DANIELE CRISTINE RAIMUNDO

***Listeria monocytogenes* em queijo minas meia-cura: análise quantitativa, qualitativa e perfil molecular das cepas isoladas**

São Paulo

2013

DANIELE CRISTINE RAIMUNDO

***Listeria monocytogenes* em queijo minas meia-cura:**
análise quantitativa, qualitativa e perfil molecular das cepas
isoladas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2761
FMVZ

Raimundo, Daniele Cristine

Listeria monocytogenes em queijo minas meia-cura: análise quantitativa, qualitativa e perfil molecular das cepas isoladas / Daniele Cristine Raimundo. -- 2013.
52 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles.

1. *Listeria* spp. 2. Queijo Minas meia cura. 3. Feiras livres. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado: "*Listeria monocytogenes* em queijo minas meia-cura: análise quantitativa, qualitativa e perfil molecular das cepas isoladas", protocolado sob o nº2902/2013, não utilizando animais, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

We certify that the Research "*Listeria monocytogenes* in Minas meia-cura cheese: quantitative analysis qualitative and molecular characterization of isolates", protocol number 2902/2013, under the responsibility Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved "ad referendum".

São Paulo, 4 de fevereiro de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: RAIMUNDO, Daniele Cristine

Título: *Listeria monocytogenes* em queijo minas meia-cura: análise quantitativa, qualitativa e perfil molecular das cepas isoladas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Agradecimentos

Aos meus amados pais Sergio e Neide que sempre me incentivaram em todas as minhas escolhas e decisões. Aprendi com vocês tudo o que sou hoje, a não desistir de nenhum sonho, pois hoje é um sonho e amanhã será realidade.

Ao meu querido esposo Leandro, que sempre ao meu lado dá apoio e acredita nos meus sonhos!

Ao meu irmão Márcio, que sempre torce pelo meu sucesso.

A minha querida orientadora Evelise O. Telles. Muito obrigada por acreditar em mim, por me ouvir, me dar muitos conselhos; agradeço a esses anos onde aprendi muita coisa, não só acadêmica, mas pessoal e profissional.

A querida prof^a Andrea Micke Moreno, que sempre me ajudou e socorreu nos momentos de desespero, além de sempre me acolher em seu laboratório.

A Sandrinha Sanches, por toda sua ajuda, muitos meios de cultura e vidraria... e amizade durante estes anos de trabalho no laboratório.

A amiga Renata Paixão, por toda ajuda e amizade durante estes anos, sempre me ouvindo e ajudando a achar uma resolução para meus problemas...

As amigas Débora e Thais por toda ajuda no trabalho, conselhos e sessões de terapia ...

As amigas que passaram pelo lab. de higiene: Camila Diniz, Camila Nóia e Karina, pela ajuda e pela troca de experiências nas nossas conversas.

Aos amigos do laboratório de sanidade suína: Roberta, Paula, Jucélia, Alê, Vasco, Bárbara e Ketrin. Sempre me acolhendo no laboratório e me divertindo.

RESUMO

RAIMUNDO, D. C. ***Listeria monocytogenes* em queijo minas meia cura**: análise quantitativa, qualitativa e perfil molecular das cepas isoladas. [*Listeria monocytogenes* in Minas meia cura cheese: quantitative analysis qualitative and molecular characterization of isolates]. 2013. 52 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O queijo minas meia cura, popular entre os consumidores no Brasil, não é regulamentado, o que pressupõe que estes produtos sejam de origem informal, fabricados com leite cru, sem controle das condições higiênicas e sanitárias ou do processo de cura. Esta pesquisa se dispôs a estudar os fatores, tanto relacionados ao queijo (pH, Aw e U%) quanto aos relacionados à *Listeria monocytogenes* (análise qualitativa, quantitativa nas amostras que forem positiva e identificação e caracterização genotípica) como também pesquisar possível atividade antagônica das bactérias lácteas sobre a *Listeria monocytogenes*. Foram analisadas 165 amostras providas de barracas de feiras do município de São Paulo. As análises físico-químicas classificaram as amostras como queijo de média umidade (57,6%) e de baixa umidade (34,5%); quanto ao pH, o valor mínimo registrado foi de 4,3 e o máximo foi de 7,5; e os valores da Aw variaram de 0,86 a 0,98. *Listeria monocytogenes* foi isolada em 3% das amostras (5/165) pelo método qualitativo, enquanto os testes de quantificação (feitos nas amostras positivas) não revelaram o agente, sugerindo que o nível de contaminação apresentava-se entre os limites de detecção das técnicas, a saber: 1 UFC/25g ou 0,04 UFC/g para a qualitativa e 3 NMP/g para a quantitativa. Em ambas as técnicas de caracterização genotípica (AFLP e PFGE) foram gerados cinco pulsotipos, cada um representando uma amostra. De 480 colônias isoladas das amostras, 6,66% apresentaram antagonismo pela *L. monocytogenes*. A frequência de *Listeria monocytogenes* em queijo tipo minas meia cura é relativamente baixa e, quando presente, encontra-se em baixos níveis de contaminação. No entanto, do ponto de vista geográfico, o agente encontra-se no queijo tipo minas meia cura de todas as regiões do município de São Paulo.

