

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**OCORRÊNCIA DE *Listeria monocytogenes*  
(MURRAY, 1911) EM QUEIJOS ARTESANAIS  
COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE  
MANAUS - AM**

**VICTORIA TERESA DE MORAIS GUEDES**

**Manaus  
2003**

**VICTORIA TERESA DE MORAIS GUEDES**

**OCORRÊNCIA DE *Listeria monocytogenes*  
(MURRAY, 1911) EM QUEIJOS ARTESANAIS  
COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE  
MANAUS – AM.**

Dissertação apresentada no Programa  
de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos  
da Universidade Federal do Amazonas,  
como parte dos requisitos para a obtenção do  
Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

ORIENTADORA: Dra. Ângela Líbia de Melo Pereira Cardoso

**MANAUS  
2003**

**VICTORIA TERESA DE MORAIS GUEDES**

**OCORRÊNCIA DE *Listeria monocytogenes*  
(MURRAY, 1911) EM QUEIJOS ARTESANAIS  
COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE  
MANAUS – AM.**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Ângela Líbia de Melo P. Cardoso – Orientadora  
Universidade Federal do Amazonas

Profa. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira  
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Antônio José Inhamuns da Silva  
Universidade Federal do Amazonas

Manaus  
2003

Ao meu pai, meu melhor exemplo de  
dedicação e meu maior incentivador –  
“pai”trocínio,

À minha mãe, o meu verdadeiro presente de  
Deus,

Ao mano Marcelo, meu herói,

Ao mano Ricardo, meu filho primeiro,

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

À Deus.

À Profa. Dra. Ila Maria de Aguiar Oliveira pelos conselhos oportunos, cuidados e atenção nas horas mais inesperadas deste Mestrado.

À Profa. Dra. Ângela Lúbia Cardoso, pela orientação e sugestões.

À minha amiga Hellen Souza pela confiança, atenção e conselhos.

Ao Nidison, meu companheiro de coletas, análises e de longos finais de semana dedicados ao laboratório.

Ao Nonato, pelo cuidado e gentileza com que tem me conduzido em seu taxi a todos os lugares sem demora ou aborrecimento.

A Edna Calheiros por me lembrar de comer e dormir nas horas em que eu fiquei mais preocupada.

Ao meu aluno e futuro colega Francisco Roque da Silva e seus pais, pela atenção, pelas fotos e pelos esclarecimentos obtidos.

Aos senhores Geovan Alves, Jonvan Alves e Francisco Simplício pela atenção na visita à fábrica de queijos.

Aos colegas do Mestrado, pelos aprendizados em conjunto e trocas de experiências tão valiosas.

Aos professores do curso pela elucidação de assuntos tão importantes para o meu desenvolvimento profissional.

Ao Prof. MsC. Januário Gama dos Santos, pela oportunidade de Estágio à Docência e por revelar a mim, o outro lado da sala de aula.

A Cristiany, que me co-orientou no Estágio à Docência, pelas dicas imprecidíveis.

À Universidade Federal do Amazonas pela possibilidade de crescimento.

À CAPES pela bolsa de estudo e materiais indispensáveis ao meu projeto.

E a todos que, de algum modo, acrescentaram e contribuíram para realização deste trabalho.

Guedes, Victoria Teresa de Moraes

Ocorrência de *Listeria monocytogenes* (Murray, 1911) em queijos artesanais comercializados na cidade de Manaus – AM./ Victoria Teresa de Moraes Guedes – Manaus: UFAM, 2003.

87 p. ilustr. 30cm

Dissertação de Mestrado

1. Queijos artesanais
  2. *Listeria monocytogenes*
  3. *Listeria monocytogenes* – Ocorrência – Queijo
- I. Título

CDU 637.3(616-022.1): 579.67(811.3)

(...)  
Tivesse quem me criou  
O mundo desejado  
Que eu fosse outro que sou,  
Ter-me-ia outro criado.

Deu-me olhos para ver  
Olho, vejo, acredito.  
Como ousarei dizer:  
Cego, fora eu bendito?

Como o olhar, a razão  
Deus me deu, para ver  
Para além da visão –  
Olhar de conhecer.  
(...)

(Fernando Pessoa)

## SUMÁRIO

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUÇÃO                                                                             | 14 |
| 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA                                                                | 18 |
| 1.1 Considerações Gerais sobre a Produção de Queijos                                   | 18 |
| 1.2 A Microbiota do Queijo                                                             | 19 |
| 1.2.1 Microbiota Normal                                                                | 19 |
| 1.2.2. Microbiota Patogênica                                                           | 20 |
| 1.3. Características dos Queijos                                                       | 23 |
| 1.4 Características da <i>Listeria monocytogenes</i>                                   | 24 |
| 1.4.1 Taxonomia e Identificação                                                        | 24 |
| 1.4.2 Fisiologia e Patogênese da <i>Listeria monocytogenes</i>                         | 27 |
| 1.4.3 Virulência e Patogenicidade                                                      | 33 |
| 1.4.4 Habitat da <i>Listeria</i> spp.                                                  | 35 |
| 1.4.5 Sintomatologia da Listeriose                                                     | 36 |
| 1.4.6 Epidemiologia                                                                    | 40 |
| 2 MATERIAIS E METODOLOGIA                                                              | 50 |
| 2.1 Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>                                          | 50 |
| 2.1.1 Amostragem                                                                       | 50 |
| 2.1.2 Tratamento das Amostras                                                          | 50 |
| 2.1.3 Análise Microbiológica                                                           | 51 |
| 2.2 Pesquisa de coliformes totais, fecais e <i>Escherichia coli</i> em queijo Manteiga | 53 |
| 2.2.1 Análise Microbiológica                                                           | 53 |
| 3. Resultados                                                                          | 56 |
| 3.1. Isolamento de bactérias nos queijos Coalho, Manteiga e Mussarela                  | 56 |
| 3.2. Caracterização dos isolados bacterianos em meio seletivo.                         | 57 |
| 3.2 Pesquisa de Coliformes totais, coliformes fecais e <i>Escherichia coli</i> .       | 58 |
| 3.2.1 Teste confirmativo para Coliformes totais.                                       | 58 |
| 3.2.2. Teste confirmativo para coliformes fecais.                                      | 58 |
| 3.2.2. Teste confirmativo de <i>Escherichia coli</i> pelo Método Tradicional           | 59 |
| 4. Discussão                                                                           | 60 |
| 5. CONCLUSÃO                                                                           | 72 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS                                                             | 73 |

## LISTA DE TABELAS:

|                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Características para diferenciação de ambos os gêneros <i>Listeria</i> spp e <i>Murraya</i> spp.                                                                   | 26 |
| Tabela 2. Quantitativo das amostras de queijo artesanais comercializados na cidade de Manaus e o aspecto macromorfológico de colônias bacterianas em Ágar OXA e Ágar PALCAM. | 57 |
| Tabela 3. Valores de NMP/g para coliformes totais encontrados nas amostras de queijo Manteiga.                                                                               | 58 |

## LISTA DE QUADROS:

|                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1. Principais fontes de contaminação do leite, enfermidades produzidas e microorganismos causadores de tais enfermidades. | 21 |
| Quadro 2. Agentes patogênicos presentes em leite e derivados.                                                                    | 22 |
| Quadro 3. Presença de <i>Listeria</i> spp. em vários tipos de queijos envolvidos em surtos em diversos lugares.                  | 47 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Representação esquemática do úbere bovino, mostrando as estruturas pelas quais o leite flui e que normalmente são contaminadas com microorganismos. | 19 |
| Figura 2. Ciclo de vida intracelular da <i>Listeria monocytogenes</i> durante o processo de infecção de macrófagos.                                           | 28 |
| Figura 3. Esquema representativo da fisiopatologia da Listeriose.                                                                                             | 37 |
| Figura 4. Fluxograma da metodologia para isolamento de <i>Listeria monocytogenes</i> adaptada do BAM (2001) e do APHA (1992).                                 | 53 |
| Figura 5. Metodologia aplicada para pesquisa de coliformes totais, fecais e <i>Escherichia coli</i> .                                                         | 55 |
| Figura 6. Percentual quantitativo e aspecto de colônias bacterianas em Ágar OXA e Ágar PALCAM.                                                                | 57 |
| Figura 7. Percentual de valores de número mais provável de microorganismos por grama de queijo Manteiga para o teste de coliformes totais.                    | 59 |
| Figura 8. Esquema mostrando a produção do queijo Manteiga numa pequena fábrica rudimentar em um município do Estado do Amazonas                               | 63 |
| Figura 9. Detalhe da utilização das mãos para lavagem da massa acidificada durante o processo de produção do queijo Manteiga.                                 | 66 |
| Figura 10. Manteiga estocada em sala separada para utilização na preparação dos queijos.                                                                      | 66 |
| Figura 11. Local de descanso dos queijos sobre mesa de madeira.                                                                                               | 67 |
| Figura 12. Animais criados em ambiente externo à fábrica e que têm acesso a mesma quando soltos.                                                              | 67 |
| Figura 13. Pasto alagado durante o período de cheia rio, mais da metade do pasto fica submersa e o gado é levado para as partes mais altas do terreno.        | 68 |
| Figura 14. Proprietário da fazenda recolhendo a canarana que serve de alimento para os animais da fazenda que permaneceram na área de várzea.                 | 68 |
| Figura 15. Animais magros na área alagada alimentado-se de canarana, vegetação aquática encontrada na área de várzea do município de Careiro da Várzea.       | 68 |
| Figura 16. Banca localizada em uma feira da cidade de Manaus, onde os queijos são comercializados junto com outros produtos.                                  | 69 |
| Figura 17. Queijo exposto ao sol à direita na foto, próximo a uma banca de venda de tucupi                                                                    | 69 |
| Figura 18. Consumidor comprando queijos em uma banca de uma feira.                                                                                            | 70 |
| Figura 19. Queijo Mussarela embalados em redes de plástico e pendurados expostos para comercialização em uma feira do município de Manaus.                    | 70 |
| Figura 20. Vendedor sentado atrás do balcão de uma banca de queijos atendendo consumidora à direita.                                                          | 71 |

## RESUMO

A ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijos artesanais tipo Coalho, Manteiga e Mussarela comercializados na cidade de Manaus - AM foi pesquisada. A coleta das 39 amostras dos queijos artesanais foi feita de modo aleatório em feiras livres e ocorreram no período de maio a agosto de 2002. As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia. A metodologia aplicada a esta pesquisa foi adaptada do *Bacteriological Analytical Manual* (BAM, 2001) e do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (APHA, 1992), Constando de dois pré-enriquecimentos, antes do isolamento seletivo. Das 39 amostras coletadas, 19 (49%) amostras eram de queijo tipo Coalho, 14(36%) de queijo tipo Manteiga e 6(15%) de queijo tipo Mussarela. A ausência de *Listeria monocytogenes* foi observada em 100% das amostras, nas quais 13 (33,33%) foram negativas no enriquecimento secundário e 26 (66,66%) no isolamento em Ágar OXA e Ágar PALCAM. A ausência poderia ser explicada pela presença de alguns fatores que propiciam a inibição desta bactéria, tais como: o índice muito alto de *Enterococcus* spp. e também a presença alguns microorganismos produtores de bacteriocinas e comumente encontrado no leite, como o *Lactobacillus lactis*. Mediante a possibilidade de inibição por coliformes, foram feitas contagens de NMP/g para coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli*, em 10 amostras de queijos do tipo Manteiga e os resultados obtidos foram 70% das amostras contaminadas por coliformes totais, 100% para coliformes fecais e *Escherichia coli*. Indicando a possibilidade, dentre outros fatores de inibição da *Listeria monocytogenes* nos queijos analisados. Então, de acordo com os casos relatados na literatura de inibição por microbiota contaminante e as condições higiênico-sanitárias inadequadas durante a produção, manipulação, embalagem, estocagem e comercialização dos queijos artesanais pode-se concluir que todos esses fatores podem ter inibido o crescimento de *Listeria monocytogenes*.

Palavras chave: *Listeria monocytogenes*, queijos artesanais, coliformes totais, coliformes fecais.

## SUMMARY

The occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheeses craft type Coalho, Manteiga and Mussarela marketed in the city of Manaus - AM was researched. The collection of the 39 samples of the craft cheeses was made in a random way in free markets and they happened in the period of May to August of 2002. The microbiological analyses were accomplished at the Laboratory of Microbiology of Faculdade de Farmácia. The applied methodology the this research was adapted of Bacteriological Analytical Manual (BAM, 2001) and of the Compendium of Methods goes the Microbiological Examination of Foods (APHA, 1992), Consisting of two pré-enrichments, before the selective isolation. Of the 39 collected samples, 19 (49%) samples were of cheese type Coalho, 14(36%) of cheese type Manteiga and 6(15%) of cheese type Mussarela. The absence of *Listeria monocytogenes* was observed in 100% of the samples, in the ones which 13 (33,33%) they were negative in the secondary enrichment and 26 (66,66%) in the isolation in Ágar OXA and Ágar PALCAM. The absence could be explained by the presence of some factors that they propitiate the inhibition of this bacterium, such as: the index very loud of *Enterococcus* spp. and also the presence some microorganisms producing of bacteriocins and commonly found in the milk, as the *Lactobacillus lactis*. By the inhibition possibility for coliformes, they were made countings of NMP/g for total coliformes, fecal coliformes and *Escherichia coli*, in 10 samples of cheeses of the type Manteiga and the obtained results were 70% of the polluted samples for total coliformes, 100% for fecal coliformes and *Escherichia coli*. Indicating the possibility, among other factors of inhibition of the *Listeria monocytogenes* in the analyzed cheeses. Then, in agreement with the cases told in the inhibition literature by polluting microbiota and the inadequate hygienic-sanitary conditions during the production, manipulation, packing, stockpiling and commercialization of the craft cheeses can be ended that all those factors might have inhibited the crescimento of *Listeria monocytogenes*.

Words key: *Listeria monocytogenes*, craft cheeses, total coliformes, fecal coliformes.

## INTRODUÇÃO

O leite constitui em excelente substrato para o desenvolvimento de microorganismos, devido ao conteúdo de nutrientes e compostos minerais presentes no mesmo, sendo, portanto, de fundamental importância a determinação da microbiota e da qualidade higiênico-sanitária do leite e seus derivados (EUTHIER et al., 1998).

No Brasil, de modo geral, o leite é obtido sob condições higiênico-sanitárias deficientes e, em consequência, apresenta elevados números de microorganismos, o que constitui um risco à saúde da população, principalmente quando consumido sem tratamento térmico (CATÃO e CEBALLOS, 2001).

Muitas vezes, a produção de queijos artesanais envolve uma série de fatores que predis põem a contaminação, tais como: a obtenção de matéria-prima, a partir de vacas em condições higiênico-sanitárias impróprias; a ordenha inadequada e com utensílios mal-higienizados; a fabricação do queijo, através de processos errados e sem as normas adequadas, presença de animais no local de fabricação e o armazenamento inadequado do produto (FAO/OMS, 1971; SANTOS, 1981; BEHMER, 1982; WOLFSCHOON-POMBO et al., 1984; VIEIRA et al., 1994; FAGUNDES, 1997).

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

Em diversas regiões, a produção de queijos artesanais envolve peculiaridades técnicas que os assemelha ou diferencia. No estado do Amazonas, os queijos artesanais fabricados para distribuição e comercialização no município de Manaus, são de três tipos: Coalho, Manteiga e Mussarela. A produção concentra-se, principalmente, em duas cidades do interior, Autazes e Careiro da Várzea e de acordo com dados compilados, durante o Censo 2000, e fornecidos pelo IBGE (2002), a produção leiteira, no ano de 1999, nos municípios de Autazes e Careiro da Várzea foi de 7.483 mil litros e 7.177 mil litros, respectivamente.

Vale ressaltar que somente uma parte dessa produção de leite é convertida em queijo, enquanto a outra parte é consumida na própria localidade, na forma de leite “in natura”, doce de leite e manteiga, que são produzidos para consumo próprio e o excedente vendido na própria região.

Entretanto, não há dados precisos sobre a produção queijeira, o que se deve ao fato da mesma ser do tipo informal e sofrer com a sazonalidade, de modo que, em determinados períodos do ano, durante a seca, esta se torna mais escassa, principalmente com relação à produção dos queijos tipo Manteiga e Mussarela, quando os mesmos dificilmente são encontrados, e quando o são, é apenas nas feiras a preços elevados.

A produção dos queijos artesanais é caracterizada por diferenças entre os mesmos; o queijo Coalho é produzido em mantas de aproximadamente 10Kg, enquanto o queijo Manteiga é feito em blocos retangulares com quase 4Kg e o queijo Mussarela em blocos piriformes de cerca de 1Kg.

Os queijos artesanais produzidos nas cidades supracitadas são transportados de barco até a cidade de Manaus, onde são, posteriormente, adquiridos e comercializados por terceiros, tanto nas feiras cobertas como nas feiras volantes da cidade e também em alguns mercados e supermercados.

A comercialização dos queijos artesanais nas feiras apresenta certas particularidades. Os queijos Coalho e Manteiga são vendidos em retalhos de peso variado, de acordo com o pedido do consumidor, sendo no mínimo de 100g, enquanto que o queijo Mussarela é vendido em pedaços de 500g e 1.000g, não sendo retalhado como os anteriores. Tal diferença na comercialização dos queijos Coalho e Manteiga em relação ao Mussarela, segundo alguns vendedores de queijos, deve-se ao preço mais elevado e a deterioração acelerada deste último.

A forma de armazenamento destes queijos está muito aquém da recomendada pela ANVISA, visto que os mesmos são mantidos à temperatura ambiente, até mesmo sob sol

quente e muitas vezes, em contato com superfícies mal-higienizadas e com outros alimentos de origem animal e vegetal, crus ou cozidos; a embalagem dos queijos, normalmente, é de plástico frágil, estando ou não coberta com um plástico mais resistente.

Tais características nas formas de comercialização, armazenamento e embalagem aumentam a possibilidade de contaminação cruzada por microorganismos encontrados nas feiras.

A presença de *Listeria monocytogenes* em queijos é atribuída ao fato destes serem, muitas vezes, fabricados com leite cru ou leite submetido a um tratamento térmico equivalente a uma pasteurização baixa, permitindo a sua sobrevivência, ou ainda a contaminação pós-pasteurização (ZOTTOLA e SMITH, 1991).

Evidências recentes e emergentes implicam fortemente os produtos lácteos como fontes de *Listeria monocytogenes*, em esporádicos casos de listeriose, sendo de principal preocupação em produtos lácteos, tais como queijo Cheddar e queijos suaves, quando produzidos com leite cru ou sub-pasteurizado (PRITCHARD et al., 1994).

Poucas informações existem a respeito da listeriose humana no Brasil, bem como a presença da *Listeria monocytogenes* em alimentos e plantas ambientais e, quando são pesquisadas informações em relação à região Norte do país, tais dados se tornam mais escassos ainda, tanto sobre a doença quanto sobre a prevalência de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* nos alimentos associados a surtos em outras localidades.

Então, considerando-se a importância desse microorganismo como agente patogênico de transmissão por alimentos de origem láctea, torna-se de grande interesse o conhecimento mais detalhado de sua ocorrência no ambiente e seu crescimento nos alimentos, principalmente produtos lácteos. Desse modo, procurou-se desenvolver o estudo sobre a ocorrência da *Listeria monocytogenes* nos queijos artesanais tipo Coalho, Manteiga e Mussarela, comercializados nas feiras da cidade de Manaus, visto ser alto o consumo destes alimentos pela população em nossa região.

## **Objetivos**

A presente pesquisa foi conduzida com os seguintes objetivos:

Verificar a ocorrência de *Listeria monocytogenes* em amostras comerciais de queijos artesanais dos tipos Coalho, Manteiga e Mussarela, na cidade de Manaus.

Observar o ambiente no qual os queijos artesanais estão sendo comercializados, a embalagem e o armazenamento dos mesmos durante o período de comercialização.

Avaliar a presença de coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli* em amostras de queijo artesanal do tipo Manteiga.

## **1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1 Considerações Gerais sobre a Produção de Queijos**

A produção mundial, segundo dados do ANUALPEC (2001), durante o ano de 2001, foi de 392.986 milhares de litros de leite e de 13.170 milhares de toneladas de queijos. Desta produção, o Brasil foi responsável pela parcela de 22.800 milhares de litros de leite e de 460 milhares de toneladas de queijo.

Entretanto os dados apresentados pelo ANUALPEC são referentes aos leites e queijos produzidos e fiscalizados pelo Ministério da Agricultura e não indicam a produção real, visto que parte do leite coletado e parte do queijo produzidos no Brasil, são considerados clandestinos, pois não passam por inspeção do S.I.F. e são vendidos freqüentemente em feiras livres e mercados nas áreas urbanas e rurais de todo o país.

Todavia, deve-se destacar que a produção brasileira de queijos é influenciada pelo consumo dos queijos comercializados pela população, sendo que este consumo foi, no ano de 2001, em torno de 2,73 kg/pessoa/ano e quando este é comparado com países europeus, tais como a França (23,17kg/pessoa/ano) e Itália (20,46 kg/pessoa/ano), é considerado baixo (ANUALPEC, 2001).

Observa-se também que o aumento deste consumo tem sido relativamente pequeno visto que, em 1992, o consumo foi de 1,92 kg/pessoa/ano, o que indica que, em nove anos, o aumento foi muito sutil (ANUALPEC, 2001).

## 1.2 A Microbiota do Queijo

Os microorganismos do leite são divididos em dois grupos, os normais e os anormais, e a eles se chama de modo geral de microbiota do leite. Assim temos a microbiota normal e anormal, conforme os agentes microbianos que constituem a cultura sejam encontrados no leite habitualmente, ou encontrados apenas nos casos de afecções do úbere ou de contaminação com material provindo de “fontes patogênicas” (BEHMER, 1980).

A quantidade de microorganismos existentes no leite e a multiplicação dos mesmos modificam em função do tempo em que estes agentes ficam expostos a uma determinada temperatura (VEIGA e PEREIRA, 1998).

### 1.2.1 Microbiota Normal

O leite quando é formado, é completamente estéril, porém se contamina logo após pelas bactérias que povoam os canais galactóforos; a contaminação da secreção láctea pode iniciar, antes mesmo de ser expelida para o meio externo, devido ao fato dos ductos lactíferos estarem constantemente abertos, sendo porta de entrada para microorganismos que estão nas superfícies e em contato com o ambiente (Figura 1) (REVILLA, 1985; BANKS, 1992).



**Figura 1.** Representação esquemática do úbere bovino, mostrando as estruturas pelas quais o leite flui e que normalmente são contaminadas com microorganismos.

O conteúdo microorgânico do leite obtido nos primeiros jatos de leite de uma vaca são é geralmente maior que o número de bactérias de qualquer outra porção durante a mesma ordenha e por estar acumulado no canal galactóforo e, conseqüentemente, em contato com o ambiente, faz-se necessário desprezar os dois primeiros jatos (BEHMER, 1982; REVILLA, 1985).

