sup>, 10,8% tinham registro SIP e 8% tinham registro SIF. A marca que obteve menor porcentagem de amostras contaminadas (K) sofre inspeção federal enquanto que a marca com maior porcentagem (F) sofre inspeção municipal o que presume um rigor superior de inspeção no sistema federal seguido pelo estadual e o municipal.

Analisando o número de amostras contaminadas por Regional de Saúde, a 11<sup>a</sup> RS cujo município sede é Campo Mourão foi a que apresentou o maior número de amostras contaminadas.

Comparando os sistemas reagentes que identificam o gênero *Listeria* (convencional, mini-VIDAS LIS e LDUO-LIS), o método convencional foi o sistema que apresentou maior número de resultados positivos seguido do sistema mini-VIDAS LIS e o mini-VIDAS LDUO-LIS. Todos os métodos apresentaram 100,0% de especificidade e a sensibilidade foi de 92,3% para o método convencional, 75% para o mini-VIDAS LIS e 66,7% para o mini-VIDAS LDUO-LIS. Estes resultados indicam que o método convencional é mais sensível que o sistema mini-VIDAS LIS e este mais sensível que o mini-VIDAS LDUO-LIS.

Quanto aos métodos que identificam *Listeria monocytogenes*, o convencional foi capaz de detectar todas as amostras cuja bactéria estava presente seguido do sistema mini-VIDAS LMO2 e o mini-VIDAS LDUO-LMO. Todos os métodos obtiveram 100% de especificidade. Quanto a sensibilidade observou-se 100,0% para o método convencional, 83,3% para o mini-VIDAS LMO2 e 62,5% para o mini-VIDAS LDUO-LMO. Estes resultados indicam que o método convencional é mais sensível

que o sistema mini-VIDAS LMO2 é este mais sensível que o mini-VIDAS LDUO-LMO.

A incidência de 11,3% de *Listeria* sp. das amostras analisadas, sugere a necessidade de implementar ações de inspeção industrial e fiscalização por órgãos competentes nos produtos produzidos e comercializados por estas empresas, haja visto que uma vez que estes micro-organismos adentram às plantas industriais dificilmente são eliminados, além da *L. monocytogenes* representar um sério risco à saúde da população. Igualmente, é preciso alertar as autoridades de saúde e o público em geral para o risco de listeriose, em particular para gestantes, recém-nascidos, imunodeprimidos e idosos que constituem a população mais vulnerável.

A profunda transformação do modo de vida dos países industrializados, marcadamente pela utilização mais frequente da cadeia de frios, contribui indubitavelmente para um aumento da contaminação dos alimentos por micro-organismos psicotróficos. Desta forma, a redução do grau de contaminação de matérias-primas e um programa adequado de higiene e sanitização, consistem medidas básicas de prevenção na linha de produção dos alimentos.

Com base nos resultados encontrados sugere-se a utilização do sistema VIDAS LIS em amostras de alimentos para triagem, uma vez que seus resultados são obtidos dentro de 2 dias e os produtos podem ser liberados para comercialização, fato este, bastante importante para as indústrias produtoras de alimentos com curta vida de prateleira. Como as metodologias de análise do sistema VIDAS LIS e LMO2 são semelhantes (mesmos caldos de enriquecimento e temperaturas de incubação), sugere-se a utilização do VIDAS LMO2 somente para as amostras positivas pelo sistema LIS reduzindo custo de insumos. Vale ressaltar que todas as amostras positivas pelo sistema VIDAS devem ser confirmadas pelo método convencional.