O leite ao sair do úbere apresenta-se com uma carga microbiana e se o mesmo for exposto às condições do ambiente por algum tempo, esta irá se multiplicar ativamente (DILAJAN, 1976; RIEDEL, 1992).

Fatores como a qualidade bacteriológica das águas, qualidade do ar, dos estábulos, sanidade dos ordenhadores e dos animais e, principalmente, utensílios não perfeitamente higienizados também contribuem, de modo decisivo, no estado microbiológico do leite (ANTUNES e OLIVEIRA, 1986).

No leite normal predominam os gêneros *Streptococcus* - produtores de ácidos - e *Lactobacillus*. Também aparecem *Micrococcus* e *Bacillus* e *Clostridium* - produtores de esporos. Entretanto quando se armazena o leite cru, em condições de refrigeração - entre 2° e 4°C, ocorre um momento em que há um predomínio de agentes psicrotróficos. O desenvolvimento das bactérias desses gêneros no leite frio pode provocar transformações prejudiciais - defeitos e decomposição química - nos componentes organolépticos do leite. (SPREER, 1991).

As bactérias ácido lácticas têm papel importante na elaboração da maioria dos tipos de queijo. Queijos tipo fresco ou não-amadurecidos usam culturas iniciadoras semelhantes às da coalhada. Os queijos amadurecidos sofrem também uma fermentação láctica inicial que é seguida pela ação de suas próprias enzimas e de outros microorganismos. Os microorganismos são, como se sabe, inúmeros, apresentando uma série de fermentações distintas e normalmente características da região de onde se originaram (AQUARONE et al., 1975).

As bactérias lácticas mais importantes nos produtos lácteos, tanto por sua atividade química, bioquímica como por seu número, são àquelas que fermentam o ácido láctico nos produtos de degradação e que são fracamente proteolíticas. Tais bactérias pertencem às famílias Lactobacillaceae e Streptococaceae (ALAIS, 1985).

### **1.2.2. Microbiota Patogênica**

Segundo GOMES e GALLO (1995), os microorganismos são os principais responsáveis pela transmissão de doenças a partir do leite e derivados e pela deterioração da qualidade destes alimentos.

Os nutrientes, proteína e gordura, do leite são preservados no processo de produção do queijo e desta forma podem ser mantidos por mais tempo do que na forma líquida. Vários fatores são críticos ao se produzir o queijo, principalmente em relação à qualidade microbiológica do leite, devido a presença de alguns microorganismos que resultariam na presença dos mesmos no queijo (ZOTTOLA e SMITH, 1991).

Segundo ZOTTOLA e SMITH (1991), a quantidade de água presente no queijo é um dos fatores que influenciam o crescimento de microorganismos em queijos. Partindo-se deste princípio, a legislação brasileira, através da Resolução nº 12 (02 de janeiro de 2001), implementou o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, exigindo que os queijos (de baixa, média, alta e muito alta umidade) sejam analisados para as seguintes bactérias: estafilococos coagulase positiva (que substituiu a denominação anterior de *Staphylococcus aureus*), *Salmonella* sp, coliformes a 45°C (que substituiu a denominação “coliformes de origem fecal” e “coliformes termotolerantes”) e *Listeria monocytogenes*.

O leite pode ser contaminado por microorganismos patogênicos dos quais a vaca é portadora, principalmente, aqueles considerados propagadores de doenças, como pode ser observado no Quadro 1 (EVANGELISTA, 1998).

**Quadro 1.** Principais fontes de contaminação do leite de origem animal e ambiental. Enfermidades produzidas e microorganismos causadores de tais enfermidades.

| Fonte de contaminação  | Enfermidade             | Microorganismo                                                 |
|------------------------|-------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Através do úbere       | Brucelose               | <i>Brucella abortus</i>                                        |
|                        | Tuberculose             | <i>Mycobacterium tuberculosis</i>                              |
|                        | Escarlatina             | <i>Streptococcus pyogenes</i>                                  |
|                        | Angina infecciosa       |                                                                |
|                        | Gastroenterites tóxicas | <i>Staphylococcus aureus</i>                                   |
|                        | Colibacilose            | <i>Escherichia coli</i>                                        |
|                        | Difteria                | <i>Corynebacterium diphtheriae</i>                             |
| Através da manipulação | Tuberculose             | <i>Mycobacterium tuberculosis</i>                              |
|                        | Brucelose               | <i>Brucella abortus</i>                                        |
|                        | Gastroenterites tóxicas | <i>Staphylococcus aureus</i>                                   |
|                        | Colibacilose            | <i>Escherichia coli</i>                                        |
|                        | Diarréia infantil       | <i>Proteus</i> spp, <i>Bacillus</i> spp, <i>C. perfringens</i> |
|                        | Tifo                    | <i>Eberthella typhosa</i>                                      |
|                        | Paratifo                | <i>Salmonella</i> sp                                           |
|                        | Disenteria e diarréia   | <i>Shigella</i> sp                                             |
|                        | Escarlatina             | <i>Streptococcus pyogenes</i>                                  |
|                        | Angina infecciosa       |                                                                |
| Ocasionais             | Difteria                | <i>Corynebacterium diphtheriae</i>                             |
|                        | Febre aftosa            | <i>Vírus da glosopeda</i>                                      |
|                        | Carbúnculo              | <i>Bacillus anthracis</i>                                      |
|                        | Actinomicose            | <i>Actinomyces bovis</i>                                       |
|                        | Cólera (rara)           | <i>Vibrio comma</i>                                            |

Fonte: EVANGELISTA (1998).

COVENEY et al. (1994) citam que, na Irlanda, a elaboração de queijos artesanais irlandeses, a partir de leite cru é feita comumente, entretanto já existem produtores que utilizam a pasteurização como método de prevenção de microorganismos no leite.

Uma série de pesquisas é realizada todos os anos quanto a presença de microorganismos patogênicos em leite e derivados de leite. Tais dados estão resumidos no Quadro 2.

**Quadro 2.** Agentes patogênicos pesquisados em leite e derivados quanto a sua ocorrência em alimentos lácteos, em várias localidades.

| Alimento analisado                                                              | Microorganismo                                                                        | Positiva/<br>Nº<br>amostras            | Local                  | Autor /ano                           |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|
| Queijos                                                                         | <i>Escherichia coli</i><br>EPEC                                                       | 43/60<br>4/43                          | Mosul-Iraque           | Abbar /1988                          |
| Queijos Fresco,<br>Semi-duro e<br>Duro                                          | <i>Salmonella</i> spp                                                                 | 44/3.846                               | Cuba                   | Castro et al./1991                   |
| Queijo branco turco<br>Condimentado                                             | <i>Yersinia enterocolitica</i>                                                        | 19/66                                  | Turquia                | Aytac e Özbas/1992                   |
| Leite cru<br>Leite pasteurizado<br>Leite fermentado<br>Queijo<br>Creme de leite | <i>Yersinia enterocolitica</i>                                                        | 11/30<br>1/20<br>15/63<br>7/94<br>1/20 | Marrocos               | Hamama et al./1992                   |
| Queijos fatiados tipo<br>americano e não-<br>americano                          | Coliformes<br><i>Escherichia coli</i> O157:H7<br><i>S. aureus</i>                     | 24/50<br>Neg.<br>Neg.                  | Dakota do Sul/<br>EUA  | Bowen e<br>Henning/1994              |
| Queijo artesanal<br>irlandês                                                    | <i>S. aureus</i>                                                                      | 48/96                                  | Irlanda                | Coveney et al./ 1994                 |
| Leite cru<br>Leite pasteurizado C<br>Queijo Minas frescal                       | <i>S. aureus</i>                                                                      | 11/19<br>Neg<br>4/18                   | Piracicaba/SP          | Gomes e Gallo/ 1995                  |
| Queijo Minas Frescal                                                            | Coliformes fecais<br><i>S. aureus</i><br><i>Aeromonas</i> spp<br><i>Yersinia</i> spp. | 29/29<br>18/29<br>8/29<br>Neg          | Rio de<br>Janeiro/RJ   | Araújo et al./1997                   |
| Queijo macios<br>Queijo azul<br>Queijo semi-duro<br>Mussarela                   | <i>S. aureus</i>                                                                      | 2/22<br>4/22<br>4/22<br>6/22           | Bologna/Itália         | De Luca et al. /1997                 |
| Queijo Minas                                                                    | Coliformes fecais<br><i>Escherichia coli</i>                                          | 20/33<br>20/33                         | Viçosa/MG              | Pinto et al./1997                    |
| Minas Frescal                                                                   | <i>S. aureus</i>                                                                      | 40/80                                  | Poços de Caldas/<br>MG | Almeida Filho e<br>Nader Filho/ 2000 |

Para CASTRO et al. (1991), a presença de porcentagens baixas (menos de 1,5%) de amostras positivas para *Salmonella* spp. não parece representar risco, entretanto medidas de higiene satisfatórias são sugeridas na pesquisa para evitar a presença deste contaminante no queijo.

ZOTTOLA e SMITH (1991) classificam a *Listeria monocytogenes* e a *Escherichia coli* O157:H7 como microorganismos patogênicos emergentes, devido aos surtos envolvendo produtos lácteos contaminados com estas bactérias.

### 1.3. Características dos Queijos

Segundo TORREZAN (1998), a fabricação de queijo é um processo que pode durar meses; entretanto, os principais fatores que determinarão as características finais deste queijo são definidos no espaço de poucas horas, começando com a chegada do leite à fábrica até a prensagem nas formas.

O artigo 599, do Decreto N° 2.244 de 04 de junho de 1997 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1997), cita que para fins de padronização, os queijos devem ser classificados em 2 (duas) categorias, tendo por base, o teor de umidade e a percentagem de matéria gorda no extrato seco total. Assim, os queijos se classificam, de acordo com os artigos 600 e 601:

a) Quanto ao teor de umidade: 1. Queijos de baixa umidade (consistência dura), com até 35,9% (trinta e cinco e nove décimos por cento) de umidade; 2. Queijos de média umidade (consistência semi-dura), com umidade entre 36% (trinta e seis por cento) e 45,9% (quarenta e cinco e nove décimos por cento); 3. Queijos de alta umidade (consistência macia), com umidade entre 46% (Quarenta e seis por cento) e 54,9% (cinquenta e quatro e nove décimos por cento); 4. Queijos de muito alta umidade (consistência mole), com umidade mínima de 55% (cinquenta e cinco por cento), sendo que, segundo o Parágrafo único, os queijos de muito alta umidade, de acordo com o processamento sofrido logo após a fermentação, podem se classificar em queijos de muito alta umidade tratados termicamente e queijos de muito alta umidade.

b) Quanto à percentagem de matéria gorda no extrato seco total: 1. extra gordo ou duplo creme, quando contenha no mínimo 60% (sessenta por cento); 2. gordo: quando contenha entre 45% (quarenta e cinco por cento) e 59,9% (cinquenta e nove e nove décimos por cento); 3. semi-gordo: quando contenha entre 25% (vinte e cinco por cento) e 44,9% (quarenta e quatro e nove décimos por cento); 4. magro: quando contenha entre 10% (dez

por cento) e 24,9% (vinte e quatro e nove décimos por cento); 5. desnatado: quando contenha menos de 10% (dez por cento).

Segundo a Portaria nº 364 de 04 de setembro de 1997 do RIISPOA (BRASIL, 1997), entende-se por queijo Mussarela, o queijo obtido pela filagem da massa acidificada (produto intermediário obtido por coagulação do leite por meio de coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas) complementada ou não pela ação de bactérias lácteas específicas.

A Instrução Normativa nº30 de 26 de junho de 2001, publicada no DOU de 16/07/2001, que aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga define no anexo II, o queijo de Coalho como aquele que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação (BRASIL, 2001).

O queijo de Manteiga é definido no anexo III da Instrução Normativa nº 30, como o produto obtido mediante a coagulação do leite com emprego de ácidos orgânicos de grau alimentício, cuja massa é submetida a dessoragem, lavagem e fusão, com acréscimo exclusivamente de manteiga de garrafa ou manteiga da terra ou manteiga do sertão. Sendo reservado ao produto cuja base láctea não contenha gordura e/ou proteína e/ou outros produtos de origem não láctea.

Desde o dia dois de janeiro de 2001, a legislação brasileira, através da ANVISA, adotou a Resolução nº 12, publicada no DOU em 10 de janeiro de 2001, que padroniza o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, na qual a bactéria *Listeria monocytogenes* passou a fazer parte como um dos microorganismos a ser analisado em produtos lácteos, além dos já considerados indicadores de qualidade, sendo o resultado da determinação expresso como presença ou ausência na alíquota analisada (BRASIL, 2001).

## **1.4 Características da *Listeria monocytogenes***

### **1.4.1 Taxonomia e Identificação**

O microorganismo *Listeria monocytogenes*, anteriormente denominado *Bacterium monocytogenes*, foi descrito pela primeira vez por Murray e colaboradores, em 1911, como

a causa de infecções em coelhos de laboratório. Posteriormente, em 1929, foi descoberto que esta bactéria causava doença no homem, bem como em outros animais (KONEMAN et al., 2001, FDA, 1992).

O gênero *Listeria* pertence à família *Corynebacteriaceae* e consiste de seis espécies: *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii* e subsp. *londoniensis*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri* e *Listeria grayi*; sendo todas as espécies ubíquas e, potencialmente, contaminantes de alimentos. Entretanto, somente a bactéria *Listeria monocytogenes* é considerada patógena para humanos e animais (FABER e PETERKING, 1991; BEUMER et al, 1996).

A *Listeria* sp. é um bacilo, de forma cocobacilar, curto e delgado (que microscopicamente assemelha-se a corinebactérias ou diplococos Gram-positivos), aeróbico, gram positivo, não esporulado, cujas células medem de 0,4 a 0,5 µm por 1,0 a 2,0 µm (MURRAY et al., 2000; KONEMAN et al., 2001).

Segundo o Manual Bergey's, a motilidade do gênero *Listeria* sp se faz através de pequenos flagelos peritríquios, isto acontece quando a mesma cresce em temperaturas entre 20 – 25°C, sendo que este crescimento apresenta-se de modo muito característico, em forma de guarda-chuva; entretanto, a temperatura ótima para seu crescimento é 30-37°C. Sendo catalase positiva e oxidase negativa (HOLT et al., 1994).

ISOM et al. (1995) citam que culturas antigas de *Listeria monocytogenes*, principalmente colônias desiguais, têm sido apresentadas produzindo estruturas filamentosas que medem de seis a 20 µm de comprimento. E, no experimento, envolvendo a formação de filamento pela *Listeria monocytogenes*, ocorreu o crescimento de células alongadas sob condições experimentais de concentração de NaCl a 1.000mM sugerindo que um mecanismo de adaptação para a sobrevivência possa estar envolvido.

Ressalta-se que a capacidade de utilizar ou não determinados carboidratos é um dos recursos laboratoriais que pode ser usado para diferenciação das espécies de *Listeria* sp. e que somente a espécie *Listeria monocytogenes* utiliza a rhamnose, enquanto as espécies *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii* e *Listeria welshimeri* utilizam a xilose como fonte de obtenção de energia (FABER e PETERKING, 1991).

Algumas características são de grande importância para a análise microbiológica e diferenciação das espécies do gênero *Listeria* sp; tais características foram agrupadas em forma de tabela por Holt et al. apud Silva et al. (1997), sendo que as espécies anteriormente enquadradas neste gênero como *Listeria grayi* e *Listeria murrayi* foram reclassificadas no

gênero *Murraya* sp., nos últimos anos, conhecidas e denominadas como *Murraya grayi* subsp *grayi* e *M. grayi* subsp. *murray* (tabela 1).

**Tabela 1.:** Características para diferenciação dos gêneros *Listeria* sp. e *Murraya* sp.

| Teste                          | <i>L. monocytogenes</i> | <i>L. Seeligeri</i> | <i>L. ivanovii</i> | <i>L. innocua</i> | <i>L. welshimeri</i> | <i>M. grayi</i> subsp. <i>grayi</i> | <i>M. grayi</i> subsp. <i>murrayi</i> |
|--------------------------------|-------------------------|---------------------|--------------------|-------------------|----------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Motilidade rotatória (20-25°C) | +                       | +                   | +                  | +                 | +                    | +                                   | +                                     |
| Motilidade guarda-chuva        | +                       | +                   | +                  | +                 |                      | +                                   | +                                     |
| Camp-teste <i>S.aureus</i>     | +                       | +                   | -                  | -                 | -                    | -                                   | -                                     |
| Camp-teste <i>R. equi</i>      | -                       | -                   | +                  | -                 | -                    | -                                   | -                                     |
| Catalase                       | +                       | +                   | +                  | +                 | +                    | +                                   | +                                     |
| Oxidase                        | -                       | -                   | -                  | -                 | -                    | -                                   | -                                     |
| Uréase                         | -                       | -                   | -                  | -                 |                      | -                                   | -                                     |
| Crescimento TSI                | A/A                     | A/A                 | A/A                | A/A               | A/A                  | A/A                                 | A/A                                   |
| H <sub>2</sub> S (TSI)         | -                       | -                   | -                  | -                 | -                    | -                                   | -                                     |
| OF Glicose                     | OF                      | OF                  | OF                 | OF                | OF                   | OF                                  | OF                                    |
| Crescimento Agar Bile Esculina | +                       | +                   | +                  | +                 |                      | +                                   | +                                     |
| Teste VM                       | +                       | +                   | +                  | +                 |                      | +                                   | +                                     |
| Teste VP                       | +                       | +                   | +                  | +                 |                      | +                                   | +                                     |
| Teste Nitrato                  | -                       |                     | -                  | -                 |                      | -                                   | +                                     |
| β -hemólise                    | +a                      | +                   | +                  | -                 | -                    | -                                   | -                                     |
| Fermantação                    |                         |                     |                    |                   |                      |                                     |                                       |
| Manitol                        | -                       | -                   | +                  | -                 | +                    | +                                   | +                                     |
| Xilose                         | -                       | +                   | -                  | +                 | -                    | -                                   | -                                     |
| Rhamnose                       | +                       | -                   | -                  | d                 | D                    | -                                   | d                                     |

Fonte: Holt et al. apud Silva et al. (1997)

a = algumas poucas cepas são negativas

+ = 90% ou mais cepas são positivas em 48h

- = 90% ou mais cepas são negativas em 48h

d = 11-89% das cepas são positivas

Reações em TSI Rampa/Fundo: A = ácido, K = alcalino

OF Glicose: O = Oxidativo; F = Fermentativo.

### 1.4.2 Fisiologia e Patogênese da *Listeria monocytogenes*

O *Bacterium monocytogenes* foi descrito pela primeira vez por Murray e colaboradores, como a causa de infecções em coelhos de laboratório. O microorganismo estava associado com monócitos do sangue periférico (KONEMAN et al., 2001).

Na atualidade, sabe-se que a *Listeria monocytogenes* é um dos clássicos patógenos intracelulares facultativos, o que permite a persistência da mesma no interior de células do sistema monócito-macrófago, podendo crescer em macrófagos, células epiteliais e fibroblastos cultivados (MURRAY et al., 2000).

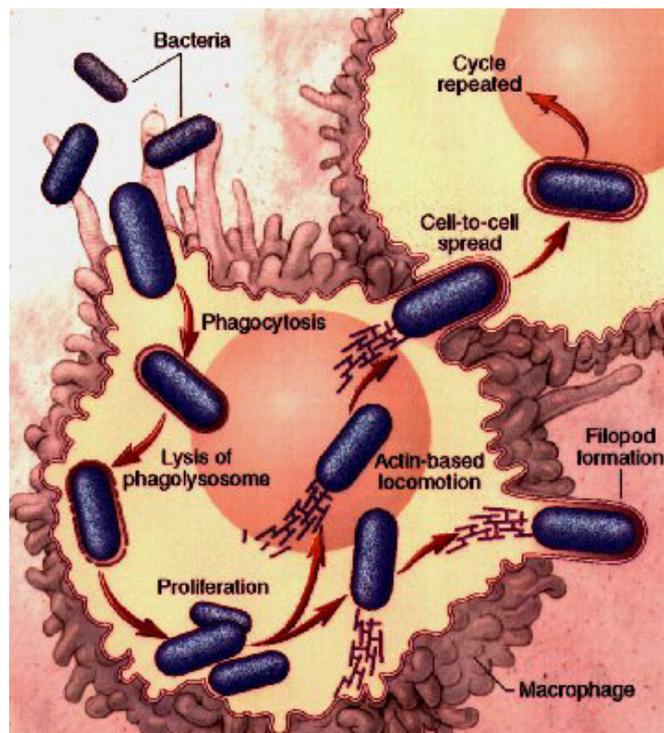
Devido ao estilo de vida único da *Listeria monocytogenes*, muitos cientistas têm sido instigados a estudar o modelo de parasitismo intracelular desta bactéria, já que a fisiopatologia conhecida atualmente deve-se a intensos estudos do modelo de infecção no rato (BHUNIA, 1997; VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Segundo DUBAIL et al. (2000), este patógeno intracelular facultativo é capaz de invadir muitas células hospedeiras, incluindo células epiteliais, hepatócitos, fibroblastos, células endoteliais e até mesmo macrófagos. E cada passo deste parasitismo intracelular é dependente da produção de fatores de virulência.

No interior de todas as células que a *Listeria monocytogenes* é capaz de penetrar, entre macrófagos e não fagócitos, ela desenvolve um ciclo de vida intracelular com características comuns (Vázquez- Boland et al., 2001).

Schwarzkopf (1996) cita que o processo de infecção pela *Listeria monocytogenes* ocorre em quatro partes diferentes: internalização, fuga a partir do vacúolo intracelular, enucleação de filamentos de actina e difusão célula-célula.

O ciclo de vida intracelular da *Listeria monocytogenes* durante processo de infecção pela bactéria foi esquematizado por SOUTHWICH e PURICH (2003), segundo a Figura 2.



**Figura 2.** Ciclo de vida intracelular da *Listeria monocytogenes* durante o processo de infecção de macrófagos (Fonte: SOUTHWICH e PURICH, 2003)

A internalização ocorre quando, através de internalinas produzidas pela *Listeria monocytogenes*, esta liga-se a receptores específicos na membrana da célula hospedeira, penetrando na mesma e formando um vacúolo intracelular (SCHWARZKOPF, 1996).

Segundo MURRAY et al. (2000), o processo de penetração se dá por fagocitose e o vacúolo formado é denominado endossoma. Antes que a *Listeria monocytogenes* seja destruída por enzimas lisossômicas, há liberação da listeriosina O pela mesma, que dissolve o vacúolo, liberando-a no interior da célula hospedeira onde sofrerá multiplicação, dando origem a novas células. A fuga da bactéria do interior do endossoma da célula hospedeira infectada é frequentemente mediada pela formação de um poro pela listeriolisina O.

A listeriolisina O é uma  $\beta$ -hemolisina que é descrita como uma estreptolisina e pneumolisina, sendo produzida pelas amostras virulentas desta bactéria, é uma toxina oxigênio-lábel e imunogênica. Desse modo, a *Listeria monocytogenes* nunca está extracelular e exposta a agentes antimicrobianos humorais (tais como: complemento e anticorpos), entretanto, pode ser facilmente morta por macrófagos ativados (MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY ON-LINE, 2002).

A seguir, um halo de filamentos de actina circunda a *Listeria monocytogenes* que, após replicação, é orientada por uma cauda que a impele para a superfície da célula

hospedeira, iniciando a difusão célula-célula e, então uma extensão em pseudopodes é formada, facilitando a transferência da bactéria para outra célula (DUBAIL et al., 2000).

LECUIT et al. (2001), a partir de uma pesquisa na França, citam que o mecanismo pelo qual a *Listeria monocytogenes* atravessa a barreira intestinal não está totalmente esclarecido. Entretanto, é sabido que essa bactéria expressa uma proteína de superfície – internalina, que interage com um receptor do hospedeiro – E-caderina, que promove a entrada no interior das células epiteliais humanas.

As cepas mutantes de *Listeria monocytogenes* que não produzem a listeriolisina O, são avirulentas e são fagocitadas rapidamente pelas células hospedeiras quando infectadas (DUBAIL et al., 2000).

Um processo similar foi observado por DALLAS et al. (1995) a partir de um experimento cultivando *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* em macrófagos de camundongos; a internalização das bactérias ocorreu duas horas após, havendo um crescimento significativo no número de *Listeria monocytogenes* nas 6 horas seguintes, entretanto o mesmo não ocorreu com *Listeria innocua*, já que estas foram fagocitadas.

Em um estudo *in vitro*, realizado na França, foi pesquisada a entrada de *Listeria monocytogenes* em neurônios pelo processo de difusão célula-a-célula. Nele detectaram a bactéria, predominantemente, no interior de macrófagos da microglia enquanto os astrócitos e os oligodentrócitos foram infectados em menor extensão. Tais dados deram suporte a noção de que fagócitos infectados podem ser vetores a partir dos quais a *Listeria monocytogenes* pode acessar nichos privilegiados tais como o sistema nervoso central (DRAMSI et al., 1998).

Além do parasitismo intracelular que a torna resistente ao ataque pelo organismo hospedeiro, a *Listeria monocytogenes* apresenta algumas características de resistência muito relevantes ao seu crescimento.

JUNEJA et al. (1998) demonstraram que a resistência da *Listeria monocytogenes* ao calor depende das condições de crescimento as quais a bactéria será submetida e que as condições ambientais presentes durante o crescimento, tais como: pH, atmosfera, temperatura, meio para crescimento, têm sido responsáveis por atribuir a esta bactéria a resistência ao calor, adaptando-a ao mesmo.

Além dos fatores supracitados, MAZZOTTA et al. (2001), observaram que a resistência da *Listeria monocytogenes* ao calor é influenciada por muitos fatores e que existem variações entre as amostras em relação à habilidade de permanecer em temperaturas altas e esta resistência é influenciada também pelas características dos alimentos, tais como:

quantidade de sal, atividade de água, acidez e a presença de outros inibidores. Além disso, o gênero *Listeria* sp é mais resistente que os outros patógenos de alimentos não formadores de esporos.

A resistência de diferentes sorovares de *Listeria monocytogenes* ao calor que foram tratadas termicamente em solução fisiológica foi estudada por SÖRQVIST (1994), na Suécia, sendo observadas diferenças significantes na resistência ao calor tanto entre os sete sorovares como entre as 11 amostras pertencentes ao mesmo sorovar.

Concordando com tais afirmações, LOU e YOSEF (1996), em uma pesquisa realizada em Ohio, Estados Unidos, estudaram as taxas de termotolerância da *Listeria monocytogenes* em vários estágios de crescimento e na presença de fatores de estresse que incluíam fome e tratamentos com peróxido de hidrogênio, etanol e pH baixo, concluindo, a partir dos resultados obtidos, que todos os tratamentos causaram um aumento na termotolerância desse patógeno.

Entretanto, GAY e CERF (1997) observaram, na França, que a *Listeria monocytogenes* foi incapaz de crescer e sobreviver em pH 4,8, sob as diferentes temperaturas testadas (2, 6, 10 e 14°C) e que essa incapacidade independe da concentração inicial da mesma.

O que foi confirmado também por GALDIERO et al. (1997) que observaram uma diminuição na habilidade invasiva da *Listeria monocytogenes* quando em meio para crescimento com  $\text{pH} \leq 4,5$  independentemente da concentração inicial e da temperatura de incubação.

Quanto a resistência da *Listeria monocytogenes* a diferentes concentrações de NaCl, ISOM et al. (1995) afirmam que, em relação à concentração de NaCl, todas as amostras de *Listeria monocytogenes* crescem em 10%, várias amostras podem sobreviver em 25% e algumas têm sido apresentadas mantendo-se viáveis após um ano em 16%.

Os efeitos de variações combinadas de temperatura, pH e concentração de NaCl na inibição pela nisina de *Listeria monocytogenes* foram estudados por THOMAS e WIMPENNY (1996) os quais observaram que o aumento na concentração de NaCl potenciou a inibição pela nisina da bactéria, enquanto que o aumento na temperatura não influenciou este crescimento. O pH variando de 5-7,92 aparentemente aumentou a inibição por nisina, entretanto, em pH 4,5-5 e à temperatura de 20-25°C, o microorganismo apresentou-se resistente a nisina e ao NaCl.

O mesmo estudo também foi produzido por MARTINIS et al. (1997) atestando que entre 20-30°C, a frequência de resistência ficou em torno de 1 a  $10^5$ , independentemente da

concentração de sal ou do pH. À 10°C, a frequência da resistência à nisina diminuiu com o decréscimo de pH e da concentração de sal. E com o pH a 5,5 e concentração a 0,5% NaCl passou a ser impossível a geração de isolados da *Listeria monocytogenes* resistentes a nisina.

A *Listeria monocytogenes* apresenta a capacidade de sobreviver e crescer formando um biofilme em várias superfícies, tais como as superfícies de aço inoxidável, Teflon®, nylon e selador superfície de poliéster, as quais foram testadas e demonstraram que quando as condições sanitárias não são satisfatórias há um risco substancial deste patógeno contaminar a planta ambiental de processamento (BLACKMAN e FRANK, 1996).

Em relação à radiação, a *Listeria monocytogenes* é mais resistente do que as bactérias gram negativas dos gêneros *Salmonella* e *Vibrio*. Tal radiosensibilidade foi testada, no Mississippi, Estados Unidos, a partir de um experimento para determinar se a concentração celular inicial e/ou a temperatura no tempo de radiação influenciavam a radiosensibilidade da mesma. Os resultados obtidos demonstraram que a temperatura de irradiação somente influenciou a radiosensibilidade desta bactéria a  $10^9$ UFC/mL (ANDREWS et al., 1995).

Todavia, CLARDY et al. (2002) citam que a irradiação gama têm-se apresentado eficiente no controle de *Listeria monocytogenes* em carnes não cozidas e que poderia também ser utilizada em produtos “pronto-para-comer”.

Efeitos inibidores sobre a *Listeria* spp têm sido descritos na literatura, quer seja pela utilização de microorganismos competidores quer seja pela produção de bacteriocinas com efeito listericida, ou ainda, pela utilização de compostos químicos.

Quando nos alimentos existe uma carga elevada de microorganismos de alteração, como *Lactobacillus* ou *Pseudomonas*, estes competem pelo mesmo espaço e nutrientes, de modo que a *Listeria monocytogenes* dificilmente poderá se desenvolver até níveis elevados (JEREZ, 2001).

RODRÍGUEZ et al. (1997) relatam que o uso simultâneo de mais de uma bacteriocina para prover uma atividade antibacteriana ótima ou a combinação de uma bacteriocina com um outro mecanismo de preservação tem sido proposto para reduzir a seleção de resistência à ação de bacteriocinas nas amostras alvo.

Na pesquisa sobre o efeito de bacteriocinas sobre a *Listeria monocytogenes*, RODRÍGUEZ et al. (1997) observaram que, combinando-se os efeitos da bacteriocina produzida por uma bactéria ácido láctica e a ativação do sistema lactoperoxidase no crescimento de *Listeria monocytogenes* em leite cru refrigerado, houve um decréscimo mais

significativo na contagem de *Listeria monocytogenes* quando utilizada esta combinação do que quando se utilizou somente a bacteriocina.

Em um trabalho produzido por GUERRA e BERNARDO (2001a), em Portugal, foram caracterizados os efeitos inibidores de *Listeria monocytogenes* Scott A, produzidos pela microbiota de maturação de queijos (531 amostras) do Alentejo, 208 amostras inibiram o crescimento de *Listeria monocytogenes*, 82 amostras produziram substâncias filtráveis antagonistas à listeria, 25 com inibição foram atribuídas à produção de ácidos orgânicos, 37 à produção de peróxido de hidrogênio e oito à produção destes dois compostos.

GUERRA e BERNARDO (2001a), também citam na pesquisa que, embora não tenha sido observada a produção de bacteriocinas, observou-se a presença de microorganismos com capacidade anti-*Listeria* dos gêneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Staphylococcus*.

PITT et al. (2000) pesquisaram o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* em leite pasteurizado quando da fermentação com bactéria ácido láctica e observaram que durante a incubação com *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus plantarum*, a *Listeria monocytogenes* foi completamente inativada após 20 e 64 horas de incubação à 37°C e 30°C, respectivamente.

Alguns trabalhos descrevem a ação de bacteriocinas produzidas por microorganismos contaminantes do queijo sobre o crescimento e a sobrevivência da *Listeria monocytogenes* em vários tipos de queijos. Entretanto, até o presente momento, a nisina consiste na única bacteriocina utilizada comercialmente como agente natural de conservação de alimentos (MORENO et al., 1999).

Dentre estes trabalhos, está o estudo de EPPERT et al. (1997) que pesquisaram, na Alemanha, a redução do crescimento de *Listeria* spp. causada pelas culturas microbianas de queijos não definidas e produtoras de pigmento vermelho e pela produção de bacteriocinas por *Brevibacterium linens in situ* em queijo macio. Os resultados com relação às bacteriocinas do *B. linens* não foram o esperado; entretanto, a produção de outras substâncias de efeito inibitório pelas culturas microbianas não definidas obteve efeito muito mais pronunciado quanto à presença e sobrevivência de amostras mutantes de *Listeria* spp.

TARELLI et al. (1994) estudaram a produção de bacteriocinas ativas contra a *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua*, a partir de Enterococci lácticos. Em leite, a produção de bacteriocinas ocorreu durante a incubação à 37°C e em queijos macios, em temperatura de crescimento, foram produzidas nas primeiras 24 horas. A atividade

antimicrobiana do *Enterococcus faecium* manteve-se estável no leite até o final do período de incubação.

Em uma pesquisa realizada por MORENO et al. (1999) para verificar o efeito inibitório e o modo de ação das bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* ITAL 383, ATCC11454 e CNRZ150 contra *Listeria innocua* LIN11, foi descrito que o efeito e o modo de ação das bacteriocina foram similares à nisina de *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* ATCC11454 e estas bacteriocinas apresentaram efeito bactericida causando a lise de células de *Listeria innocua*. O efeito letal foi maior para células em fase exponencial de crescimento.

Quanto a compostos químicos, FERNANDEZ (2003) cita que uma solução de cálcio acidificado pode reduzir drasticamente a presença de *Listeria monocytogenes* e prevenir o reaparecimento deste microorganismo em salsichas cozidas, sendo mais eficaz que o ácido láctico, método mais empregado e comumente usado atualmente.

Desse modo, têm se observado que queijos naturalmente contaminados bem como queijos inoculados têm sido a base para os estudos dos fatores que influenciam a sobrevivência de microorganismos patógenos (ZOTTOLA e SMITH, 1991).

### 1.4.3 Virulência e Patogenicidade

Somente poucas cepas de *Listeria monocytogenes*, geneticamente distintas, têm sido identificadas em surtos de doença alimentar em humanos, o que sugere que nem todas as amostras desta espécie são igualmente virulentas e/ou capazes de serem transmitidas a partir do animal ou do alimento para o homem (FRIEDLANDER JUNIOR, 1999).

O entendimento da virulência foi melhorado por diferentes investigações com emprego de cultura de células e métodos moleculares que demonstraram o potencial dos genes dos fatores de virulência (SCHWARZKOPF, 1996).

A heterogeneidade na virulência de *Listeria monocytogenes* têm sido observada em estudos “in vivo” em ratos e “in vitro” em culturas de células, mas a clara correlação entre o nível de virulência e a origem ou as características típicas de uma amostra, em muitos casos, podem não estar estabelecidas (VÁZQUEZ-BOLAND et al. 2001).

Isto se deve ao fato da bactéria *Listeria monocytogenes* conter 13 modelos antigênicos O, que compreendem os sorovares 1/2 a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4ab e 7, onde os tipos 1/2a, 1/2b e 4b são os responsáveis pela maioria das infecções em recém-nascidos e adultos (BHUNIA, 1997; MURRAY et al., 2000).

CZUPRINSKI et al. (2002) observam, a partir de um estudo sobre a habilidade da *Listeria monocytogenes* em causar infecção sistêmica em rato infectado por inoculação intragástrica, que o sorotipo 4b da amostra Scott A e a 101 M possuem mais determinantes de virulência capazes de causar infecção sistêmica do que o sorotipo 1/2.

A comparação entre as taxas de exposição e a prevalência de listeriose sugere que, embora a taxa de exposição à *Listeria monocytogenes* seja alta, a probabilidade de contrair a doença é baixa. Variadas explicações podem ser sugeridas para esta observação. Uma é que nem toda cepa de *Listeria monocytogenes* presente em alimentos causa a doença devido a diferenças em suas propriedades de virulência (NOTERMANS et al., 1998).

Outra possibilidade é devido à vacinação indireta com cepas menos virulentas da *Listeria monocytogenes*, o que explicaria a alta ocorrência de alimentos contaminados e a baixa incidência de listeriose (SCHWARZKOPF, 1996).

MURRAY et al. (2000) citam que todas as cepas virulentas de *Listeria monocytogenes* produzem a listeriolisina O, que está geneticamente relacionada à estreptolisina O e à pneumolisina, sendo esta necessária para que a bactéria seja liberada após a fagocitose e crescimento intracelular. Entretanto, se os macrófagos ativados inativarem a hemolisina oxigênio-lábil através dos seus metabólitos oxidativos, ocorrerá morte bacteriana. Assim, na ausência de imunidade celular eficaz, a listeria pode provocar infecções graves.

Outra reação que poderia ser usada para explicar aquela observação seria a existência de grupos vulneráveis na população humana, sendo que a existência de tais grupos tem sido indicada pelos dados epidemiológicos encontrados (NOTERMANS et al., 1998).

Além disso, a *Listeria monocytogenes* é um organismo intracelular facultativo que induz a imunidade celular mediada. Ela sobrevive em ambientes extremos de amplas taxas de temperatura (3 a 45 °C) – um atributo que foi explorado para o isolamento seletivo deste microorganismo (“enriquecimento a frio”) e pH (4,1 a 9,6) e agentes microbianos (BHUNIA, 1997; MURRAY et al., 2000).

JONES et al. (1997) relatam que a *Listeria monocytogenes* é conhecida pelo seu mecanismo de multiplicação em temperatura baixa, entretanto como este microorganismo pode sustentar um crescimento em baixas temperaturas ainda é muito pouco conhecido.

PRATA (1999) explica que a dose infectante da *Listeria monocytogenes* é desconhecida, especulando-se que varie em função da cepa e da susceptibilidade da vítima.

Onde nos casos adquiridos, a partir de leite cru ou supostamente pasteurizado, é seguro afirmar que em pessoas susceptíveis, menos de 1000 organismos possam causar a doença.

#### 1.4.4 Habitat da *Listeria* spp.

A *Listeria monocytogenes* encontra-se amplamente distribuída na natureza, podendo encontrar-se no solo, nos vegetais e fazendo parte da microbiota intestinal de muitos mamíferos, sem que estes apresentem a doença e, por se tratar de uma agente saprozoonótica, tem sido na última década, na maioria das vezes, incriminada em surtos e casos de doença grave em humanos, em regra, causados pelo consumo de alimentos contaminados (CRESPO et al., 1999; GUERRA e BERNARDO, 2001).

Em uma pesquisa sobre fontes ambientais de listeria em plantas leiteiras, em Vermont, KLAUSNER e DONELY (1991) encontraram que a incidência de *Listeria monocytogenes* foi baixa quando comparada com a incidência de *Listeria innocua*.

Entretanto WAAK et al. (2002), na Suécia, observaram resultados variados quanto à presença de *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* em fazendas e plantas leiteiras de acordo com o local de isolamento. O leite armazenado em tanques teve incidência de *Listeria monocytogenes* em apenas 1,0% das amostras e de *Listeria innocua* foi de 2,3% nas 294 amostras coletadas, enquanto que o leite armazenado no silo coletor, a *Listeria monocytogenes* foi isolada em 19,6% das amostras e 8,5% das amostras apresentaram *Listeria innocua*.

Devido ao contato dos vegetais com o solo, os alimentos crus podem apresentar amostras de *Listeria monocytogenes* responsáveis pelos surtos de listeriose humana (PICKETT e MURANO, 1996).

STAHL et al. (1996) em um artigo sobre a prevenção contra a contaminação por *L. monocytogenes* em fazendas leiteiras e nas indústrias de queijos, na França, indicam que a silagem pode ser uma fonte maior da ocorrência de *Listeria monocytogenes* em leite cru.

FENLON et al. (1996) observaram que a excreção de *Listeria monocytogenes* por animais de fazenda está ligada a sua dieta alimentar e que os animais alimentados com feno e dieta manufaturada não excretaram níveis detectáveis desta bactéria (isto é, ausência em 25g), enquanto que animais alimentados com silagem, que é frequentemente contaminada com este microorganismo, comumente excretaram o referido microorganismo.

De acordo com LOVETT et al. apud DALU e FERESU (1996) e GARCIA et al. (1991), as vacas mamáticas podem abrigar a *Listeria monocytogenes* no leite em uma

concentração de  $2 \times 10^3$  até  $2 \times 10^4$  células por mililitros e a excreção da mesma pode, contudo, ocorrer por 3 meses após os sintomas clínicos terem desaparecido, daí os produtos lácteos serem particularmente susceptíveis a contaminação por listeria.

A *Listeria monocytogenes* tem sido isolada a partir de produtos crus e cozidos, bem como a partir da superfície de contato com o alimento, na planta de processamento (PICKETT e MURANO, 1996).

Entretanto, os produtos que mais têm sido implicados nos amplos surtos envolvendo esta doença são os que têm recebido um alto grau de processamento tecnológico (FENLON et al., 1996).

Como é o caso dos produtos “prontos-para-comer”, que são relatados frequentemente em surtos, devido à contaminação pós-processamento, por microorganismos presentes na planta ambiental de produção e embalagem dos mesmos (CLARDY et al. 2002).

GARCIA et al. (1991) apontam que a *Listeria monocytogenes* pode se desenvolver em temperaturas de refrigeração, o que aumenta a susceptibilidade dos alimentos refrigerados a contaminação por este microorganismo.

Além disso, GLASS et al. (1995) explicam que a habilidade deste patógeno para crescer ou sobreviver por longos períodos em leite fluído e produtos fermentados ou não, a várias temperaturas, tem sido bem relatada em todo o mundo.

Sem contar que os surtos têm custado à indústria de produtos lácteos, sozinha, nos últimos anos, milhões de dólares, devido à retirada de produtos do comércio, que são suspeitos de contaminação (DALU e FERESU, 1996).

Graças a tudo isto, a *Listeria monocytogenes* tem sido preocupação contínua para a indústria de alimentos, já que, embora se possa minimizar a presença da mesma através da atenção durante a produção dos alimentos, torna-se difícil assegurar a ausência dela a partir de alimentos que não recebem um tratamento final listericidal (FERREIRA e LUND, 1996).

#### **1.4.5 Sintomatologia da Listeriose**

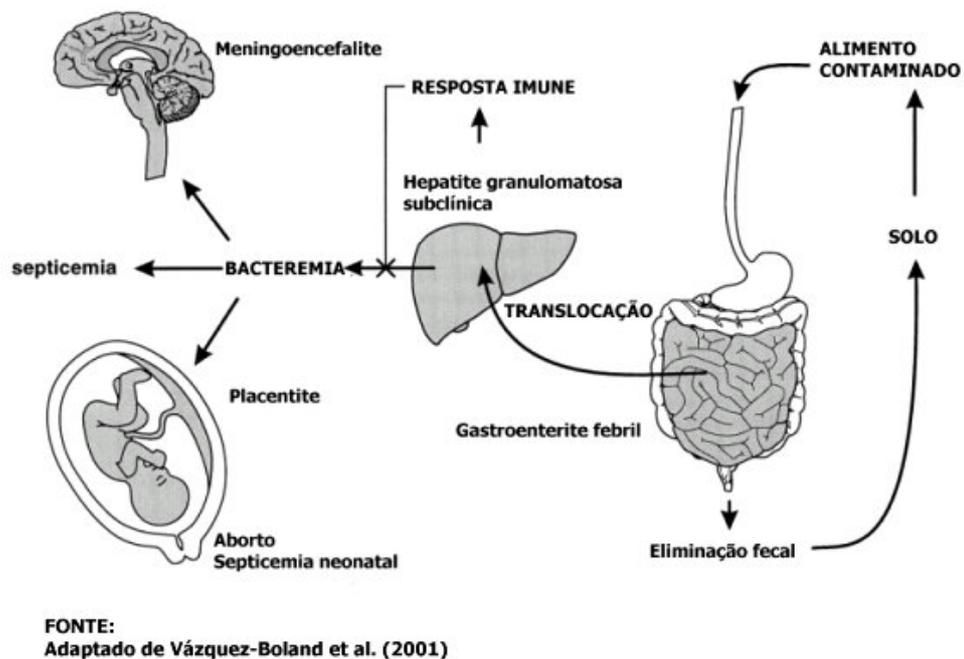
A doença em humanos é rara e limita-se a várias populações bem-definidas: recém-nascidos, indivíduos idosos, mulheres grávidas e pacientes imunocomprometidos, sobretudo aqueles com deficiência na imunidade celular (MURRAY et al., 2000).

Nas últimas décadas, a *Listeria monocytogenes* tem emergido como patógeno de doença de origem alimentar importante. Embora ela tenha sido identificada desde o início

do século, somente agora, a biologia e a capacidade em produzir doença através desta bactéria têm sido detalhadamente estudadas (CZUPRYNSKI, 1994).