Quanto ao sistema VIDAS LDUO observou-se resultados inferiores ao LIS e LMO2 além da desvantagem de utilizar caldo de enriquecimento diferente dos demais métodos aumentando o custo para o laboratório.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, W. M. **Método de detecção e ocorrência de Listeria monocytogenes e de outros microrganismos em queijos comercializados no estado do Paraná.** 2008. Doutorado (Ciências Farmacêuticas). Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- ANONYMOUS (1985). Epidemiologic notes and reports Listeriosis outbreak associated with Mexican-style cheese - California. CDC-MMWR, 34: 357-359. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00000562.htm>. Acesso em: 20 fev. 1999.
- ARAÚJO, W. D. et al. Isolamento e identificação de coliformes no queijo Minas comercializado na região metropolitana de Salvador/Bahia. **Rev. Bras. Saúde e Prod. Animal**, v.2, n. 2, 2001.
- AZNAR, R.; SOLÍS, I. PCR Detection of Listeria monocytogenes in different Food Products compared with the mini-VIDAS LMO System and the Standard Procedure ISO 11290-1. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 1, n. 2, p. 115-120, 2006.
- BAHK, J.; MARTH, E. H. **Listeriosis and Listeria monocytogenes.** 1. Food Institute, WHO: University of Wisconsin Madison, 1990.
- BARANCELLI, G. V. et al. Incidence of Listeria monocytogenes in cheese manufacturing plants from the northeast region of Sao Paulo, Brazil. **J Food Prot**, v. 74, n. 5, p. 816-9, 2011.
- BENETTI, T. M. **Métodos de detecção e Incidência de Listeria sp e Salmonella sp em linguças resfriadas comercializadas no Estado do Paraná.** 2009. (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia do Departamento de Patologia Básica - Setor de Ciências Biológicas Universidade Federal do Paraná, CURITIBA.
- BERNARDY , T. L., FONSECA SH, PIANTA C. . Isolamento e classificação de espécies de Listeria em queijos tipo colonial da região Centro-Serra do Estado do Rio Grande do Sul. . **Veterinária em Foco**, v. 4 (1), p. 45-52, 2006.
- BEUMER, R. R. B., E.; ROMBOUTS, F.M. . Enzyme-linked immunoassays for the detection of Salmonella sp: a comparison with other methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, p. 363-374, 1991.
- BEZERRA, J. R. M. V. **Tecnologia da fabricação de derivados do leite.** Editora UNICENTRO, 2008. ISBN 8589346676.
- BILLE, J. (1990). Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. In: Foodborne listeriosis. Miller, A.J., Smith J.L., and Somkuti

G.A. (Eds), Society for Industrial Microbiology, Elsevier Science Publishing Inc., New York.

BILLE, J. *et al.* Outbreak of human listeriosis associated with Tomme cheese in Northwest Switzerland, 2005. **Euro. Surveill.**, v. 11, p. 91-93, 2006.

BIOMERIEUX. Disponível em:

[http://www.biomerieux.com.br/servlet/srt/bio/brazil/dynPage?doc=BRZ\\_CLN\\_PRD\\_G\\_PRD\\_CLN\\_67&utm\\_source=Teaser\\_EBV&utm\\_medium=Teaser\\_EBV&utm\\_campaign=Teaser\\_EBV](http://www.biomerieux.com.br/servlet/srt/bio/brazil/dynPage?doc=BRZ_CLN_PRD_G_PRD_CLN_67&utm_source=Teaser_EBV&utm_medium=Teaser_EBV&utm_campaign=Teaser_EBV), Acesso em: 20 nov. 2013.

BOGGS, J.D. *et al.* Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese - North Carolina, October 2000 - January 2001. CDC-MMWR, v. 50, p. 560-562, 2001.

BORGES, M. F.; ANDRADE, A. P. C.; ARCURI, E. F.; KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y. *Listeria monocytogenes* em leite e produtos lácteos. **Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos**, v. 119, 2009.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. **Resolução RDC n. 12 de 02 de janeiro de 2001. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.** Brasília, DF: Diário Oficial da República Federativa do Brasil. 2001.

BULA, C. J.; BILLE, J.; GLAUSER, M. P. An epidemic of food-borne listeriosis in western Switzerland: description of 57 cases involving adults. **Clin Infect Dis**, v. 20, n. 1, p. 66-72, 1995.

CAGRI-MEHMETOGLU, A. *et al.* Incidence of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in two Kasar Cheese processing environments. **Food Control**, v. 22, n. 5, p. 762-766, 2011.