A listeriose está associada à febre, a alterações gastrointestinais e a dores musculares, se estendendo até o sistema nervoso, levando a perda de equilíbrio, dor de cabeça e convulsão, podendo evoluir então para meningoencefalite, septicemia e aborto em humanos (BHUNIA, 1997; FERNANDEZ, 2003).

A Figura 3, adaptada do artigo de VÁZQUEZ-BOLAND et al. (2001), demonstra um esquema da fisiopatologia da *Listeria monocytogenes* em humanos que é comumente observada.



**Figura 3.** Esquema representativo da fisiopatologia da Listeriose.

A *Listeria monocytogenes* é uma residente transitória do trato intestinal de humanos e aproximadamente 5 a 10% da população são carreadores deste microorganismo. Sendo que, a maioria das pessoas saudáveis, provavelmente, não evidencia qualquer sintoma. Desse modo, as complicações são a expressão clínica da doença (NOTERMANS et al., 1998; PRATA, 1999).

O período de incubação da listeriose apresenta-se com variações, desse modo, KONEMAN et al. (2001) citam que o período de incubação da listeriose é, em média, de três a quatro semanas, podendo apresentar-se com uma variação de três a 90 dias.

Em mulheres grávidas, o período de incubação é de 19 a 23 dias, de acordo com RIEDO et al. (1994), que relataram tal período em uma pesquisa realizada em Connecticut, Estados Unidos, em 1994, cujos pacientes atendidos apresentaram dois ou mais sintomas de doença alimentar (febre, sintomas musculoesqueléticos, náusea, vômitos e diarreia) e foram submetidos a exames de sangue, do qual duas amostras foram positivas para o sorotipo 4b de *Listeria monocytogenes*.

O início de formas graves de listeriose é desconhecido, mas pode variar de alguns dias a três semanas. Da mesma forma, o início dos sintomas gastrointestinais também é estimado como sendo maior que doze horas (PRATA, 1999).

MURRAY et al. (2000) relatam formas variadas da doença clínica em humanos; a doença neonatal é caracterizada por duas formas: a doença de início precoce (ou granulomatose infantiséptica), adquirida por via placentária *in utero* e a doença de início tardio, adquirida por ocasião do nascimento ou logo após. Entretanto, os sinais e sintomas clínicos não são peculiares, sendo, por conseguinte, necessário excluir outras causas de doença do sistema nervoso central neonatal.

LACIAR et al. (2000) descreveram um caso de hidrocefalia sintomática em recém-nascido infectado com *Listeria monocytogenes*, na Argentina, apresentando listeriose inicial com sinais de meningite acompanhada de septicemia e complicando para uma hidrocefalia severa e foi comprovada a listeriose através de exames microbiológicos; foram isoladas amostras positivas da via vaginal materna que apresentou sintomas de resfriado 15 a 20 dias antes do nascimento da criança.

Em indivíduos sãos, a infecção bem sucedida é rara e frequentemente manifestada como não complicada, apresentando sintomas gastrointestinais brandos. Entretanto, a listeriose quando manifestada em indivíduos imunocomprometidos ou em extremos de idade pode causar uma ampla taxa de infecção, devido largamente a sua habilidade de difusão célula-célula, através das barreiras normais para infecções; por exemplo, a barreira hemato-encefálica (MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY ON-LINE, 2002).

No homem, a *Listeria monocytogenes* está implicada, principalmente, como causadora de bacteremia e meningoencefalite. Também se têm descrito casos de infecções gastrointestinais em indivíduos imunocomprometidos que haviam consumido alimentos contaminados com alto inóculo da bactéria (CRESPO et al., 1999).

Em adultos, a meningite constitui a forma mais comum da doença, embora os sinais e sintomas clínicos deste microorganismo não sejam específicos, deve-se suspeitar sempre

de listeria em paciente submetidos a transplantes de órgãos, pacientes com câncer ou mulheres grávidas com desenvolvimento de meningite (MURRAY et al., 2000).

Após o transplante de medula óssea, três casos de meningite por *Listeria monocytogenes*, foram relatados por LONG et al. (1993), em pacientes idosos de 51-56 anos de idade e que apresentaram os sintomas de quatro a 90 meses após a cirurgia.

A meningite ou meningoencefalite é a forma mais comum em pessoas maiores de 40 anos. Muitas vezes a meningite listérica ocorre como complicação em indivíduos debilitados, alcoolizados, em pacientes com neoplasias ou que recebem corticosteróides (CRESPO et al. 1999).

Em Illinois, Estados Unidos, após um picnic, foi relatado por DALTON et al. (1997), um surto envolvendo um leite achocolatado contaminado com *Listeria monocytogenes*. Cerca de 45 pessoas que apresentaram sintomas, 11 pessoas tiveram o microorganismo isolado. Os sintomas mais encontrados foram diarreia (presente em 79% dos casos) e febre (72%). Quatro pessoas foram hospitalizadas e o sorotipo 1/2b foi o implicado neste surto.

BULA et al. (1995) descreveram 57 casos de listeriose em adultos, com 21% dos casos apresentando bacteremia (em média 75 anos), 40% que apresentaram meningite (em média 69 anos) e 39% (em média 55 anos) que apresentaram meningoencefalite.

Também é relatado por BULA et al. (1995) que do total de pacientes com listeriose, 42% tinham uma doença anterior diagnosticada e 54% tinham mais de 65 anos de idade, sendo a mortalidade associada à idade de 32% e seqüelas nervosas se desenvolveram em 30% dos sobreviventes da listeriose.

MIETTINEN et al. (1999) citam um surto de gastroenterite febril por *Listeria monocytogenes* envolvendo o consumo de truta arco-íris defumada-fria, embalada a vácuo, contaminada, por cinco pessoas saudáveis. Sendo o sorotipo incriminado neste surto o 1/2a. O que sustenta a possibilidade de gastroenterite febril sem necessariamente invasão em pessoas sãs, se o alimento realmente estiver contaminado com esta bactéria.

KAMPELMACHER e IANSEN apud PICCHI et al. (1999), constataram que entre 103 pessoas, 20% das mesmas que trabalhavam em abatedouros eram portadoras assintomáticas de *Listeria monocytogenes*.

Enquanto KONEMAN et al. (2001) observam que veterinários de campo têm apresentados listeriose cutânea, adquirida pela manipulação de produtos de abortos e animais infectados.

Segundo VÁZQUEZ-BOLAND et al (2001), a *Listeria monocytogenes* afeta muitos vertebrados, inclusive aves, enquanto que a *Listeria ivanovii*, uma segunda espécie patogênica do gênero, é específica para ruminantes.

A infecção pela *Listeria monocytogenes* em animais se dá, primordialmente, por via alimentar tendo forte tropismo pelo feto, pela placenta e pelo sistema nervoso central (SNC). As infecções por contato animal a animal têm importância secundária e são produzidas somente durante um curto período de bacteremia, no qual ocorre, sobretudo, a eliminação do agente pelas secreções nasais (CORRÊA e CORRÊA 1992; BEER, 1999).

WIEDMANN et al. (1994) relataram dois surtos, em Nova Iorque, de encefalite por listeriose envolvendo pequenos ruminantes, um em ovelhas e outro em cabras, sendo utilizadas técnicas baseadas em amplificação de DNA. Em ambos os surtos, a *Listeria monocytogenes* foi isolada da silagem e do tecido cerebral dos animais afetados, sendo que as amostras isoladas não eram idênticas, o que sugere que a existência de um ou mais processos seletivos pelos quais certas cepas da bactéria são mais propensas a originar uma doença.

CARTER (1988) cita que a doença em animais é conhecida como listeriose e a forma neural é, algumas vezes, denominada “doença giratória”. Sendo que esta forma é mais comum em ruminantes. Os sinais clínicos do sistema nervoso central incluem ataxia unilateral e meningite com microabscessos envolvendo, principalmente, a base do cérebro. Além disso, podem ocorrer ceratoconjuntivite, oftalmia e abortos sem manifestação neural de doença. Em monogástricos, a doença assume a forma visceral e parece ter sua difusão por via hematogênica após a ingestão do microorganismo.

A maior parte das listerioses animais notificadas na RDA são no ovino, em que a doença apresenta-se, quase exclusivamente, como listeriose do SNC, podendo também adoecer animais de qualquer idade e de ambos os sexos (BEER, 1999).

#### **1.4.6 Epidemiologia**

As enfermidades de origem alimentar são altamente prevalentes em países desenvolvidos e em desenvolvimento e há indícios de que em alguns deles tenham aumentado. Exemplo disso são os surtos de listeriose humana envolvendo alimentos contaminados, o que tem aumentado dramaticamente nas últimas décadas (DALU e FERESU, 1996).

A primeira evidência de que a listeriose, doença causada pela *Listeria monocytogenes*, era transmitida por alimentos foi relatada após um surto no Canadá envolvendo o consumo de um tipo de salada elaborada com repolho cru, chamada Coleslaw, desde então, surtos maiores têm sido associados ao leite, queijos e ovos (BLACKMAN e FRANK, 1996).

A listeriose humana é uma doença esporádica observada durante todo o ano, com pico de incidência nos meses mais quentes. Epidemias focais têm sido associadas ao consumo de leite, queijo, carne inadequadamente cozida (tais como: peru e frios), vegetais crus não-lavados e repolhos contaminados. Durante esse tempo têm sido abundantes os surtos nos Estados Unidos e em outras partes do mundo, envolvendo produtos lácteos, vegetais e produtos cárneos contaminados com *Listeria monocytogenes* (FARBER e PETERKIN apud CZUPRYNSKI, 1994).

Com relação a vegetais, AURELI et al. (2000) relataram um surto de gastroenterite febril associada ao milho contaminado com *Listeria monocytogenes*, entre os alunos de duas escolas primárias no norte da Itália, onde, dos 2.189 entrevistados, 82% foram expostos a bactéria, 1.566 (72%) apresentaram sintomas e destes 292 (19%) foram hospitalizados. O surto foi associado à salada fria de milho com atum. E o sorotipo envolvido foi o 4b revelando que a infecção de origem alimentar com *Listeria monocytogenes* pode causar uma doença febril com gastroenterite em imunocomprometidos.

DALU e FERESU (1996), no Zimbábue, verificaram que os produtos lácteos, como um todo, são os alimentos mais freqüentemente comprometidos com nos surtos de listeriose. Entre os produtos implicados estão: o leite cru ou, impropriamente, pasteurizado, os vários tipos de queijos, o leite achocolatado, os sorvetes e o buttermilk.

Levando-se em conta que o leite e seus derivados podem, em determinadas condições, transmitir ao homem uma grande variedade de doenças e que os mesmos constituem um ótimo alimento para o homem e excelente meio de cultura para os microorganismos, CRUZ (1984) afirma que há muitos patógenos importantes na prática, porém há outros que poderão ser implicados em surtos, uma vez que os produtos de laticínios podem servir de veículo para a maioria dos patógenos provenientes tanto dos animais como dos manipuladores do leite e derivados.

Dentre os microorganismos que têm sido isolados do leite cru, *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e *Escherichia coli* enteropatogênica, podem sobreviver e, inclusive, multiplicar-se em alguns tipos de queijos, sendo que estes três microorganismos são considerados de alto risco para a indústria leiteira (GARCIA et al, 1991).

Em pesquisa realizada na Paraíba, por CATÃO e CEBALLOS (2001), investigou-se a presença de *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *Escherichia coli*, no leite cru e pasteurizado. Num total de 75 amostras de leite (45 crus, 15 recém-pasteurizados e 15 ensacados), foi observado que todas as amostras estavam fora do padrão estabelecido pela legislação e a presença de *Listeria* spp. foi confirmada em 33 amostras de leite cru e nove amostras de leite pasteurizado

Sendo observado ainda no leite cru a seguinte porcentagem: 66,6% de *Listeria monocytogenes*, 25,3% de *Listeria innocua*, 3,9% de *Listeria ivanovii*, 2,5% de *Listeria welshimeri* e 1,5% de *Listeria grayi*. No leite pasteurizado isolou-se apenas *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* (CATÃO e CEBALLOS, 2001).

FENLON et al. (1996) também indicam que a planta ambiental pode ser o local propiciador da contaminação por listeria a partir de produtos lácteos.

O que foi confirmado na pesquisa realizada por MEYER-BROSETA et al. (2003), na França, ao estimar a baixa concentração bacteriana de *Listeria monocytogenes* em leite cru, através de coletas de leite em fazendas durante os anos de 1997 até 2001, com o propósito de avaliar o tempo decorrido de presença/ausência desta bactéria. Os resultados indicaram que a contaminação do leite na fazenda é, freqüentemente, um evento esporádico e que os níveis baixos de *Listeria monocytogenes* encontrados foram devidos a contaminação ambiental.

No Brasil, SILVA et al. (2002), através de uma pesquisa sobre a ocorrência de *Listeria* spp. nos pontos críticos de controle e o ambiente de processamento do queijo Minas Frescal, perceberam que de 218 amostras coletadas ao longo da linha de produção e do ambiente, 13 amostras foram positivas para *Listeria* spp., onde nove eram *Listeria innocua*, duas eram *Listeria grayi* e duas eram *Listeria monocytogenes* (sorotipos 1/2a e 4b).

FENLON et al. (1996) destacam que a *Listeria monocytogenes* tem sido identificada como um patógeno sério de doença alimentar, pois a mesma está difundida na planta ambiental e é excretada pelos animais e ambos são precursores de alimentos para humanos.

FRANCIOSA et al. (1998), coletaram dez amostras clínicas e de alimentos durante investigações epidemiológicas de episódios de listeriose (dois casos esporádicos e um surto) que ocorreram ao norte da Itália durante 1993-1995, confirmaram então, através de técnicas de tipificação, que os alimentos foram os veículos das infecções.

Enquanto que BEER (1999) cita que o solo pode ser considerado como real via de transmissão da listeria, o qual é contaminado a partir dos animais infectados de forma inaparente.

E, ainda que seja responsável por poucos surtos, a ampla distribuição na natureza e sua habilidade para crescer em temperaturas de refrigeração a *Listeria monocytogenes* tem sido impelida para dentro do lugar de destaque entre os patógenos de enfermidades de origem alimentar (PICKETT e MURANO, 1996).

SERGELIDIS et al. (1997) avaliaram, na Grécia, a temperatura de distribuição e a prevalência de *Listeria* spp. em 136 refrigeradores domésticos e de 228 refrigeradores de lojas. Somente dois refrigeradores domésticos abrigavam *Listeria monocytogenes* em seu interior. A *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* foram encontradas em 3,1% e 1,7 % das amostras dos refrigeradores de lojas. E com relação à temperatura, mais da metade dos refrigeradores tinham a temperatura acima ou igual a 9°C, o que indicou não haver correlação entre a temperatura ambiente do refrigerador e a baixa incidência desta bactéria.

MURRAY et al. (2002), notaram que, com efeito, a taxa de mortalidade nas infecções sintomáticas por listeria (20 a 30 %) foi superior a da maioria das outras doenças transmitidas por alimentos.

Em uma pesquisa realizada na Inglaterra, 822 amostras de comidas prontas, 136 amostras de solo, 115 amostras de detritos e 692 espécimes fecais foram analisados para isolamento de *Listeria* spp. As amostras apresentaram porcentagens positivas para *Listeria monocytogenes* 10,5% alimentos, 0,7% do solo, 60% dos detritos e 0,6% dos espécimes fecais. Uma alta porcentagem de *Listeria monocytogenes* foi encontrada na carne bovina (34,6%), cordeiro (40%), suíno (40%) e salsicha (34,7%). Entretanto *Listeria monocytogenes* foi raramente encontrada em patês (1/40) e queijos macios (1/251) e ambos têm sido envolvidos em surtos alimentares neste país (MacGOWAN et al., 1994).

Na Coreia, no período compreendido entre 1993 e 1997, um total de 1537 amostras de alimentos caseiros e importados foram examinados para *Listeria monocytogenes*. Ao todo, 7,9% amostras continham *Listeria monocytogenes*, assim divididas: 4,3% em carne de bovina, 19,1% em carne suína, 30,2% em frango, 1,2% em crustáceos, 4,4% em leite cru, 4,4% em mexilhão defumado congelado e 6,1% em sorvete. Segundo BAEK et al. (2000), a maioria dos sorotipos isolados foi do tipo 1/2b, exceto nos frangos, onde o sorotipo 1/2a foi predominante.

Quanto aos pescados marinhos, poucas são as referências encontradas sobre a detecção deste microorganismo, sendo o risco de veiculação do mesmo para o consumidor

considerado remoto, visto que o alimento sofrerá cocção antes de ser ingerido (HOFER e RIBEIRO, 1990).

Em produtos cárneos, a incidência é menor, devido ao baixo número de *Listeria* sp. encontrado nesse alimento, como foi afirmado por YU et al. (1995), que de 100 retalhos de carne crua (bovina, carneiro, suíno e peru) analisados, encontraram apenas dez amostras positivas para *Listeria monocytogenes*.

Entretanto, KABUKI e KUAYE (1997) em pesquisa realizada em Campinas – SP, encontraram uma alta incidência de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes*, em 30 amostras de carnes de frango, sendo dez de peito de frango e 20 de carcaças, onde 100% e 60% de amostras positivas para as carcaças e 90% para peitos de frango tanto para o gênero como para a espécie *Listeria monocytogenes*.

O que também foi evidenciado por PELISSER et al. (2001) em Florianópolis-SC, com carcaças de frango congeladas, onde de 48 amostras analisadas, 21 (43,7%) amostras foram positivas para *Listeria* spp. As espécies que foram isoladas e identificadas foram 23% de *Listeria monocytogenes*, 8,3% de *Listeria innocua* e 2,1% *Listeria welshimeri* e 2,1% de *Listeria seeligeri*.

E BORGES et al. (1999) evidenciaram a presença de *Listeria* spp. em uma pesquisa com 80 amostras de quatro tipos diferentes de salames fermentados (Friolano, Hamburguês, Italiano e Milano), comercializados no Rio de Janeiro, a incidência no tipo Italiano foi de 13,3% de amostras positivas para *Listeria monocytogenes*, bem como 6,7% de amostras positivas para *Listeria innocua* e do tipo Milano 16,6% das amostras positivas para *Listeria innocua*. Sendo as demais amostras e tipos negativos para *Listeria* spp.

Na França, JACQUET et al. (1995), a partir de 279 casos de listeriose humana (92 casos de grávidas e 187 de pessoas não gestantes) que foram causados pelo sorotipo 4b, no período entre março e dezembro de 1992, avaliaram os resultados do estudo de causa e da análise microbiológica dos alimentos e identificaram a língua de porco em geléia e produtos cárneos “prontos para comer” como os principais veículos destes surtos e em menor extensão os produtos de delicatessen contaminados secundariamente por manipulação em lojas de alimentos.

No Japão, em pesquisa conduzida por IIDA e colaboradores (1998), para detecção de *Listeria monocytogenes* em humanos, animais e alimentos, as taxas da bactéria foram de 100% em pacientes com listeriose e de 1,3 % em humanos saudáveis. As taxas de contaminação em carne bovina fatiada (34,2%) e suína (36,4%) foram significativamente mais altas que em carcaças bovinas (4,9%) e suínas (7,4%). E as porcentagens dos sorotipos

1/2a, 1/2b e 4b foram altas em amostras isoladas a partir de peixes frescos (90%), peixes processados e moluscos (100%) e queijos naturais importados (96,7%).

No Chile, CORDANO e ROCOURT (2001) analisaram 2.145 amostras de alimentos e destas, 77 amostras foram positivas para *Listeria monocytogenes*, sendo as amostras contaminadas divididas da seguinte forma: 3,5% de sorvete, 0,8% de queijo macio, 3,6% dos produtos cárneos processados e 11,6% crustáceos e os sorotipos encontrados foram: 1/2a (25 isolados), 1/2b (19), 4b (20), 3b (7), 1/2c (2) e não tipáveis (4). Amostras negativas foram estabelecidas em 115 amostras de queijo duro e em 229 garrafas de leite para bebê.

Na Argentina, diferentes amostras de alimentos de origem animal foram analisadas para *Listeria* spp., cinco amostras de leite cru (de 208) foram positivas para *Listeria innocua*, uma para *Listeria monocytogenes* e uma para *Listeria welshimeri*. A amostra de *Listeria monocytogenes* isolada foi recuperada de uma vaca que apresentava mastite subclínica. Não foram isoladas amostras positivas em leite pasteurizado, leite achocolatado ou de amostras de queijos. E a prevalência de *Listeria ivanovii* foi observada em 2,5% das amostras de carne e uma amostra de *Listeria welshimeri* foi detectada em sorvete (LACIAR et al., 1999).

Todavia, tem se detectado este microorganismo, devido às carnes constituírem excelente meio de multiplicação dessa bactéria e também está associada ao hábito de consumo de carne bovina, às vezes, crua ou de seus derivados semi-cozidos (PICCHI et al., 1999).

A estimativa, segundo a FDA/CFSAN (2001), é de 2.500 doentes e 500 mortes a cada ano devido a esta doença, que é motivo de preocupação primordial entre mulheres grávidas, por causar aborto, morte fetal, infecção severa ou morte de recém-nascidos. Além de ser um sério risco para adultos senis e pessoas imunocomprometidas.

Em uma pesquisa com pacientes com listeriose, cerca de um terço era formado por mulheres grávidas enquanto que quase todos os outros possuíam ao menos uma condição clínica de base que aumentava o risco de contrair a listeriose (SCHUCHAT et al., 1992 apud KONEMAN et al., 2001).

Em uma pesquisa realizada em Los Angeles, Estados Unidos, foi documentado que 34 (10%) dos 351 casos de listeriose não perinatal, ocorridos durante o período de 1985 até 1992, foram de pessoas infectadas com o vírus HIV e destas, 25 tinham conhecimento da doença desde 1987. E que a incidência de listeriose foi de 95,8 e 8,8 casos por 100.000 pessoas por ano entre as pessoas com AIDS e todas as HIV-positivas, respectivamente.

Porém, isso representa um caso por 100.000 pessoas por ano do total da população (EWERT et al., 1995).

GILOT et al. (1997) relataram um caso esporádico de listeriose, em Bruxelas, associado ao consumo de queijo Camembert contaminado com *Listeria monocytogenes*, em um homem de 73 anos de idade imunocomprometido. Testes de sorotipagem, esterase typing, entre outros, foram utilizados para a confirmação do caso.

Enquanto NEGRI et al. (1994), na Itália, relataram um caso de listeriose septicêmica neonatal em um recém-nascido com insuficiência respiratória séria que morreu aos 30 dias de vida, devido à infecção materna por *Listeria monocytogenes* pela ingestão de queijo fresco artesanal.

Quando nos alimentos há uma elevada carga de microorganismos deteriorantes, como *Lactobacillus* sp. ou *Pseudomonas* sp., estes competem pelo mesmo espaço e pelos nutrientes dos alimentos de modo que a *Listeria* sp. dificilmente poderá se desenvolver até níveis elevados. Por outro lado, este microorganismo possui uma temperatura ótima de crescimento entre 30°C e 35°C. Entretanto, se assinala que pode multiplicar-se a temperatura de 4°C, isto é, necessitando de outras condições (JEREZ, 2001).

FRIEDLANDER JUNIOR (1999) cita que a habilidade da *Listeria monocytogenes* para matar é muito mais forte do que da *E. coli* O157:H7, *Salmonella* sp. e *Campylobacter* sp. combinados.

O que indica que, embora não seja tão comum quanto à salmonelose e a campilobacteriose, a listeriose causa considerável morbidade e mortalidade em humanos. Enquanto nos animais, a letalidade é de 100% (CZUPRYNSKI, 1994; BEER, 1999).

No Brasil, HOFER et al. (2000), em uma pesquisa usando técnicas de fenotipagem e caracterização para espécies e sorovares de 3.112 amostras isoladas de diferentes fontes de infecção (humana, animal, alimentos e ambiental), em diferentes regiões do país durante o período de 1971 até 1997, identificaram a *Listeria monocytogenes* em 382 das 2.330 amostras encontradas em alimentos. Sendo que os sorovares 1/2a, 1/2b e 4b foram os mais prevalentes em produtos lácteos (41,10 e 17 respectivamente) e produtos cárneos (38,128 e 140 respectivamente).

Em queijos a *Listeria monocytogenes* tem sido implicada em surtos em todo o mundo, como pode ser observado no Quadro 3.

**Quadro 3.** Presença de *Listeria* spp. em vários tipos de queijos envolvidos em surtos em diversos lugares.

| Nº de surtos/<br>Casos | Local             | Alimento envolvido       | Autor/ Ano              |
|------------------------|-------------------|--------------------------|-------------------------|
| 1 surto                | Califórnia/ EUA   | Macio, estilo mexicano   | FABER e LOSOS/ 1988     |
| 142 casos              | Califórnia/ EUA   | Macio, estilo mexicano   | LINNAN et al./ 1988     |
| 1 caso                 | Inglaterra        | Macio, de leite de cabra | MACLAUHLIN et al./ 1990 |
| 233 casos              | Bruxelas          | Macio                    | ART e ANDRE/1991        |
| 57 casos               | Suíça             | Macio                    | BULA et al./1995        |
| 32 casos               | Estados Unidos    | Massa crua               | ALTEKRUSE et al./1998   |
| 1 surto                | Carolina do Norte | Macio, estilo mexicano   | MMWR/ 2001              |

A partir de casos de doenças alimentares reportados na França e em outros países industrializados diferentes, desde 1980, De BUYSER et al. (2001), através de uma revisão, indicaram que o leite e os produtos lácteos estão implicados em 1-5% do total de casos de surtos bacterianos, no entanto, detalhes sobre o tipo de produção e o leite envolvidos não foram encontrados.

GARCIA et al. (1991) apontaram que, dentre os surtos ocorridos nos Estados Unidos, no período compreendido entre 1948-1988, somente seis surtos de intoxicações e infecções alimentares foram associadas ao consumo de queijo e que os queijos de maior risco sanitário eram os queijos frescos de elaboração artesanal.

Na Espanha, foi conduzida uma investigação sobre a incidência de *Listeria monocytogenes* em queijos macios, adquiridos em supermercados, das 35 amostras analisadas, quatro foram positivas e após estudo de sorotipagem todas corresponderam ao sorotipo 4 (COPEES et al., 2000).

PINTO e REALI (1996), numa pesquisa para avaliar a frequência de *Listeria monocytogenes* e outras listérias coletaram 164 amostras de queijos macios de vários tipos produzidos e comercializados em supermercados e lojas de diferentes áreas e centros da Itália. Destas amostras oito (4,9%) foram positivas para *Listeria monocytogenes*, sendo sete amostras do sorotipo 1 e uma amostra do sorotipo 4; e 36 amostras (22%) foram positivas para outras listérias, sendo a *Listeria innocua* foi a mais prevalente (72%).

Na Suécia, LONCAREVIC et al. (1995) pesquisaram a ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijos macios e semi-duros em posto de vendas. Das 33 amostras de queijos, 6% foram positivas para *L. monocytogenes* e os queijos produzidos com leite cru foram os mais frequentemente contaminados (42%). Entretanto *Listeria monocytogenes* foi

encontrada somente nos queijos importados (18 da França, um da Alemanha e um da Itália) e todas as cepas eram do sorogrupo 1/2, exceto duas amostras que eram do sorogrupo 4.

Na Suíça, PAK et al. (2002) coletaram durante os anos de 1990-1999, um total de 76.271 amostras nas indústrias de produtos lácteos e da planta ambiental, destas apenas 4,9% foram positivas para a presença de *Listeria monocytogenes* e não foram isoladas amostras em creme, sorvete, leite em pó, iogurte ou queijos frescos. Indústrias de queijos maturados tiveram maior proporção de positivos (7,6%), quando comparadas com pequenas indústrias locais (4,4%). Das amostras de queijos isoladas, o sorotipo 1/2b foi mais associado aos queijos duros e semi-duros enquanto que o sorotipo 1/2a foi associado aos queijos macios.

Nos Países baixos, uma pesquisa realizada por BOER e KUIK (1987) sobre a qualidade microbiológica dos queijos filados azuis (Blue-veined cheese) demonstrou que mais de 40% das 256 amostras excederam a contagem de enterobactérias de 100ufc/g e 26% das amostras excederam a contagem de 100ufc/g para *E. coli*. A *Salmonella* spp. não foi detectada em nenhuma amostra; entretanto, *Listeria monocytogenes* foi isolada de 2 amostras das 20 amostras que foram negativas para a presença de enterobactérias.

No Brasil, dados a respeito da presença de *Listeria* spp. em alimentos ainda são escassos. E em alguns casos, os resultados são discordantes em relação aos queijos consumidos em nosso meio, provavelmente, porque a maioria dos laboratórios não se encontra familiarizada com a metodologia de isolamento e/ou devido aos diferentes procedimentos empregados (SILVA et al., 1998a).

CASAROTTI et al. (1994) avaliaram a ocorrência de *Listeria monocytogenes* em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo Minas Frescal comercializados em Piracicaba-SP, das 20 amostras de cada produto, nove foram positivas quanto à presença de *Listeria monocytogenes* ou outra espécie do gênero.

DELGADO DA SILVA et al. (1998), em uma pesquisa realizada no Rio de Janeiro, avaliaram a incidência de *Listeria monocytogenes* em alguns tipos de queijos brasileiros, onde, das 103 amostras analisadas (32 gorgonzola, dois roquefort, três ricotta, dois cheddar, 11 brie, seis camembert, 47 minas frescal), através do protocolo do Health Protection Branch of Canadá, 11 (10,68%) estavam contaminadas com esta bactéria, 13 (12,62%) com *Listeria innocua*, 6 (5,8%) com *Listeria grayi*.

Em João Pessoa, Paraíba, SOUSA (1999) pesquisou a presença de *Listeria* spp. em queijo do tipo Coalho, bem como a presença de bactérias aeróbias mesófilas e/ou anaeróbias facultativas viáveis, coliformes totais, fecais e *E. coli*. Das 30 amostras analisadas, 15 foram

positivas para a presença desta bactéria, sendo que *Listeria innocua* estava presente em 100% das amostras positivas e *Listeria monocytogenes* estava presente em 14 amostras positivas e a ocorrência dos outros microorganismos isolados não pareceu exercer influência sobre o crescimento de *Listeria* spp no queijo Coalho.

No estado do Amazonas, a presença de *Listeria monocytogenes* foi estudada por Ramos (1999) em um pesquisa com o queijo tipo coalho, de 58 amostras analisadas duas amostras foram positivas para *Listeria* sp., sendo uma para a espécie *Listeria monocytogenes* e uma para a espécie *Listeria innocua*.

DELGADO DA SILVA et al. (2001) avaliaram um total de 207 cepas de *Listeria monocytogenes*, isoladas de diferentes tipos de queijos comercializados no Rio de Janeiro, quanto à sorotipagem e sua habilidade de produzir beta-hemolisina e lecitinase e absorver o Vermelho Congo. Das 207 amostras, 59,9%, 27,5% e 12,6% foram dos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b respectivamente e 175 amostras produziram lecitinase, entretanto a *Listeria monocytogenes* não absorveu o Vermelho Congo.

## **2 MATERIAIS E METODOLOGIA**

### **2.1 Pesquisa de *Listeria monocytogenes***

#### **2.1.1 Amostragem**

As 39 amostras, pesando 200 gramas cada dos queijos artesanais dos tipos: Coalho e Manteiga e de 500 gramas de Mussarella, produzidas nas cidades de Careiro da Várzea e Autazes, no estado do Amazonas e comercializadas nas feiras livres da cidade Manaus, foram coletadas, embaladas em sacos plásticos resistentes e esterilizados, identificadas e acondicionadas em caixas de material isotérmico, contendo cubos de gelo. Foram então, transportadas para o Laboratório de Microbiologia do Setor de Alimentos do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amazonas.

#### **2.1.2 Tratamento das Amostras**

No laboratório, as amostras foram registradas em fichas individuais e preparadas para a análise microbiológica de acordo com a metodologia descrita em SILVA *et al.* (1997), para alimentos sólidos, que visa a retirada de vários pontos da peça, através de cortes menores, de modo a se obter a quantidade requerida para a análise.

### 2.1.3 Análise Microbiológica

A análise foi conduzida, em duplicata, das amostras coletadas, quanto à presença ou ausência de *Listeria monocytogenes*, em 25 gramas de amostra, de acordo com a legislação brasileira vigente (RDC nº 12 de 02/01/2001), utilizando-se nesta pesquisa uma metodologia adaptada, a partir das metodologias descritas no *Bacteriological Analytical Manual* (BAM, 2001) e no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (APHA, 1992). Sendo a mesma descrita a seguir:

1. As amostras de 25g foram pesadas em balança analítica e preparadas em câmara de fluxo laminar sendo, então, colocadas em sacos plásticos identificados esterilizados, com 225 mL de Caldo LEB (*Listeria Enrichment Broth – UVM formulation - OXOID*) em cada um. Em seguida, foram homogeneizados por dois minutos e então incubados em estufa a 30°C por quatro horas. Transcorrido o tempo determinado, foi adicionado, aos sacos contendo as amostras e o Caldo LEB, uma determinada quantidade do suplemento de ácido nalidixico e acriflavina, sendo novamente incubados em estufa a 30°C por mais 44 horas em cultivo estacionário.

2. Decorrida às 44 horas, foi coletado, com auxílio de uma pipeta de 1mL, uma alíquota de 0,1 mL do material incubado e adicionado aos tubos de ensaios esterilizados, contendo 10 mL de Caldo Fraser (*Fraser Listeria Selective Enrichment Broth - MERCK*) suplementado com ácido nalidixico e então, foram incubados em estufa a 35°C por 40 horas.

3. Após as 40 horas de incubação, foi feita a seleção dos positivos, onde os tubos de ensaio que permaneceram claros foram descartados e dos tubos escuros foi coletada uma alçada que foi semeada em placas de petri previamente preparadas com 15 mL dos meios seletivos OXA (*Listeria Selective Agar – Oxford Formulation - OXOID*) e PALCAM (*Listeria Selective Agar To Van Netten et al. - MERCK*) e, após a semeadura, foram incubadas em estufa a 35°C por 48 horas.

4. As placas semeadas foram selecionadas, após as 48 horas de incubação, quanto ao crescimento de colônias, sendo os resultados anotados nas fichas individuais e sendo em seguida eliminadas as placas negativas.

5. As colônias que se apresentassem como suspeitas, com halo escuro ao redor da colônia, seriam coletadas (cinco ou mais) e transferidas para placas de petri contendo TSAYE (*Tryptone Soya Agar - OXOID*), com 5% de extrato de levedura (*Yeast extract - OXOID*) e, em seguida, serão incubadas em estufa a 30°C por 48 horas.

5. Após o crescimento em TSAYE, serão feitos simultaneamente os testes bioquímicos de catalase e oxidase e a coloração de Gram de acordo com as técnicas descritas em KONEMAN *et al.*(2001).

6. Serão transferidas cinco a seis colônias da placa com TSAYE para placas de petri contendo Agar Sangue (Blood Agar Base - OXOID) com 5% de sangue de ovelha (Sheep Blood Defibrinated - OXOID) para o teste de  $\beta$ -hemólise e para o teste CAMP, com cepas de *Staphylococcus aureus* e *Rhodococcus equi*, conforme descrito por Silva *et al.*(1997).

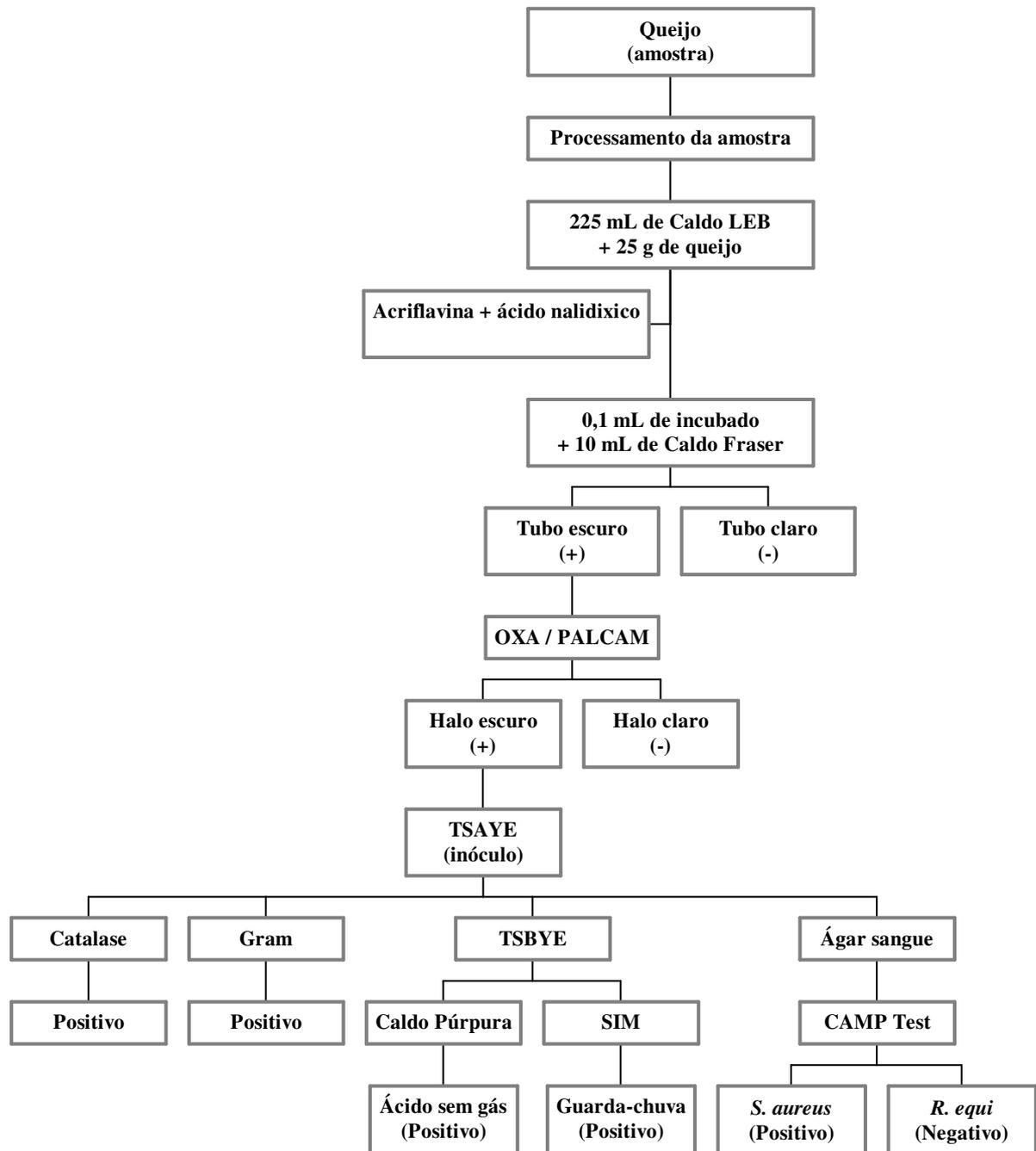
7. Das placas com TSAYE, serão transferidas algumas colônias para tubos de ensaio contendo TSBYE (Tryptone Soya Broth - OXOID) com 2% de extrato de levedura (Yeast extract - OXOID) e incubados a 35°C por 24 horas. Será observado o crescimento nos tubos e estes serão reservados como inóculo para as análises posteriores.

8. Para o teste de motilidade será feita uma semeadura em profundidade, a partir do inóculo cultivado em tubo de ensaio com TSBYE, em tubos de ensaio contendo 9 ml de meio de motilidade – SIM (SIM Medium - OXOID), através de picada com agulha de platina no centro do meio até a profundidade de três centímetros, aproximadamente, e os mesmos serão mantidos a temperatura ambiente por sete dias para observação de crescimento característico para listeria em forma de guarda-chuva.

9. O teste de fermentação de carboidratos será feito transferindo-se uma alçada do inóculo para tubos contendo Caldo Púrpura de Bromocresol (Purple Carbohydrate Fermentation Broth Base - DIFCO) com 0,5% de dextrose, manitol, xilose e rhamnose, sendo então os tubos incubados a 35°C por sete dias, para visualização da redução da rhamnose.

Após o isolamento das amostras positivas para os testes iniciais, os mesmos serão submetidos ao teste API Listeria para identificação da espécie e posteriormente serão enviados para um laboratório mais especializado para tipificação da *L. monocytogenes*.

O fluxograma (Figura 4) ilustra melhor a metodologia para o isolamento de *Listeria monocytogenes* aplicada nesta pesquisa.



**Figura 4.** Fluxograma da metodologia para isolamento de *Listeria monocytogenes* adaptada do BAM (2001) e do APHA (1992).

## 2.2 Pesquisa de coliformes totais, fecais e *Escherichia coli* em queijo Manteiga

### 2.2.1 Análise Microbiológica

Das análises em duplicata foram realizadas as contagens de coliformes totais, coliformes fecais e *Eschechia coli*, pelo método do número mais provável (NMP), em 25

gramas de amostra, conforme a metodologia recomendada pelo *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (APHA, 1992). Sendo a mesma descrita a seguir:

1. A amostra de 25 gramas de queijo Manteiga foi pesada em balança analítica e preparada em câmara de fluxo laminar, sendo em seguida diluída em 225 mL de solução de citrato de sódio a 2 % e homogeneizada, constituindo assim a diluição  $10^{-1}$ . Posteriormente foram realizadas duas diluições decimais sucessivas com a mesma solução.

2. Para o teste presuntivo, das diluições decimais foram retiradas três alíquotas de 1 mL, foram adicionadas em tubos de ensaio, com tubos de fermentação de Durham, contendo 10 mL de Caldo LST (Lauril Sulfato triptose – DIFCO) e, em seguida, incubadas em estufa a 35 °C por 24-48 horas. Transcorridas as 48 horas de incubação, foram considerados positivos os tubos com turvação e produção de gás.

3. Dos tubos positivos foi retirada uma alçada da cultura e inoculadas em tubos de ensaio com tubos de Durham, contendo 10 mL de Caldo VB (Caldo Verde Brilhante Bile a 2% - DIFCO) utilizado para teste confirmativo de coliformes totais e depois incubadas a 35 °C por 24-48 horas.

Após as 48 horas de incubação, foram observados os tubos com produção ou não de gás e atribuídos os valores de NMP para coliformes totais.

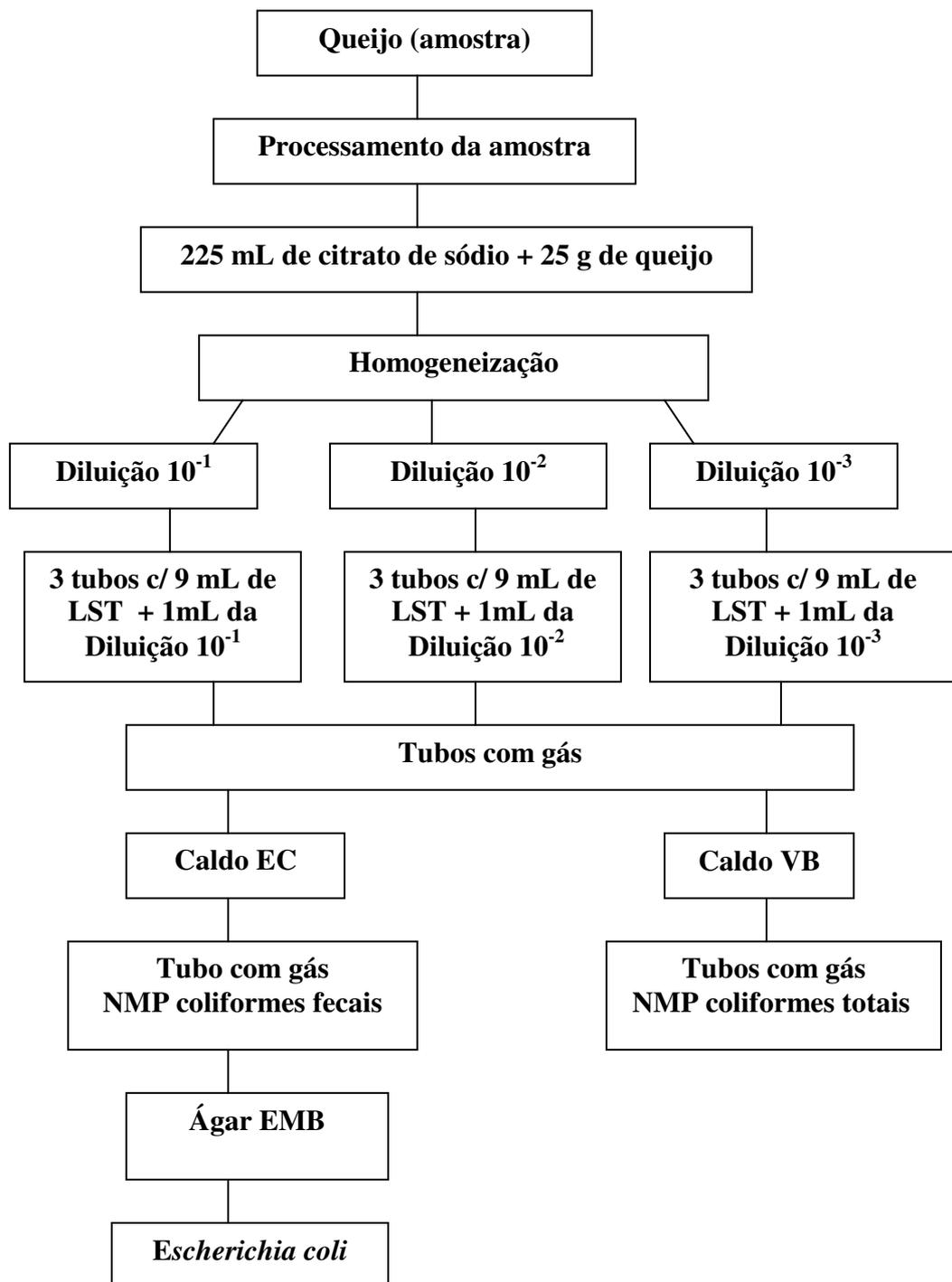
4. Para a realização do teste confirmativo de coliformes fecais, foi feita a inoculação de uma alçada da cultura em 10 mL de Caldo EC (Caldo E. Coli (EC) - MERCK) distribuídos em tubos de ensaio com tubos de fermentação de Durham e , em seguida incubadas em estufa a 45,5°C por 24 horas..