CALLAWAY, J. R. **Development of a Rapid Detection Assay for *Listeria monocytogenes* on Ready-to-Eat Meat, Food-Contact and Non-Contact Surfaces.** 2009. Colorado State University

CARRIEDO, G. (2003). Mexican cheese may cause listeriosis. News release from the city of Laredo Health Department. Disponível em:

<http://www.ci.laredo.tx.us/health/News/08-20-03MexicanCheese/Mexican%20Cheese.htm>. Acesso em: 27 ago. 2010.

CARRIQUE-MAS, J. J. *et al.* Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese - an outbreak of listeriosis? **Epidemiol. Infect.**, v. 130, p. 79-86, 2003.

CDC. Disponível em: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-02-14/> Acesso em: 25 abr. 2014.

Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. "Alexandre Vrajac" (CVE). **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Água e Alimentos**. São Paulo 2008.

Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional (CNSAN). **NBR 11.346. Lei de Segurança Alimentar e Nutricional** 2006.

CRUZ, C. D.; MARTINEZ, M. B.; DESTRO, M. T. Listeria monocytogenes: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 2, p. 195-206, 2009.

CRUZ, C. D. et al. Comparing rapid methods for detecting Listeria in seafood and environmental samples using the most probably number (MPN) technique. **Int J Food Microbiol**, v. 153, n. 3, p. 483-7, 2012.

DANIELSSON-THAN, M. L. et al. Causes behind a human cheese-borne outbreak of gastrointestinal listeriosis. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 1, p. 153-159, 2004.

DA SILVA, M. C.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of Listeria monocytogenes in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **J Food Prot**, v. 61, n. 3, p. 354-6, 1998.

DE ALMEIDA, J. C. et al. Perfil epidemiológico de casos de surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridos no Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 1, p. 97-106, 2013.

DEL NOBILE, M. A.; CONTE, A.; INCORONATO, A. L.; PANZA, O. Modified atmosphere packaging to improve the microbial stability of Ricotta. *African Journal of Microbiology Research*, v. 3, n. 4, p. 137-142, 2009.

DE MEDICI, D. et al. Comparison between ICS-Vidas, MSRV and standard cultural method for Salmonella recovery in poultry meat. **Int J Food Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 205-10, 1998.

DESTRO, M. T. **Listeria monocytogenes na cadeia produtiva de alimentos: da produção primária ao consumidor final**. 2006. (Tese). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DIRECTORATE, F. Policy on Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods. **Health Products and Food Branch, Health Canada, Ottawa, Ontario**, 2011.

DONNELLY, C.W. Conventional methods to detect and isolate Listeria monocytogenes. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis, and food safety**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1999. p.225-260.

DUARTE, D. et al. Pesquisa de Listeria monocytogenes e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo-coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arq. Inst. Biol**, v. 72, n. 3, p. 297-302, 2005.

EMBRAPA - Gado de Leite. Disponível em:

- <http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/producao.php>. 2010. Acesso em: 18 jun. 2012.
- FAEP. Disponível em:  
<http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/producao.php>. Acesso em: 13 jul. 2012.
- FARBER, J. M. et al. Characteristics of nonpathogenic strains of *Listeria monocytogenes*. **Can J Microbiol**, v. 37, n. 8, p. 647-50, 1991.
- FOX, E. et al. *Listeria monocytogenes* in Irish Farmhouse cheese processing environments. **Int J Food Microbiol**, v. 145, p. S39-S45, 2011.
- FRETZ, R. et al. Listeriosis outbreak caused by acid curd cheese Quargel, Austria and Germany 2009. **Euro Surveill**, v. 15, n. 5, 2010.
- GANGAR, V. et al. VIDAS® Enzyme-Linked Immunofluorescent Assay for Detection of *Listeria* in Foods: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v. 83, n. 4, p. 903-918, 2000.
- GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P. M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiol Rev**, v. 29, n. 5, p. 851-75, 2005.
- GAULIN, C. et al. First documented outbreak of *Listeria monocytogenes* in Quebec, 2002. **Can. Commun. Dis.Rep.**, v. 29, p.181-186, 2003.
- GODSHALL, C. E.; SUH, G.; LORBER, B. Cutaneous Listeriosis. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 11, p. 3591-3596, 2013.
- GOULET, V. et al. Listeriosis from consumption of raw-milk cheese. **Lancet**, v. 345, n. 8964, p. 1581-2, 1995.
- GOVARIS, A.; KOIDIS, P.; PAPANICOLAOU, K. The fate of *Escherichia coli* O157:H7 in Myzithra, Anthotyros, and Manouri whey cheeses during storage at 2 and 12°C. **Food Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 565-570, 2001.
- HEICK, J. W. M.; JIMENEZ-FLORES, R.; KHALIL, H. Whey ricotta: A scientific reevaluation. **Journal Of Dairy Science**, v. 93, p. 332-332, 2010.
- JACQUET, C. et al. La listériose humaine en France en 1997. Données du Centre National de Référence des *Listeria*. **Bull. Epidémiol. Hébdomadaire**, v. 33, p. 142-143, 1998.
- JADHAV, S.; BHAVE, M.; PALOMBO, E. A. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. **J Microbiol Methods**, v. 88, n. 3, p. 327-41, 2012.
- JAY, J. M. Listerioses de origem animal. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia de alimentos**, Porto Alegre: Artmed, 2005, cap. 25, p. 517-542.