5. Posteriormente foi realizada a leitura dos tubos e aplicados os valores de NMP correspondentes a produção de gás ou não.

6. Na pesquisa para *Escherichia coli* foi realizado o teste confirmativo tradicional retirando-se uma alçada da cultura positiva para a produção de gás, e então inoculou-se em placas de petri contendo Ágar EMB (Ágar Eosina Azul de Metileno (DIFCO) através de semeadura em estrias e, em seguida as placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas.

Decorridas as 24 horas, as placas que apresentavam colônias nucleadas com centro preto com ou sem brilho metálico, foram confirmadas com *Escherichia coli*.

A metodologia aplicada para pesquisa de coliformes totais, fecais e *Escherichia coli* em queijo Manteiga é apresentada na Figura 5.



**Figura 5.** Metodologia aplicada para pesquisa de coliformes totais, fecais e *Escherichia coli*.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Isolamento de bactérias nos queijos Coalho, Manteiga e Mussarela

As 39 amostras de queijos artesanais coletadas nas feiras foram divididas em 19 (49%) amostras de queijo tipo Coalho, 14 (36%) amostras de queijo tipo Manteiga e seis (15%) amostras de queijo tipo Mussarela.

Nas análises preliminares realizadas para o isolamento primário de *Listeria monocytogenes*, os resultados obtidos demonstraram a presença de microorganismos redutores de esculina, o que poderia indicar a presença desta bactéria. No entanto, ao se semear nos meios OXA e PALCAM, não foi observado o crescimento de *Listeria monocytogenes*.

Os resultados das análises microbiológicas demonstraram a ausência da *Listeria monocytogenes* nas 19 amostras de queijo Coalho, sendo que 16% das amostras apresentaram resultado negativo logo após o enriquecimento secundário e 84% somente após o isolamento em ágar OXA e PALCAM.

Com relação aos resultados em queijo Manteiga não foi detectada a presença de *Listeria monocytogenes* nas 14 amostras analisadas, observando-se resultado negativo em 57% das amostras, durante o enriquecimento secundário, quando as amostras de queijo foram semeadas em Caldo Fraser com ácido nalidixico e acriflavina.

Dados semelhantes foram obtidos em ágar OXA e ágar PALCAM, contudo em apenas 43% das amostras foram negativas.

Nas seis amostras de queijo tipo Mussarela, analisadas quanto a presença de *Listeria monocytogenes*, observou-se a ausência desta bactéria em todas as amostras sendo que 33% foram negativas no enriquecimento e 67% foram negativas no isolamento.

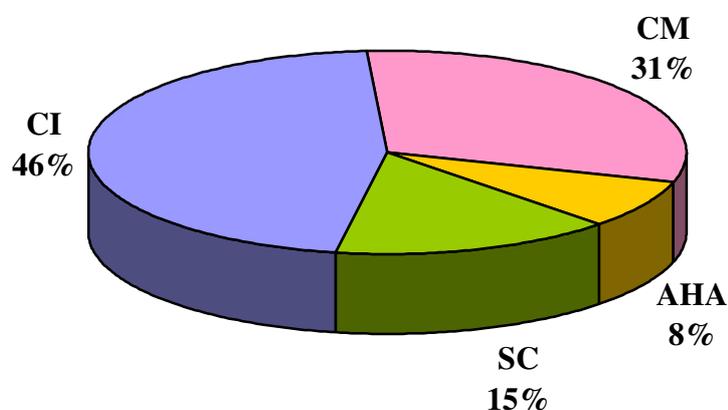
Como o resultado do isolamento foi negativo, os passos seguintes da análise microbiológica para *Listeria monocytogenes* não foram realizados a pesquisa foi encerrada.

### 3.2. Caracterização dos isolados bacterianos em meio seletivo.

As 26 (66,66%) amostras que foram processadas para crescimento de *Listeria monocytogenes* em meios seletivos sólidos (OXA e PALCAM) apresentaram características diferenciais quanto a morfologia das colônias (tabela 2).

**Tabela 2.** Quantitativo das amostras de queijo artesanais comercializados na cidade de Manaus e o aspecto macromorfológico de colônias bacterianas em Ágar OXA e Ágar PALCAM.

| Tipo      | Clara em meio inalterado (CI) |      | Clara em meio modificado (CM) |      | Amarela com halo amarelo (AHA) |     | Sem crescimento (SC) |     |
|-----------|-------------------------------|------|-------------------------------|------|--------------------------------|-----|----------------------|-----|
|           | Nº                            | %    | Nº                            | %    | Nº                             | %   | Nº                   | %   |
| Coalho    | 08                            | 66,6 | 02                            | 25   | 02                             | 100 | 04                   | 100 |
| Manteiga  | 03                            | 25   | 03                            | 37,5 | 00                             | 0   | 00                   | 0   |
| Mussarela | 01                            | 8,4  | 03                            | 37,5 | 00                             | 0   | 00                   | 0   |
| Total     | 12                            | 100  | 08                            | 100  | 02                             | 100 | 04                   | 100 |



**Figura 6.** Percentual quantitativo e aspecto de colônias bacterianas (CI = clara em meio inalterado; CM = clara em meio modificado; SC = sem crescimento e AHA = amarela com halo amarelo) em Ágar OXA e Ágar PALCAM.

No meio PALCAM, houve crescimento em duas amostras de queijo Coalho, de colônias de coloração amarela com halo amarelo, sugerindo o crescimento para *Enterococcus* sp, conforme recomendações do fabricante do meio seletivo, entretanto não foi observado o desenvolvimento de colônias típicas de *Listeria monocytogenes*, cujas colônias se apresentam cinza-esverdeadas, planas, opacas com halo marrom a negro ao redor da colônia.

### 3.2 Pesquisa de Coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli*.

#### 3.2.1 Teste confirmativo para Coliformes totais.

Das 10 amostras de queijo Manteiga coletadas nas feiras da cidade de Manaus, sete foram positivas para a presença de coliformes totais, correspondendo a 70% do total de amostras analisadas.

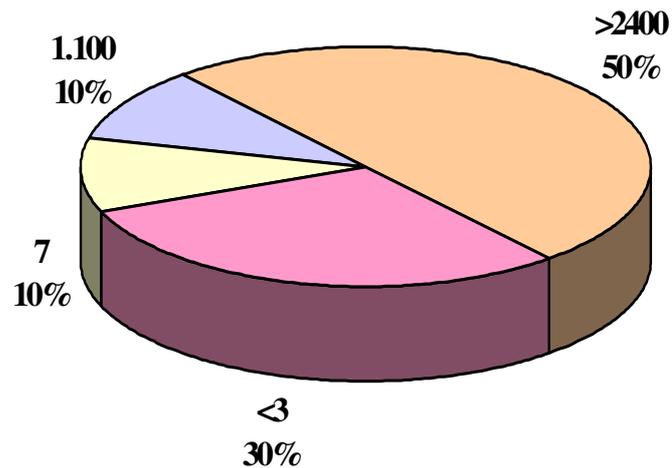
Na pesquisa para coliformes totais no queijo Manteiga coletado nas feiras de Manaus, encontrou-se 100% de amostras contaminadas, nas quais 71,4% (5/7) de amostras estavam com alto índice de contaminação ( $\geq 2400$  NMP/g) e 28,6% (2/7) apresentaram baixos índices de contaminação ( $<3$  NMP/g) das amostras analisadas (Tabela 3).

**Tabela 3.** Valores de NMP/g para coliformes totais encontrados nas amostras de queijo Manteiga.

| Valores de NMP/g | Amostras positivas |                       |
|------------------|--------------------|-----------------------|
|                  | Nº                 | %                     |
| <3               | 02                 | 2<br>8,6              |
| $\geq 2400$      | 05                 | 7<br>1,4              |
| <b>Total</b>     | <b>07</b>          | <b>1</b><br><b>00</b> |

#### 3.2.2. Teste confirmativo para coliformes fecais.

Para coliformes fecais, todas as 10 amostras foram positivas totalizando 100% de positividade entre as amostras coletadas nas feiras da cidade de Manaus, sendo que os valores de NMP/g variaram, 30% amostras foram encontradas com valores de <3 NMP/g, 10% com valores de 7 NMP/g, 10% com valor de 1100 NMP/g e 50% com valores de  $\geq 2.400$  NMP/g. A Figura 7 ilustra esses valores.



**Figura 7.** Percentual de valores de número mais provável de microorganismos por grama de queijo Manteiga para o teste de coliformes totais.

### 3.2.2. Teste confirmativo de *Escherichia coli* pelo Método Tradicional.

As 10 amostras de queijo Manteiga que foram testadas quanto a presença de *Escherichia coli* no isolamento pelo método tradicional com plaqueamento em Ágar EMB obtiveram 100% de positividade, o que confirmou a contaminação destes queijos com esta enterobactéria.

#### 4. DISCUSSÃO

Nesta presente pesquisa realizada para verificar a incidência de *Listeria monocytogenes*, em 39 amostras de queijos artesanais comercializados na cidade de Manaus, divididas em 19 amostras de queijos Coalho, 14 de queijo Manteiga e seis amostras de queijo Mussarela processadas e analisadas não foi observado o crescimento do microorganismo em 100% de amostras, independentemente do tipo de queijo e local de origem.

Provavelmente, a ausência de *Listeria monocytogenes* nos queijos esteja relacionada aos fatores que propiciam a inibição desta bactéria, ou seja, metabólitos produzidos por outras bactérias da microbiota do queijo. Entre os vários compostos bactericidas produzidos por bactérias lácticas e *Enterococcus* spp. são citados ácidos orgânicos que reduzem o pH, o peróxido de hidrogênio, enzimas bacteriolíticas e bacteriocinas (GUERRA e BERNARDO, 2001a).

Essa inibição por *Enterococcus* spp. está apoiada na pesquisa de MENÉNDEZ et al. (1999) que citam que algumas espécies do Gênero *Enterococcus* (*Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*) são produtoras de bacteriocinas de ação antimicrobiana sobre a *Listeria monocytogenes*.

As bacteriocinas produzidas por *Enterococcus* spp e inibidoras de *Listeria* spp. têm sido amplamente estudadas, dentre elas encontram-se: enterocina 4 e enterocina 226NWC produzidas por *Enterococcus faecalis* e enterocina CCM4231, enterocina A2000, enterocina RZS C5, enterocina RZS C13 e enterocina A produzidas por *Enterococcus faecium*

(NUNES et al, 1997, RODRIGUEZ et al., 1997; VILLANI et al., 1993; LAUKOVA e CZIKKOVA, 2001; LAUKOVA et al., 2001; PANTEV et al. 2002; VLAEMYNCK et al. 1994; ENNAHAR e DESCHAMPS, 2000).

Além do gênero *Enterococcus*, outros microorganismos são produtores de bacteriocinas inibidoras de *Listeria* spp., tais como: *Lactococcus lactis* (lacticina 3147), *Lactobacillus plantarum* (pediocina AcH producer), *Carnobacterium piscicola* (carnocina CP5), *Brevibacterium linens* (bacteriocina sem designação) (STECCHINI et al., 1995; MCAULIFFE et al., 1999; ENNAHAR et al., 1998; MATHIEU et al., 1994; EPPERT et al., 1997; MOTTA e BRANDELLI, 2002).

Outras bacteriocinas têm sido também testadas quanto à eficiência em inibir *Listeria* spp. em queijos são elas: a Piscalin 126 e a nisina, sendo esta última utilizada atualmente na indústria (WAN et al., 1997; DAVIES et al., 1997; DELVES et al., 1996; BENKERROUM et al. 2000).

Outros parâmetros que podem ter contribuído para o não isolamento de *Listeria monocytogenes* nas amostras de queijo, na região amazônica, são relacionados com a baixa frequência desse microorganismo nos diferentes tipos de queijos consumidos mundialmente e a região de fabricação do produto.

Essa proposição foi confirmada pelos trabalhos de CORDANO e ROCOURT (2001), no Chile, os quais determinaram a presença de *Listeria monocytogenes* em queijo macio [0,8% (2/256 amostras de queijo)] e a ausência nas amostras de queijo duro. Na Inglaterra, com queijos macios e semi-maturados [2,6% (20/ 769)], na Suécia, com queijos macios [6% (20/333)], na Itália, com queijos macios [4,8% (8/164)], no Rio de Janeiro com queijos variados [10,6% (11/ 103)], em Recife com queijo Coalho [6,6% (6/90)], em Manaus com queijo Coalho [3,44% (2/58)] e na Argentina com queijos macios, [11,4% (4/35)] (GREENWOOD et al., 1991; LONCAREVIC et al., 1995; PINTO et al., 1996; DELGADO DA SILVA et al., 1998; SENA et al., 1997; RAMOS, 1999; COPES et al. 2000).

A ocorrência ou não de *Listeria monocytogenes* em produtos lácteos tem sido relatada nos últimos anos e vem se confirmando a prevalência desta bactéria não só em alimentos de origem animal como também em locais de processamento destes alimentos, porém, predominantemente em baixa frequência (HARVEY e GILMOUR, 1992; CASAROTTI et al., 1994; WARNKEN et al., 1997).

Os níveis de contaminação por *Listeria monocytogenes* são baixos, na França, dado classificado por MEYER- BROSETA et al. (2003), como um evento esporádico que ocorre no leite cru, em consequência de contaminação ambiental.

Em leite cru e pasteurizados, bem como outros produtos lácteos, diversos trabalhos têm sido efetivados para determinar a presença de *Listeria* spp., como na Argentina, onde LACIAR et al (1999) investigaram a presença em produtos de origem animal e dentre as 208 amostras de leite cru observaram o isolamento de cinco amostras para *Listeria innocua*, uma para as espécies *Listeria welshimeri* e uma para *Listeria monocytogenes*. Em leite pasteurizado, leites achocolatados e queijos, não foi encontrada a presença de *Listeria monocytogenes*, evidenciando a necessidade de tratamento do leite antes do consumo e da produção de derivados conforme exigido pela Resolução nº 12 da ANVISA

A presença de espécies não patogênicas de *Listeria* spp. em alimentos lácteos sugere que o crescimento de *Listeria monocytogenes* pode ocorrer caso haja contaminação do produto por esta bactéria no processamento e/ou na manipulação. Também, na pesquisa de LACIAR et al. (1999), uma amostra de sorvete foi positiva para *Listeria welshimeri* que em conjunto com as amostras positivas de *Listeria innocua* e *Listeria welshimeri* em leite cru confirmaram as afirmações contidas nos trabalhos de HEISICK et al. (1995).

E, observando-se que, nos trabalhos realizados por SENA et al. (1997) em Recife, SOUSA (1999) em João Pessoa e RAMOS (1999) em Manaus, todos com queijo Coalho produzido artesanalmente, foi encontrada a ocorrência de coliformes acima da permitida pela Resolução nº 12 de 02 de janeiro de 2001, pode-se supor que a ausência da *Listeria monocytogenes* nesta pesquisa foi causada pela presença de microorganismos contaminantes produtores de bacteriocinas e compostos listericidais.

Tal hipótese pode ser também sustentada pela pesquisa de BOER e KUIK (1987) que em amostras de queijos filados azuis somente isolaram duas amostras de *Listeria monocytogenes* e as amostras positivas foram isoladas a partir de 20 amostras que apresentaram resultado negativo para a presença de enterobactérias.

Considerando as hipóteses já discutidas, nesta pesquisa, 10 amostras de queijo Manteiga foram analisadas quanto à presença de coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli* e os resultados obtidos demonstraram alto índice desses bioindicadores de qualidade nas amostras analisadas e, em algumas amostras, o quantitativo desses microorganismos excedeu valores de NMP/g de  $\geq 2.400$ .

Em concordância com estes resultados pode-se inferir que a hipótese relacionada com a presença de inibidores de *Listeria monocytogenes* pode ser verdadeira. Contudo, não

foram feitos testes com relação à existência de bacteriocinas que têm atividade listericida, bem como não foi feito o isolamento das bactérias encontradas e assinaladas como suspeitas para *Enterococcus* spp.

Com relação à fabricação dos queijos artesanais, adotou-se o preparo do queijo Manteiga como um exemplo das condições indesejáveis observadas durante a produção em uma pequena fábrica do interior do Estado do Amazonas (Figura 7), valendo-se ressaltar que tais condições podem propiciar a contaminação dos queijos por microorganismos deteriorantes e microorganismos patogênicos.

O leite é trazido de outras localidades de charrete até a fábrica, onde então o leite é desnatado e separado da nata, com auxílio de uma desnatadadeira mecânica (A e B). O leite desnatado é reservado para coagular durante 24 horas, sendo adicionado ao mesmo soro lácteo fermentado e sem adição de coalho (C). O leite posto para coagular no dia anterior é aquecido para que a massa coagulada se separe do soro de leite (D) e adiciona-se água morna para a primeira lavagem (E). Depois é feita a dessoragem (F) e, então são feitas duas lavagens com leite desnatado e dessoragem (G), a massa acidificada agregada é então prensada levemente para eliminar o soro de leite ainda presente (H), então, a massa começa a ser mais aquecida e os grumos começam a fundir-se e agregar-se (I e J), após a fusão, inicia-se o processo de filagem da massa (L), logo em seguida é adicionada a manteiga derretida e a massa é mexida até agregar quase toda a manteiga (M e N), posteriormente, é adicionada uma mistura de bicarbonato de sódio e sal (O) e quando a agregação da manteiga derretida e da mistura está completa, o tacho é retirado do fogo e a massa é transferida para formas de plástico resistentes retangulares (P) e o queijo é desenformado no dia seguinte.



(A)



(B)



(C)



(D)



(E)



(F)



(G)



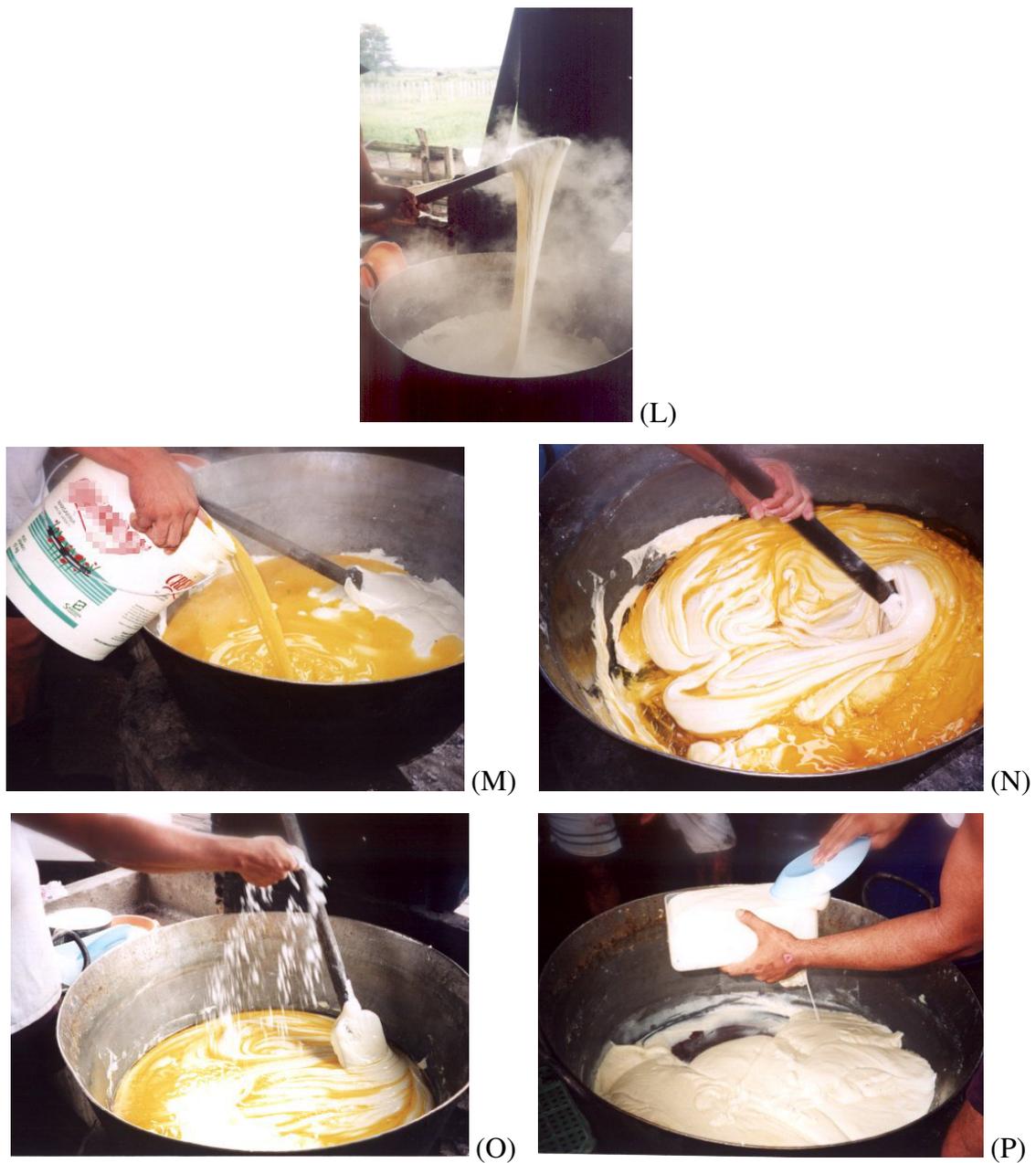
(H)



(I)



(J)



**Figura 8.** Esquema mostrando a produção do queijo Manteiga numa pequena fábrica rudimentar em um município do Estado do Amazonas, onde são observadas algumas falhas na higiene e na manipulação dos ingredientes e no preparo do queijo. Legenda: (A) e (B): Colocação de leite na desnatadeira para tornar o leite desnatado. (C): Adição de soro de leite fermentado após 24 horas. (D), (E) e (F): Dessoragem do leite coagulado e 1ª lavagem com água aquecida. (G): 2ª e 3ª lavagens da massa com leite. (H): Dessoragem da massa coagulada por prensagem com as mãos. (I) e (J): Mexedura da massa acidificada para agregação dos grumos. (L): Filagem da massa acidificada (M) e (N): Adição e agregação da manteiga de garrafa produzida no dia anterior. (O): Adição de sal e bicarbonato de sódio na massa já pronta. (P): Enformagem da massa em formas de plástico resistente.

Alguns detalhes na fabricação do queijo Manteiga, nesta fábrica, são relevantes, tais como: o uso das mãos sem proteção, para manipular a massa acidificada (Figura 9), a utilização da manteiga de garrafa produzida no mesmo local, dias antes e estocada numa sala a parte, sem acondicionamento adequado (Figura 10), a área de estocagem dos queijos para a secagem durante 24 horas (Figura 11) e a presença de uma pocilga com animais bem ao lado da fábrica e que quando soltos têm acesso ao ambiente interno da mesma (Figura 12).



**Figura 9.** Detalhe da utilização das mãos para lavagem da massa acidificada durante o processo de produção do queijo Manteiga.



**Figura 10.** Manteiga estocada em sala separada para utilização na preparação dos queijos. Detalhe para os baldes de plástico descobertos e a presença de frestas na parede.



**Figura 11.** Local de descanso dos queijos sobre mesa de madeira. Os queijos são desenformados cerca de 24 horas após a enformagem. Notar a presença de frestas entre as madeiras que formam a parede da fábrica.



**Figura 12.** Animais criados em ambiente externo a fábrica e que têm acesso a mesma quando soltos.

A fabricação de queijos no Estado do Amazonas ainda é muito rudimentar e apresenta um fator determinante para a produção de queijos, a sazonalidade, já que durante o período em que as terras de várzea estão alagadas (terço final de abril até o terço inicial de agosto), os animais são transferidos para áreas de terra firme (Figura 13), onde o pasto é pobre e os que aí permanecem são alimentados com Canarana, uma forrageira pouco nutritiva, (Figura 14 e 15) de modo que a produção de leite diminui e os fabricantes de

queijos preferem fazer queijo Coalho, sendo o período do ano em que há a escassez de queijos dos tipos Manteiga e Mussarela nas feiras.



**Figura 13.** Pasto alagado durante o período de cheia rio, mais da metade do pasto fica submersa e o gado é levado para as partes mais altas do terreno.



**Figura 14.** Proprietário da fazenda recolhendo a canarana que serve de alimento para os animais da fazenda que permaneceram na área de várzea.



**Figura 15.** Animais magros na área alagada alimentado-se de canarana, vegetação aquática encontrada na área de várzea do município de Careiro da Várzea.

Em relação às condições do ambiente onde os queijos artesanais estão sendo comercializados nas feiras do município de Manaus, observou-se que a falta de higiene é uma constante nos locais de armazenamento dos queijos, de modo que o queijo fica exposto durante todo o período de atividade diária da feira, muitas vezes, em contato com superfícies mal-higienizadas (Figura 16) e sem nenhuma refrigeração, ficando sujeitos às variações de temperatura, muitas vezes em contato com o calor solar (Figura 17).

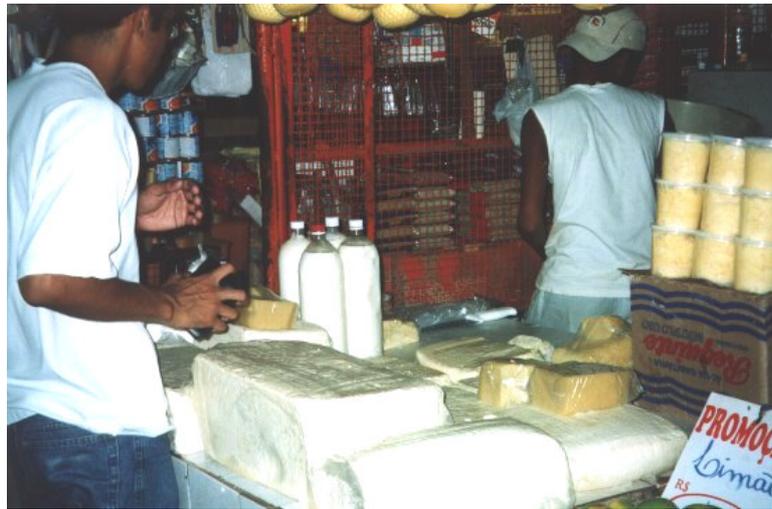


**Figura 16.** Banca localizada em uma feira da cidade de Manaus, onde os queijos são comercializados junto com outros produtos. Observar o queijo exposto em cima da bancada em contato com outros alimentos e também estocado sob a bancada, onde se nota a existência de uma sacola plástica branca parcialmente aberta com o queijo tipo Manteiga exposto.



**Figura 17.** Queijo exposto ao sol à direita na foto, próximo a uma banca de venda de tucupi. Notar a presença da claridade do sol e dos raios incidindo sobre o queijo que está armazenado empilhado sobre um estrado de madeira, em contato com a parede repleta de infiltrações, fungos e sujidades. Foto feita aproximadamente às 11 horas da manhã.

Algumas bancas nas feiras comercializam, junto aos queijos, outros alimentos de origem animal e vegetal, crus e cozidos (Figura 18), o que poderia levar a contaminação cruzada, já que o queijo fica exposto na bancada e alguns consumidores antes de comprar manipulam tanto o queijo quanto os outros alimentos.



**Figura 18.** Consumidor comprando queijos em uma banca de uma feira. Deve-se ressaltar a presença de outros alimentos de origem animal (manteiga e leite acondicionado em garrafa plástica de 2 L) e de origem vegetal (limão), à venda junto aos queijos do tipo Coalho e Manteiga.

A manipulação dos queijos pelo vendedor é feita, muitas vezes, com as mãos desprovidas de luvas, outras vezes, uma luva é improvisada com um saco plástico (figura 19) que serve tanto para manipular e pesar o queijo como para a embalar o produto para o consumidor



**Figura 19.** Queijo Mussarela embalados em redes de plástico e pendurados expostos para comercialização em uma feira do município de Manaus. Notar a utilização, pelo vendedor, de um saco plástico como luva para manuseio do queijo.

Outra observação pertinente à comercialização dos queijos está na disposição destes para venda, onde os queijos do tipo Coalho e Manteiga ficam expostos, geralmente, sobre a bancada e o queijo tipo Mussarela é vendido dentro de uma rede de plástico amarela sem outra proteção, e pendurados por ganchos na parte superior das barracas, durante todo o período de comercialização (Figura 20).



**Figura 20.** Vendedor sentado atrás do balcão de uma banca de queijos atendendo consumidora à direita. Notar a exposição dos queijos Coalho e Manteiga sobre o balcão junto a outros alimentos (goma de tapioca) e o queijo Mussarela pendurado por ganchos, na parte superior da banca sob as luzes fluorescentes.

O queijo Mussarela artesanal comercializado nas feiras da cidade de Manaus apresenta-se com um formato muito particular, levemente piriforme, adquirida quando, após o processamento, são mantidos em redes de plástico. A embalagem em que este queijo, normalmente é comercializado, é a mesma rede na qual foi mantido, sem proteção que evite o contato do mesmo com agentes contaminantes e, normalmente, está pendurada em ganchos nas bancas das feiras (Figura 20).

Os queijos Coalho e Mussarela são produzidos em formas retangulares e, por isso, muito mais fáceis de empilhar do que o Mussarela, porém são maiores e tendem a ficar expostos por muito mais tempo para a venda, do que os queijos Manteiga (Figura 20).

Desse modo, observou-se que os queijos artesanais comercializados nas feiras da cidade de Manaus apresentaram todos os indícios de susceptibilidade à contaminação por microorganismos patogênicos e deteriorantes que se encontram no ambiente.

## 5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados negativos para *Listeria monocytogenes* nos três tipos de queijos artesanais e a presença de altos índices de coliformes totais e fecais e de *Escherichia coli* em queijos Manteiga analisados, os casos relatados, na literatura, de inibição *Listeria* spp pela microbiota contaminante de queijos, e, em conformidade, com as observações inerentes as condições sanitárias inadequadas durante a produção (como mostrado no processamento do queijo Manteiga), a manipulação, embalagem e estocagem dos queijos artesanais e durante a comercialização, nas feiras da cidade de Manaus, pode-se concluir que todos estes fatores reunidos propiciariam o surgimento de contaminação dos queijos por microorganismos tanto indicadores de qualidade e como por agentes patogênicos, possivelmente presentes desde o momento da coleta do leite e produção de queijos até chegar ao consumidor.

Entretanto, faz-se necessário ressaltar que um pequeno passo em relação à ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijos artesanais comercializados no município de Manaus foi dado e que a pesquisa deverá ser continuada de modo a tentar elucidar o resultado negativo para as amostras analisadas, quanto aos fatores citados durante todo este trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAR, F.M. Incidence of Fecal Coliforms and serovars of Enteropathogenic *Escherichia coli* in naturally Contaminated cheese. **Journal of Food Protection**, Vol.51, No.5, Pages 384-385. 1988.
- ALAIS, C. **Ciência de la leche – Princípios de técnica lechera**. Editorial Reverte. México.1985. Pg. 326-333.
- ALMEIDA FILHO, E.S. e NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal”. **Rev. Saúde Pública** Vol.34. No. 6. São Paulo. 2000.
- ALTEKRUSE, S.F.; TIMBO, B.B.; MOWBRAY, J.C.; BEAN, N.H.; POTTER, M.E. Cheese-associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992: sanitary manufacturing practices protect consumers. **Journal Food Protection**. Vol. 61. No. 10. Pages:1405-7. 1998.
- ANDREWS, L.S.; MARSHALL, D.L.; GRODNER, R.M. Radiosensitivity of *Listeria monocytogenes* at various temperatures and cell concentrations. **Journal of Food Protection**. Vol.58, No.7, Pages 748-751. 1995
- ANTUNES, L.A.F. e OLIVEIRA, J.S. Qualidade microbiológica do leite. **Rev. Inst. Latc. Cândido Tostes**, 41(244):20-24, 1986.
- ANUALPEC 2001. **Anuário da Pecuária Brasileira**. FNP Consultoria & comércio. São Paulo. Maio de 2001.Cap.6 – Pecuária de Leite. p.195-236.
- AQUARONE, E. ; LIMA, U.A.; BORZANI, W. **Biotechnologia: Alimentos e bebidas produzidas por fermentação**. V.5. Edgar Blucher:São Paulo.1986. p.132-134; 234-240.

- ARAÚJO, V.S.; SANTOS, E.C.S.; QUEIROZ, M.L.P.; FREITAS, A.C. Análise bacteriológica do queijo Minas Frescal comercializado na cidade do Rio de Janeiro. **Anais do XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia**. 1997. AL-084. P. 283.
- ART, D; ANDRE, P. Clinical and epidemiological aspects of Listeriosis in Belgium, 1985-1990. **Zentralbl Bakteriol** 1991. Vol. 275. No. 4. Pages: 549-56.
- AURELI, P.; FIORUCCI, G.C.; CAROLI, D.; MARCHIARO, G.; NOVARA, O.; LEONE, L.; SALMASO, S. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. **The New Engl. J. of Med.** Vol.342:1236-1241. No. 17.2000.
- AYTAC, S.A. & ÖZBAS, Z.Y. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from turkish pickled white cheese. **The Australian Journal of Dairy Technology** Volume 47 – May, 1992. Pages 60-61.
- BAEK, S.Y.; LIM, S.Y.; LEE, D.H.; MIN, K.H.; KIM, C.M. Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* from domestic and imported foods in Korea. **J Food Prot** 2000 Feb; 63(2):186-9.
- BANKS, W.J. **Histologia veterinária aplicada**. 2ª edição. Manole: Rio de Janeiro. P. 405.
- BEER, J. **Doenças Infeciosas em Animais Domésticos**. Parte 2- Bactérias, fungos e intoxicações. 2ª ed. Editora Roca: São Paulo. 1999. p.48-53.
- BEHMER, M.L.A. **A tecnologia do leite: produção – industrialização – análise**. 12ª ed. Editora Nobel: São Paulo.1982. p.123-146;203-227; 290-297.
- BENKERROUM, N.; OUBEL, H.; ZAHAR, M.; DLIA, S.; FILALI-MALTOUF, A. Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan jben. **J Appl Microbiol**. 2000. Vol.89. No. 6. Pages: 960-8.
- BEUMER, R.R., te GIFFEL, M.C., KOK, M.T.C. and ROMBOUTS, F.M. Confirmation and identification of *Listeria* spp. **Letters in Applied Microbiology**, 1996, 22, 448-452.
- BHUNIA, A. K. Antibodies to *Listeria monocytogenes*. **Critical Reviews in Microbiology**, 1997, 23 (2):77-107.
- BLACKMAN, I.C. & FRANK, J.F. Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. **Journal of Food Protection**. Vol.59. No.8. pages 827-831. 1996.
- BOER, E. & KUIK, D. A survey of the microbiological quality of blue-veined cheeses. **Neth. Milk. Dairy J.** 41 (1987) 227-237.

- BORGES, M.F.; SIQUEIRA, R.S.; BITTENCOURT, A.M.; VANETTI, M.C.D.; GOMIDE, L.A.M. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in salami. **Rev. Microbiol.**v.30.n.4. São Paulo. 1999.
- BOWEN, D.A. & HENNING, D. R. Coliform bacteria and *Staphylococcus aureus* in retail natural cheeses. **Journal of Food Protection**, Vol.57, No. 3, Pages 253-255. 1994.
- BRASIL. Decreto Nº 2.244 de 04 de junho de 1997.– **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. –Título VIII Capítulo IV-Queijos. DOU 04 de setembro de 1997. Ministério da Agricultura/ RIISPOA
- BRASIL. Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2001. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga**. RIISPOA. DOU de 16/07/2001. Ministério da Agricultura/ RIISPOA
- BRASIL. Resolução nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento Técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**. DOU de 10 de janeiro de 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** 1995 Jan; 20(1):66-72.
- CARTER, G.R. **Fundamentos de Bacteriologia e Micologia veterinária**. 1ª ed. Editora Roca: São Paulo. 1988. p.122-124.
- CASAROTTI, V.T.; GALLO, C.R.; CAMARGO, R. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in raw milk, pasteurized type C milk and Minas frescal cheese commercialized in Piracicaba-São Paulo. **Arch Lationam Nutr** 1994 Sep; 44(3):158-63.
- CASTRO, A.; GONZÁLEZ, I.; GUERRA, N.; CUENCA, M.; ROQUE, M. Presencia de Salmonella en quesos. **Rev. Cubana Hig. Epidemiol** 29(1):66-71. 1991.
- CATÃO, R.M.R. e CEBALLOS, B.S.O. *Listeria* spp, coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). **Ciênc. Tecnol.Aliment.**, Campinas. 21(3):281-287. 2001.
- CLARDY, S.; FOLEY, D.M.; CAPORASO, F.; CALICCHIA, M.L.; PRAKASH, A. Effect of gamma irradiation on *Listeria monocytogenes* in frozen, artificially contaminated sandwiches. **Journal of Food Protection**. Vol. 65. No. 11. Pages: 1740-4. 2002.
- COPEL, J.; PELLICER, K.; ECHEVERRIA, H.G.; STANCHI, N.O.; MATINEZ, C.; LEARDINI, N. Investigation of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses. **Rev Argent Microbiol** 2000 Jan-Mar; 32(1):49-52.

- CORDANO A. M. & ROCOURT, J. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. **Int J Food Microbiol** 2001 Oct 22; 70(1-2):175-8.
- CORRÊA, W.M. and CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. 2ª ed. Editora Médica e Científica Ltda: Rio de Janeiro. 1992.
- COVENEY, H.M.; FITZGERAD, G.F.; DALY, C. A study of the microbiological status of Irish farmhouse cheeses with emphasis on selected pathogenic and spoilage microorganisms. **J Appl Bacteriol** 1994 Dec; 77(6):621-30.
- CRESPO, M.P.; VÉLEZ, J.D.; CASTAÑEDA, C.R.; HOYOS, F.; LÓPEZ, M.L.; SALAZAR, J.C. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en un hospital de tercer nivel. **Colombia Médica** 1999; 30:89-98.
- CRUZ, J.V.B. Doenças transmissíveis ao homem pelo leite e seus derivados. **Revista do ILCT** Novembro/dezembro de 1984. pp33-36.
- CZUPRYNSKI, C.J. Host defense against *Listeria monocytogenes* implications for food safety. **Food Microbiology**, 1994, 11, 131-147.
- CZUPRINSKI, C.J.; FAITH, N.G. STEINBERG, H. Ability of the *Listeria monocytogenes* strain Scott A to cause systemic infection in mice infected by intragastric route. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol.68, No.6. June 2002. Pages.2893-2900.
- DALLAS, H.L.; THOMAS, D.P.; HITCHINS, A. D. Virulence of *Listeria monocytogenes*, *L. seeligeri* and *Listeria innocua* assayed with "in vitro" murine macrophagocytosis. **Journal of Food Protection**. Vol 59. No.1.1995. Pages 24-27.
- DALTON, C.B.; AUSTIN, C.C.; SOBEL, J.; HAYES, P.S.; BIBB, W.F.; GRAVES, L.M.; SWAMINATHAN, B.; PROCTOR, M.E.; GRIFFIN, P.M. An outbreak of Gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. **The New Engl. J. of Med.** Vol.336:100-106. No.2. 1997.
- DALU, J.M. and FERESU, S.B. Survival of *Listeria monocytogenes* in three Zimbabwean fermented milk products. **Journal of Food Protection**, Vol. 59, No.4, 1996, pages 379-383.
- DAVIES, E.A.; BEVIS, H.E.; DELVEZ-BROUGHTON, J. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. **Lett Appl Microbiol**. 1997 Vol. 24. No.5. Pages: 343-6.
- De BUYSER, M.L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. **Int J Food Microbiol** 2001 Jul 20; 67(1-2):1-17.
- DELGADO da SILVA, M.C.; DESTRO, M.T.; HOFER, E. TIBANA, A. Characterization and evaluation of some virulence markers of *Listeria monocytogenes* strains isolated from

Brazilian cheeses using molecular, biochemical and serotyping techniques. **Int J food Microbiol** 2001 Feb15; 63(3):275-80.

DELGADO da SILVA, M.C.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, Vol.61. No.3.1998, Pages 354-356.

DELGADO da SILVA, M.C.; VILARDI, T.C.C; TIBANA, A. Avaliação de métodos para a detecção de *Listeria* em queijos. **Ciênc. Tecnol.Aliment.** Vol.18.n.2. Campinas.1998a.

DE LUCA, G.; ZANETTI, F.; STAMPI, S. *Staphylococcus aureus* in dairy products in the Bologna area. **International Journal of Food Microbiology** 35 (1997) 267-270.

DELVES-BROUGHTON, J.; BLACKBURN, P.; EVANS, R.J.; HUGENHOLTZ, J. Applications of the bactericin, nisin. **Antonie Van Leeuwenhoek** 1996. Vol. 69. No. 2. Pages: 193-202.

DILANJAN, S. C. **Fundamentos de la Elaboración del Queso**. 1ª edición. Editorial Acribia: Zaragoza 1976. Pg. 93-96.

DRAMSI, S; LÉVI, S.; TRILLER, A.; COSSART, P. Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to-cell spread: an *in vitro* study. **Infection and Immunity**, September 1998, Vol. 66, No.9, Pages 4461-4468.

DUBAIL, I.; BERCHE, P.; CHARBIT, A. Listeriolysin O as a reporter to identify constitutive and in vivo-inducible promoters in the pathogen *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, Vol.68, No.6. June 2000, p.3242-3250,

ENNAHAR, S.; ASSOBBHEL, O.; HASSELMANN, C. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH producer. **Journal of Food Protection**.1998. Vol.61. No.2. Pages:186-91.

ENNAHAR, S; DESCHAMPS, N. Anti-*Listeria* effect of enterocin A, produced cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM 01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. **Journal Applied Microbiol.** 2000. Vol. 88. No.3. Pages:449-57.

EPPERT, I.; VALDE'S-STAUBER, N.; GÖTZ, H.; BUSSE, M.; SCHERER, S. Growth reduction of *Listeria* spp caused by undefined Industrial Red Smear cheese cultures and bacteriocin-producing *Brevibacterium linens* as evaluated *in situ* on soft cheese. **Applied and Environmental microbiology**. Dec 1997. Pages.4812-4817. Vol.63, No.12.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia dos Alimentos**. 2ª edição Editora Atheneu: São Paulo 1998 Pg. 129-144.

- EUTHIER, S.M.F.; TRIGUEIRO, I.N.S.; RIVERA, F. Condições higiênico-sanitárias do queijo de leite de cabra tipo Coalho, artesanal elaborado no Curimataú paraibano. **Ciênt. Tecnol. Aliment.** Vol.18. No. 2. 1998.
- EWERT, D.P.; LIEB, L.; HAYES, P.S.; REEVES, M.W.; MASCOLA, L. *Listeria monocytogenes* infection and serotype distribution among HIV-infected persons in Los Angeles County, 1985-1992. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.** 1995 Apr 15; 8(5): 461-5.
- FABER, J.M.; LOSOS, J.Z. *Listeria monocytogenes*: a foodborne pathogen. **CMAJ** Vol. 138. No. %. Pages: 413-8. 1988.
- FABER, J.M.; PETERKING, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-born pathogen. **Microbiol. Reviews.** V.55 (3), p.476-511; 1991.
- FAGUNDES, C.M. **Inibidores e controle de qualidade do leite.** Editora Universitária. Universidade de Pelotas. 1997. p.72-77.
- FALCÃO, D.P. Occurrence of *Yersinia* spp. In foods in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, 14 (1991) 179-182.
- FAO/OMS. Comitê Mixto de Expertos en Higiene de la Leche. Tercer Informe de la Organización Mundial de la Salud. **Series Informes Técnicos nº 453.** Roma- Itália. 1971. p.42-44.
- FERNANDEZ, M. Tecnologías de Control. Nueva herramieta contra *Listeria*, la bacteria más letal. <[www.consumaseguridad.com/investigacion/object.php?o=3150](http://www.consumaseguridad.com/investigacion/object.php?o=3150)> Acesso em 20 de março de 2003.
- FERREIRA, M.A.A.S. and LUND, B.M. The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and long-life cottage cheese. **Letters Applied Microbiology**, 1996, 22, 33-438.
- FENLON, D.R., WILSON, J. and DONACHIE, W. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. **Journal of Applied Bacteriology**, 1996, 81, 641-650.
- FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Preventing foodborne listeriosis. April.1992. <[www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov)> Acesso em 13 de março de 2002.
- FDA/CFSAN – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION/ CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION How to safely handle refrigerated ready-to-eat foods and avoid listeriosis. March, 2001. <[www.cfsan.fda.gov/~dms/adlister.html](http://www.cfsan.fda.gov/~dms/adlister.html)>. Acesso em 13 de março de 2002.