- JENSEN, A.; FREDERIKSEN, W.; GERNER-SMIDT, P. Risk factors for listeriosis in Denmark, 1989-1990. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 26, p. 171-178, 1994.
- JOHNSON, R. L.; JECHOREK, R. P. Evaluation of VIDAS Listeria species Xpress (LSX) immunoassay method for the detection of Listeria species in foods: collaborative study. **J AOAC Int**, v. 94, n. 1, p. 159-71, 2011.
- KIRK, M.D. et al. Foodborne disease in Australia: the OzFoodNet experience. **Clinical infectious diseases**, v. 47, n. 3, p. 392-400, 2008.
- KONEMAN, E. W. E. A. **Diagnóstico Microbiológico**. 5 ed. Rio de Janeiro: 2001.
- KOUSTA, M. et al. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. **Food Control**, v. 21, n. 6, p. 805-815, 2010.
- LAMBERTZ, S. T. et al. Prevalence and level of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods in Sweden 2010. **Int J Food Microbiol**, v. 160, n. 1, p. 24-31, 2012.
- LAPENDA, A. M. V. D. S. **Ocorrência de Listeria spp. em Embutidos Resfriados Comercializados na Cidade do Recife - PE**. 2010. (Mestrado). Departamento de Economia Doméstica, Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- LINNAN, M.J. et al. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *N. Eng. J. Med.*, v. 319, p. 823-828, 1988.
- LISTERIA. Disponível em: <http://newspaper.li/listeria/>. Acesso em: 25 jan. 2014.
- LOMBARD, B.; GOMY, C.; CATTEAU, M. Microbiological analysis of foods in France: standardized methods and validated methods. **Food Control**, v. 7, n. 1, p. 5-11, 1996.
- LUNDÉN, J.; TOLVANEN, R.; KORKEALA, H. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. E6-E12, 2004.
- MACDONALD, P. D. et al. Outbreak of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese. **Clin Infect Dis**, v. 40, n. 5, p. 677-82, 2005.
- MAKINO, S. I. et al. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 104, p. 189-196, 2005.
- MAISTRO, L. C. et al. Microbiological quality and safety of minimally processed vegetables marketed in Campinas, SP–Brazil, as assessed by traditional and alternative methods. **Food Control**, v. 28, n. 2, p. 258-264, 2012.
- MENA, C. et al. Incidence of Listeria monocytogenes in different food products commercialized in Portugal. **Food Microbiol**, v. 21, n. 2, p. 213-216, 2004.

MILKPOINT. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/espaco-aberto/producao-de-lacteos-no-brasil-47940n.aspx>. Acesso em: 30 jan. 2013.

Ministère de la santé et des services sociaux du Québec (MSSS). (2009). Listériose. Disponível em: <http://www.msss.gouv.qc.ca/sujets/santepub/listeriose.php#situation>. Acesso em: 27 ago. 2010.

Equipo Automático para la Detección de Patógenos mini-VIDAS-VIDAS (VIDAS). Disponível em: <http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/> 2012. Acesso em: 12 jun. 2012.

NORRUNG, B.; ANDERSEN, J. K.; SCHLUNDT, J. Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. **Int J Food Microbiol**, v. 53, n. 2-3, p. 195-203, 1999.

OKTAY, H. M.; HEPERKAN, D. Evaluation of ISO Method and VIDAS automated System for Identifying *Listeria* and *Salmonella* in Selected Foods. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v. 14, p. 133-145, 2006.

OOI, S. T.; LORBER, B. Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. **Clin Infect Dis**, v. 40, n. 9, p. 1327-32, 2005.

ORDONEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos**. Porto Alegre: 2005.

OSAILI, T. M. et al. Occurrence and Antimicrobial Susceptibility of *Listeria monocytogenes* Isolated from Brined White Cheese in Jordan. **Journal of food science**, v. 77, n. 9, p. M528-M532, 2012.

OXOID. Disponível em:

<http://www.oxid.com/uk/blue/press/press.asp?art=Y&arch=Y&pRef=PR026906&c=uk&lang=en&yr=2006>. Acesso em: 24 jan. 2013.

PAGOTTO, F. et al. Canadian Listeriosis Reference Service. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 3, p. 132-137, 2006.

PALCAM. Disponível em: [http://www.flickr.com/photos/natasha\\_lee82/2404286317/](http://www.flickr.com/photos/natasha_lee82/2404286317/). Acesso em: 25 jan. 2014.

PARANÁ-ONLINE. Disponível em: <http://www.parana-online.com.br/editoria/economia/news/448837/?noticia=O%2BQUEIJO%2BE%2BUM%2BDOS%2BINGREDIENTES%2BMAIS%2BRESPEITADO>. Acesso em: 30 jan. 2013.

PERES, N.; LANGE, C.C.; BRITO, M.A.V.; BRITO, J.R.; ARCURI, E.F.; CERQUEIRA, M.M.O. Detecção de *Listeria monocytogenes* pela técnica de PCR em leite contaminado artificialmente; Detection of *Listeria monocytogenes* by PCR in artificially contaminated milk samples. **Arq. bras. med. vet. zootec**, v. 62, n. 4, p. 973-979, 2010.

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

PINTADO, C. et al. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. **Food Microbiol**, v. 22, n. 1, p. 79-85, 2005.

PINTADO, M. E.; MACEDO, A. C.; MALCATA, F. X. Review: Technology, chemistry and microbiology of whey cheeses. *Food Science and Technology International*, v. 7, p. 105-116, 2001.

PINTO, S. M., SALING S, MOURA AC. . Qualidade microbiológica de queijo minas frescal comercializado no município de Santa Helena, PR, Brasil. **Arq. Inst. Biol**, v. 78 (2), p. 191-198, 2011.

PIRISI, A.; COMUNIAN, R.; URGEGHE, P. P.; SCINTU, M. F. Sheep's and goat's dairy products in Italy: Technological, chemical, microbiological, and sensory aspects. *Small Ruminant Research*, v. 101, p. 102-112, 2011.

PRO-ANALISE (2014). Disponível em: [http://www.pro-analise.com.br/produtos/10977/aloa\\_agar\\_detec\\_o\\_listeria\\_monocytogenesprocurar\\_figura\\_do\\_ALOA\\_e\\_mudar\\_a\\_fonte](http://www.pro-analise.com.br/produtos/10977/aloa_agar_detec_o_listeria_monocytogenesprocurar_figura_do_ALOA_e_mudar_a_fonte). Acesso em: 25 abr. 2014.

REIS, C. M. et al. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* human strains isolated from 1970 to 2008 in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 2, p. 173-6, 2011.

REITER, M. G.; LÓPEZ, C.; JORDANO, R. Comparative Study of Alternative Methods for Food Safety Control in Poultry Slaughterhouses. **Food Anal. Methods**, v. 3, p. 253–260, 2010.

ROCOURT, J. *et al.* La listériose humaine en France en 1995 et 1996. Données du Centre National de Références des *Listeria*. *Bull. Epidémiol. Hébdomadaire*, v.41, p. 186-187, 1997.