- FRANCIOSA, G.; POURSHABAN, M. GIANFRANCESCHI, M.; AURELI, P. Genetic typing of human and food isolates of *Listeria monocytogenes* from episodes of listeriosis. **Eur J Epidemiol** 1998 Feb; 14(2):205-210.
- FRIENDLANDER Jr., B.P. Molecular subtyping and virulence characterization of *Listeria monocytogenes*. Fevereiro de 1999. Cornell Chronicles. Disponível em: <<http://www.news.cornell.edu/Chronicles/2..11.99/Listeria.html>> Acesso em 13 de março de 2002.
- GALDIERO, E.; D'ISANTO, M.D.; ALIBERTI, F. Effect of saline concentration, pH and growth temperature on the invasive capacity of *Listeria monocytogenes*. **Res. Microbiol.** 1997, 148, 305-313. Paris.
- GARCIA, M.C., GARCIA, M.L. y OTERO, A. Microorganismos patógenos en el queso. V Simposio Marschall para la industria quesera. **Revista Española de Lechería**. Abril, 1991.
- GAY, M. ; CERF, O. Significance of temperature and preincubation temperature on survival of *Listeria monocytogenes* at pH 4.8. **Letters in Applied Microbiology**. 1997. Vol.25. pages.257-260.
- GILOT, P.; HERMANS, C.Y.M.; GIGI, J.; JANSSENS, M.; GENICOT, A.; ANDRE, P.; WAUTERS, G. Sporadic case of listeriosis associated with the consumption of a *Listeria monocytogenes*-contaminated 'Camembert' cheese. **J Infect** 1997 Sep; 35(2):195-7.
- GLASS, K.A.; PRASAD, B.B.; SCHLYTER, J.H.; ULJAS, H.E.; FARKYE, H.E.; LUCHANSKY, J.B. Effects of Acid Type and Alta<sup>TM</sup> 2341 on *Listeria monocytogenes* in a Queso Blanco type of cheese. **Journal of Food Protection**. Vol. 58. No.7. 1995. Pages 737-741.
- GOMES, H.A. & GALLO, C.R. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e a produção de enterotoxinas por linhagens isoladas a partir de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo "Minas Frescal" comercializados em Piracicaba- SP. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 15(2):158-161, jul-dez.1995.
- GREENWOOD, M.H.; ROBERTS, D. BURDEN, P. The occurrence of *Listeria* species in milk and dairy products: a national survey in England and Wales. **Int J Food Microbiol.** 1991. Vol. 12. No. 2-3. Pages: 197-206.
- GUERRA, M. M. e BERNARDO, M. A. Ocorrência de *Listeria* spp em leite e laticínios tradicionais portugueses. **Revista Portuguesa de Zootecnia**. Ano 7. Vol. 2. 2001.
- GUERRA, M. M. & BERNARDO, M. A. Caracterização de efeitos inibidores de *Listeria monocytogenes* Scott A, produzidos pela microflora de maturação de queijos do Alentejo. **RPCV** 96 (583) 65-69. 2001a.

HAMAMA, A.; EL MARRAKCHI, A.; EL OTRMANI, F. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* in milk and dairy products in Morocco. **International Journal of Food Microbiology**, 16 (1992) 69-77.

HARVEY, J.; GILMOUR, A. Occurrence of *Listeria* species in raw milk and dairy products produced in Northern Ireland. **J Appl Microbiol.** 1992. Vol. 72. No. 2. Pages: 119-25.

HEISICK, J.E.; ROSAS-MARTY, L.I; TATINI, S.R. Enumeration of viable *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* in foods. **Journal of Food Protection.** Vol. 58. No.7. 1995. Pages 733-736.

HOFER, E. e RIBEIRO, R. Ocorrência de espécies de *Listeria* em camarão industrializado. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, 21 (2): 207-8, 1990.

HOFER, E.; RIBEIRO, R.; FEITOSA, D.P. Species and serovars of the Genus *Listeria* Isolated from Different sources in Brazil from 1971 to 1997. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol.95 (5):615-620, Sep./Oct. 2000

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** Cap.9 – Group 19. 9<sup>th</sup> Edition. USA: Williams & Wilkins Editorial. 1994. pages 566-570.

IIDA, T.; KANZAKI, M.; NAKAMA, A.; KOKUBO, Y.; MARUYAMA, T.; KANEUCHI, C. Detection of *Listeria monocytogenes* in humans, animals and foods. **J Vet Med Sci** 1998 Dec; 60(12):1341-3.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo 2000. Cidades@ – Estado do Amazonas. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php>> Acesso em: 15 de julho de 2002.

ISOM, L.L.; KHAMBATTA, Z.S.; MOLUF, J.L.; AKERS, D.F.; MARTIN, S.E. Filament formation in *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection.** Vol. 58. No. 9. Pages 1031-1033. 1995.

JACQUET, C.; CATIMEL, B.; BROSCHE, R.; BUCHRIESER, C.; DEHAUMONT, P.; GOULET, V.; LEPOUTRE, A.; VEIT, P.; ROCOURT, J. Investigations related to the epidemic strain involved in the french listeriosis outbreak in 1992. **Appl Environ Microbiol** 1995 Jun; 61(6):2242-6.

JEREZ, J.J. *L. monocytogenes*, el patógeno alimentario del futuro inmediato. <<http://www.consumaseguridad.com>> Acesso em 15/10/2002.

JONES, C.E.; SHAMA, G.; JONES, D.; ROBERTS, I.S.; ANDREW, P.W. Physiological and biochemical studies on psychrotolerance in *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology.** 1997. Vol.83. pages 31-35.

- JUNEJA, V.K.; FOGLIA, T.A.; MARMER, B.S. Heat resistance and fatty acid composition of *Listeria monocytogenes*: Effects of pH, acidulant and growth temperature. **Journal of Food Protection**. Vol. 61. No.6. 1998. pages 683-687.
- KABUKI, D. Y. & KUAYE, A. Y. Ocorrência de *Listeria* spp em carnes de frango e avaliação do desempenho de meios de isolamento. **Anais do XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Rio de Janeiro.1997. AL-091. P. 285.
- KLAUSNER, R.B. & DONELY, C.W. Environmental Sources of *Listeria* and *Yersinia* in Vermont Dairy plants. **Journal of Food Protection** Vol.54. No.8. 1991. pages 607-611.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR, W.C. **Diagnóstico Microbiológico – texto e atlas colorido**. 5ª ed. Editora MEDSI: Rio de Janeiro. 2001. p. 459; 674-677.
- LACIAR, A.L.; HASUOKA, R.P.; CORREA, S.M.; MIRANDA, A.M.; CENTORBI, O.N.P. Symptomatic hydrocephalus in a newborn infected with *Listeria monocytogenes*. **Braz. J. Microbiol**. Vol.31.n.1. São Paulo. 2000.
- LACIAR, A.L.; VACA, L.; de CENTORBI, O.N. *Listeria* spp. In food of animal origin. **Rev Argent Microbiol** 1999 Jan-Mar; 31(1):25-30.
- LAUKOVA, A.; CZIKKOVA, S. Antagonistic effect of enterocin CCM 4231 from *Enterococcus faecium* on “bryndza”, a traditional slovak dairy product from sheep milk. **Microbiol. Res**. 2001. Vol. 156. No.1. pages: 31-4.
- LAUKOVVA, A.; VLAEMYNCK, G.; CZIKKOVA, S. Effect of enterocin CCM 4231 on *Listeria monocytogenes* in Saint-Paulin cheese. **Folia Microbiol** (Praha). 2001. Vol.46. No. 2. Pages:157-60.
- LECUIT, M.; VANDORMAEL-POURNIN, S.; LEFORT, J.; HUERRE, M.; GOUNON, P.; DUPUY, C.; BABINET, C.; COSSART, P. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. **Science** 292:1722-1723.2001.
- LINNAN, M.J.; MASCOLA, L. LOU, X.D.; GOULET, V.; MAY, S.; SALMINEN, C; HIRD, D.W.; YONEKURA, M.L.; HAYES, P. WEAVER, R. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. **N Engl J Med** 1988. Vol.319. No. 13 Pages:823-8.
- LOCAREVIC, S.; DANIELSSON-THAM, M.L.; THAM, W. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft and semi-soft cheeses in retail outlets in Sweden. **Int J Food Microbiol** 1995 Jul; 26(2):245-50.
- LONG, S.G.; LEYLAND, M.J.; MILLIGAN, D.W. *Listeria* meningitis after bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant** 1993. Vol. 12. No. 5. Pages:537-9.

LOU, Y. & YOUSEF, A. E. Resistance of *Listeria monocytogenes* to heat after adaptation to environmental stresses. **Journal of Food Protection**, Vol.59, No. 5, 1996, Pages 465-471.

MacGOWAN, A.P.; BOWKER, K.; McLAUCHLIN, J.; BENNETT, P.M.; REEVES, D.S. The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. In shop bought food stuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources. **Int J Food Microbiol** 1994 Mar; 21(4);325-34.

MARTINIS, A.C.P.; CRANDALL, A.D., MAZZOTTA, A.S.; MONTVILLE, T.J. Influence of pH, salt, temperature on nisin resistance in *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**. Vol.60. No.4. 1997. Pages 420-423.

MATHIEU, F.; MICHEL, M.; LEBRIHI, A.; LEFEBVRE, G. Effect of the bactericin carnocin CP5 and of the producing strain *Carnobacterium piscicola* CP5 on the viability of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in salt solution, broth and skimmed milk, at various incubation temperatures. **Int J Food Microbiol** 1994. Vol. 22. No. 2-3. Pages: 155-72.

MAZZOTTA, A.S.; WANG, T.; WISEMAN, D. W.; SCOTT, V.N. Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**. Vol. 64. No. 3. pp 410-429.

McAULIFFE, O.; HILL, C.; ROSS, R. P. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese manufactured with a lactacin 3147- producing starter culture. **J Appl Microbiol**. 1999. Vol. 86. No. 2. Pages: 251-6.

McLAUCHLIN, J.; GREENWOOD, M.H.; PINI, P.N. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese from a manufacturer associated with a case of listeriosis. **Int J Food Microbiol**. 1990. Vol. 10. No. 3-4. Pages: 255-62.

MENÉNDEZ, S.; CENTENO, J.A.; RODRÍGUEZ-OTERO, J.L. Enterococos em queijos. **Alimentaria**. Vol 69. 1999. Pages 69-72.

MEYER-BROSETA, S.; DIOT, A.; BASTIAN, S. ; RIVIERE, J.; CERF, O. Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw milk. **Int J Food Microbiol** 2003 Jan 15; 80(1):1-15.

MIETTINEN, M.K.; SIITONEN, A.; HEISKANEN, P.; HAAJANEN, H.; BJÖRKROTH, K.J.; KORKEALA, H.J. Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in Cold-smoked rainbow trout. **Journal of Clinical Microbiology**. Vol.37. No.7. 1999. Pages 2358-2360.

MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY ON-LINE – Listeriosis –  
<[www.dhs.vic.gov.au/phb/9907063](http://www.dhs.vic.gov.au/phb/9907063)> Acesso em 13 de março de 2002.

MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT. Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese – North Carolina, October2000 – January2001. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep** 2001 Jul 6;50(26):560-2.

MORENO, I.; LERAYER, A.L.S.; BALDINI, V.L.S.; LEITÃO, M.F.F. Efeito e modo de ação das bacteriocinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ITAL 383, ATCC 11454 e CNRZ150 contra *Listeria innocua* LIN 11. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 19 (1):23-28. 1999.

MOTTA, A. S.; BRANDELLI, A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. **J Appl Microbiol**. 2002. Vol. 92. No. 1. Pages: 63-70.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. 3ª ed. Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 2000. p.181-184.

NEGRI, F.; MASSONE, M.L.; CINGOLANI, M.; MORANDO, A.; SOMENZI, M.; BARRETTA, M.A.; SAVIOLI, C. Fatal neonatal listeriosis after maternal infection acquired with ingestion of fresh home-made cheese. **Minerva Pediatr** 1994 Sep; 46(9):395-9.

NOTERMANS, S; DUFRENNE, J.; TEUNIS, P. e CHACKRABORTY, T. Studies on the risk Assessment of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**. Vol. 61, No. 2, 1998, Pages 244-248.

NUNEZ, M.; RODRIGUEZ, J.L.; GARCIA, E.; GAYA, P.; MEDINA, M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* por enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. **J Appl Microbiol** 1997. 83(6):671-7.

PAK, S.I.; SPAHR, U.; JEMMI, T.; SALMAN, M.D. Risk factors for *L. monocytogenes* contamination of dairy products in Switzerland 1990-1999. **Prev Vet Med** 2002 Feb 14; 53 (1-2):55-65.

PANTEV, A.; KABADJOVA, P.; DALGALARRONDO, M.; HAERTLE, T.; IVANOVA, I.; DOUSSET, X.; PREVOST, H.; CHOBERT, J.M. Isolation and partial characterization of a substance produced by *Enterococcus faecium*. **Folia Microbiol** (Praha). 2002. Vol. 47. No.4. Pages: 391-400.

PELISSER, M.R.; MENDES, S.D.C.; SUTHERLAND, A.D.; BATISTA, C.R.V. Detection of *Listeria* species in refrigerated chicken carcasses using Clearview™ and a modified conventional culture method. **Braz. J. Microbiol**. Vol.32. no.2. São Paulo.2001.

PICHETT, E. L. and MURANO, E.A. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to sanitizers after exposure to a chemical shock. **Journal of Food Protection**. Vol. 59. No. 4, 1996, Pages 374-378.

- PICCHI, V.; SILVA, E.O.T.R.; SOUZA, S.L.P.; BALAIN, S.C. Isolamento e identificação de *Listeria* spp em quartos dianteiros de bovinos desossados. **Hig. aliment**;13(63):38-42, jul.-ago. 1999.
- PINTO, B. & REALI, D. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and other listerias in Italian-made soft cheese. **Zentralbl Hyg Umweltmed** 1996 Nov; 199(1):60-8.
- PINTO, C.L.O.; SOUZA, A.L.; FANTUZZI, E.; FROEHLICH, A.;VANETTI, M.D.C. Coliformes fecais e *Escherichia coli* em queijos comercializados no município de viçosa-MG. **Anais do XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Rio de Janeiro. 1997. AL-104. P. 288
- PITT,W.M.; HARDEN, T.J.; HULL, R.R. Behavior of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk during fermentation with lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**. Vol. 63. No.7. 2000. pages 916-920.
- PRATA, L.F. **Manual de Enfermidades Transmitidas por Alimentos**. Editora Funep: Jaboticabal-SP. 1999. p. 40-43.
- PRITCHARD, T.J.; BELIVEAU, C.M.; FLANDERS, K.J.; DONNELLY, C.W. Increased incidence of *Listeria* species in dairy processing plants having adjacent farm facilities. **Journal of Food Protection**. Vol. 57. No. 9. pages 770-775. 1994.
- RAMOS, S.N.M. Qualidade microbiológica do queijo tipo Coalho comercializado na cidade de Manaus-AM. Manaus: UA, 1999. **Dissertação** (Mestrado em Ciência de Alimentos). Curso de Farmácia. Universidade Federal do Amazonas. 1999.
- REVILLA, A. **Tecnología de la Leche (Procesamiento, Manufactura y Analisis)**. 1ª edición Editorial IICA: Costa Rica 1985. Pg. 59-63.
- RIEDEL, G. **Controle Sanitário dos Alimentos**. 2ª edição Editora Atheneu: Rio de Janeiro 1992. Pg. 218.
- RIEDO, F.X.; PINNER, R.W.; TOSCA, M.L.; CARTTER, M.L.; GRAVES, L.M.; REEVES M.W.; WEAVER, R.E. A point-source foodborne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness. **J Infect Dis** 1994; 170(3):693-6.
- RODRÍGUEZ, E.; TOMILLO, J.; NÚÑEZ, M.; MEDINA, M. Combined effect of bacteriocin-producing lactic acid bacteria and lactoperoxidase system activation on *Listeria monocytogenes* in refrigerated raw milk. **Journal of Applied Microbiology**, 1997, 83, 389-395.
- RODRIGUEZ, j.l.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NUNEZ, M. Bactericidal effect of enterocin 4 on *Listeria monocitogenes* in a model dairy system. **Journal of Food Protection**. Vol. 60. No.1. 1997 Pages 28-32.

- SANTOS, E.C. Acidez do leite e seu controle na fazenda. **Inf. Agropec.** 7 (77) 1981. Belo Horizonte. P.26-28.
- SCHWARZKOPF, A. *Listeria monocytogenes*-aspects of pathogenicity. **Pathol Biol (Paris)** 1996 Nov; 44(9):769-74.
- SENA, M.J.; PINHO, M.M.O.; SILVA, M.C.C. Caracterização da microbiota patogênica de queijos tipo Coalho comercializados em Recife (PE) **Anais do X Encontro Nacional de Analistas de Alimentos**. Manaus. 1997. TL.106.
- SERGELIDIS, D.; ABRAHIM, A.; SARIMVEI, A.; PANOULIS, C.; KARAIOANNOGLOU, P.; GENIGEORGIS, C. Temperature distribution and prevalence of *Listeria* spp. In domestic, retail and industrial refrigerators in Greece. **Int J Food Microbiol** 1997 Feb; 34(2):171-7.
- SILVA, I.M.; ALMEIDA, R.C.; ALVES, M.A.; ALMEIDA, P.F. Occurrence of *Listeria* spp. In critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **Int J Food Microbiol** 2002 Mar 25;81(3):241-8.
- SILVA, M.C.D.; VILARDI, T.C.C; TIBANA, A. Avaliação de métodos para a detecção de *Listeria* em queijos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Vol.18.n.2. Campinas.1998a.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. Livraria Varela: São Paulo. 1997. p. 7-20.
- SÖRQVIST, S. Heat resistance of different serovars of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology** 1994, 76, 383-388.
- SOUSA, S. Ocorrência de *Listeria* spp. Em queijo de massa crua tipo Coalho, comercializados no município de João Pessoa-PB. **Dissertação** (Mestrado Ciência e Tecnologia de Alimentos). Programa de Pós-graduação do Centro de Tecnologia da UFPB. Paraíba. Maio 1999.
- SOUTHWICK, F.S.; PPURICH, D.L. Actin-based Motility of intracellular pathogens. [www.med.ufl.edu/biochem/DLPURICH/Listeria.html](http://www.med.ufl.edu/biochem/DLPURICH/Listeria.html) acesso em: 13/03/2002.
- SPREER, E. **Lactología Industrial**. 2ª edición Editorial Acribia: Zaragoza 1991. Pg.45-47.
- STAHL, V.; GARCIA, E.; HEZARD, B.; FASSEL, C. Prevention of *Listeria monocytogenes* contamination on dairy farms and in the cheese industry. **Pathol Biol (Paris)** 1996 Nov; 44(9) :816-24.
- STECCHINI, M.L. AQUILI,V.; SARAIS, I. Behavior of *Listeria monocytogenes* in Mozzarella cheese in presence of *Lactococcus lactis*. **Int J Food Microbiol**. 1995. Vol. 25. No.3. Pages:301-10.

TARELLI, G.T.; CARMINATI, D; GIRAFFA,G. Production of bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from dairy enterococci. **Food Microbiology**, 1994, 11, 43-252.

THOMAS, L.V & WIMPENNY, J.W.T. Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria mnocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**, June 1996, Vol. 62, No.6. p.2006-2012.

TORREZAN, R. Revisão: influência do tratamento térmico do leite destinado à fabricação de queijo. **B. CEPPA**. Vol.16. no.2. p.149-170. 1998. Curitiba-PR.

VÁZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G; GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B.;WEHLAND J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, 2001, Vol. 14. No.3. p.584-640.

VEIGA, V. M. O. e PEREIRA, J. R. “Porque o Leite se Torna Ácido?”. In: **Anais do Simpósio “O Agronegócio do Leite no Nordeste: Alternativas Tecnológicas e perspectivas de Mercado”**. Natal/RN.1998. Pg.259-265.

VIEIRA, L.D.C.; HÜHN, S.; BATISTA, H.A. M.; HANTANI, A.K. Avaliação microbiológica do leite de búfala sob diferentes práticas higiênicas. **Boletim de Pesquisa da EMBRAPA**. Nº 155. Belém. 1994. p.1-5.

VILLANI, F.; SALZANO, G.; SORRENTINO, E.; PEPE, O.; MARINO, P.; COPOOLA, S. Enterocin 226NWC, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 226, active against *Listeria monocytogenes*. **Journal Applied Bacteriol.** 1993. Vol 74. No.4. Pages 380-7

VLAEMYNCK, G.; HERMAN;L.; COUDIJZER, K. Isolation and characterization of two bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* strains inhibitory to *Listeria monocytogenes*. **Int J Food Microbiol.** 1994. Vol. 24 No.1-2. Pages:211-25.

WAAK, E.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M.L. Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and dairy plant receiving tanks. **Applied and enviromental microbiology**. July 2002. Vol. 68. No.7. p.3366-3370.

WAN, J.; HARMARK, K.; DAVIDSON, B.E.; HILLIER, A.J.; GORDON, J.B.; WILCOCK,A.; HICKEY, M.W.; COVENTRY, M.J. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by piscicolin 126 in milk and Camembert cheese manufactured with a thermophilic starter. **J Appl Microbiol** 1997 Vol. 82. No. 3. Pages: 273-80.

- WARNKEN, M.B.; ROSAS, C.O.; NÓBREGA, H.N. Ocorrência de *Yersinia* spp. e *Listeria monocytogenes* em leite pasteurizado tipo C comercializado no município do Rio de Janeiro. **Anais do X Encontro Nacional de Analistas de Alimentos**. Manaus. 1997. TL.131.
- WIEDMANN, M.; CZAJKA, J.; BSAT, N.; BODIS, M.; SMITH, M.C.; DIVERS, T.J.; BATT, C.A. Diagnosis and epidemiological association of *Listeria monocytogenes* strains in two outbreak of listerial encephalitis in small ruminants. **Journal of Clinical Microbiology**, pr 1994, 991-996, Vol 32, No.4.
- WOLFSCHOON-POMBO, A.F.; CASAGRANDE, H.R.; LOURENÇO NETO, J.P.; MUNCK, A.V. Alterações no queijo Minas Frescal durante o período de armazenamento. **Revista do ILCT** V.39. nº 233. Juiz de Fora. P.3-9.
- YU, L.S.L.; PRASAI, R.K.; FUNG, D.Y.C. Most probable numbers of *Listeria* species in raw meats detected by selective motility enrichment. **Journal of Food Protection**. Vol.58. No.9. pages 943-945. 1995.
- ZOTTOLA, E.A. e SMITH, L.B. Pathogens in cheese. **Food Microbiology**, 1991, 8, 171-182.