ROCOURT, J. **The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification** 2.ed. 1999.

RODRIGUES, D. A. et al. Avaliação da eficiência de três ágaros seletivos no isolamento de *Listeria monocytogenes*. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 23, p. 87-92, 2003.

SANSONETTI, S.; CURCIO, S.; CALABRO, V.; IORIO, G. Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. *Biomass and bioenergy*, v. 33, p. 1687-1692, 2009.

SANTOS, S. P.; FRANCO, R. M. Resistência antimicrobiana de bactérias do gênero *Listeria* spp. isoladas de carne moída bovina. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci**, v. 45, n. 2, p. 116-121, 2008.

Secretaria da Saúde (SESA) - Governo do Estado do Paraná. Disponível em: <http://www.sesa.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php>. 2013. Acesso em: 24 abr. 2013.

Secretaria de Vigilância em saúde (SVS). Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos. Disponível em: <http://foodsafetybrazil.com/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-2013>. Acesso em: 21 jan. 2014.

SEELIGER, H.P.R.; JONES, D. Genus *Listeria*. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 9 ed., Baltimore: Williams&Wilkins, v.2, p. 1235-45, 1986.

SEWELL, A. M. et al. The development of an efficient and rapid enzyme linked fluorescent assay method for the detection of *Listeria* spp. from foods. **Int J Food Microbiol**, v. 81, n. 2, p. 123-9, 2003.

SILVA, A. S., ARAGON, C. C., SANTANA, E. H. W., DESTRO, M. T., COSTA, M. R., ALEGRO, L. C. A. . *Listeria monocytogenes* em Leite e Produtos Lácteos no Brasil: Uma Revisão. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde** v. 13(1), p. 59-67, 2011.

SILVA, N.J.V., SILVEIRA N.F.A., TANIWAKI, N.H., SANTOS, R.F.S., GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4 ed. São Paulo, SP: 2010.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 10, p. 1236-1243, 2007.

TEPELLI, S. A., Z. ANAR, S. CARL, K. T. EYGOR, A. Detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in retail dairy products using the Vitek immunodiagnostic assay system LDUO method and ISO method 11290-1. **CAB Abstracts** v. 67, n. 4, p. 374-377, 2012.

UEDA, S.; KUWABARA, Y. Evaluation of an enzyme-linked fluorescent assay for the detection of *Listeria monocytogenes* from food. **Biocontrol Sci**, v. 15, n. 3, p. 91-5, 2010.

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. **J Microbiol Methods**, v. 40, n. 2, p. 147-51, 2000.

VECCHIA, J. D. O., M. G; GANDRA, T. K.; IGLESIAS, M. A.; SILVA, W. P. . **Ocorrência de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* em carcaças bovinas monitoradas em frigoríficos-batedouros com distintos níveis de inspeção.** XX Congresso de iniciação científica, III Mostra científica: UFPEL 2011.

WALKER, R. L. et al. Comparison of VIDAS enzyme-linked fluorescent immunoassay using Moore swab sampling and conventional culture method for *Salmonella* detection in bulk tank milk and in-line milk filters in California dairies. **Int J Food Microbiol**, v. 67, n. 1-2, p. 123-9, 2001.

WELKER, C. A. D. BOTH, J.M.C.; LONGARAY, S.M.H.; SOEIRO, S.; TIBA, M.L.; RAMOS, R.C. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 1, 2010.

WING, E. J.; GREGORY, S. H. *Listeria monocytogenes*: clinical and experimental update. **Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. Supplement 1, p. S18-S24, 2002.

YOLKEN, R. H.; STOPA, P. J. Enzyme-linked fluorescence assay: Ultrasensitive solid-phase assay for detection of human rotavirus. **J Clin Microbiol**, v. 10, n. 3, p. 317-21, 1979.

ZUNABOVIC, M. et al. Monitoring transmission routes of *Listeria* spp. in smoked salmon production with repetitive element sequence-based PCR techniques. **J Food Prot**, v. 75, n. 3, p. 504-11, 2012.