Palavras-chaves: *Listeria spp.* Queijo Minas meia cura. Feiras livres.

ABSTRACT

RAIMUNDO, D. C. ***Listeria monocytogenes* in Minas meia cura cheese:** quantitative analysis, qualitative and molecular characterization of isolates. [*Listeria monocytogenes* em queijo minas meia cura: análise quantitativa, qualitativa e perfil molecular das cepas isoladas]. 2013. 52 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Minas meia-cura cheese, popular among Brazilian consumers, has not been regulated indicating that the cheese available in the market is informal and made from raw milk, uncontrolled hygienic-sanitary conditions nor the curing process. This study aimed evaluating factors related to the product (pH, Aw and U%) as well as the ones related to *Listeria monocytogenes* (qualitative analysis followed by quantitative analysis of the positive ones and genetic identification). Antagonistic activity of some lactic bacteria against *Listeria monocytogenes* was also investigated. Samples (165) were bought at open markets in São Paulo city. By the content in humidity, samples were classified as cheese of medium (57,6%) and low humidity (34,5%); concerning pH the lowest value was 4,3 and the highest 7,5, values of Aw ranged from 0,86 a 0,98. *Listeria monocytogenes* was isolated from 3% of the samples (5/165) by qualitative test but none of them showed any growth in quantitative test suggesting that the level of contamination were somewhere in between the detection limits of the tests: 1 CFU/25 g or 0,04 CFU/g for qualitative method and 3 MPN/g for quantitative one. In both genotypic characterization techniques (AFLP and PFGE) five pulsotypes were generated, each one representing a sample. Of 480 colonies isolated from the samples, 6.66% showed antagonism by *L. monocytogenes*. The frequency of *Listeria monocytogenes* in Minas meia cura cheese is relatively low and when present the level of contamination is low. However it is wide distributed in São Paulo city.

Keywords: *Listeria spp.* Minas meia cura cheese. Open market.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	11
3	OBJETIVOS.....	17
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	18
4.2	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	18
4.3	PESQUISA DE <i>L. monocytogenes</i>	18
4.4	QUANTIFICAÇÃO DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	21
4.5	AVALIAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS FENOTIPICAMENTE CARACTERIZADAS COMO <i>Listeria monocytogenes</i>	23
4.5.1	Extração de DNA.....	23
4.5.2	Amplificação do DNA.....	23
4.5.3	Detecção do Produto de Amplificação.....	24
4.6	CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DAS CEPAS.....	24
4.6.1	Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP)	25
4.6.2	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).....	25
4.7	PESQUISA DA ATIVIDADE ANTAGÔNICA DAS BACTERIAS LÁTICAS PRESENTES NOS QUEIJOS.....	26
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS.....	28
5.2	PESQUISA QUALITATIVA DE <i>Listeria monocytogenes</i>	31
5.3	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA PELO MÉTODO QUANTITATIVO...	34
5.4	PERFIS GENOTÍPICOS DAS CEPAS PELAS TÉCNICAS DE PFGE E AFLP.....	34
5.5	RESULTADOS DO TESTE DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DA <i>LISTERIA</i>	38
6	CONCLUSÕES.....	41
	REFERENCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

A elaboração de queijos constitui-se, no Brasil, uma das maiores atividades na indústria láctea (BEHMER, 1991) e, segundo a ABIQ (2005), a estimativa de queijos produzidos chegou a 553.748 toneladas em 2005.

Dentre os queijos mais consumidos no país destaca-se o queijo tipo Minas, desenvolvido no Brasil durante o período colonial, no estado de Minas Gerais, como forma de aproveitamento do leite (OLIVEIRA, 1986; PINTO et al., 1996; LOÑDONO, 1998), e deu origem a uma variedade de produtos, como o Minas frescal, Minas padrão, Minas meia cura, Minas curado ou prensado, queijo do Serro, da Canastra, de coalho, Catiara (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994).

A variedade Minas meia-cura é um produto fabricado com leite cru, em estabelecimentos sem inspeção sanitária, geralmente sem as devidas práticas de higiene e que são comercializados sem embalagem apropriada, em temperatura ambiente e sem indicação de origem ou data de validade (CORREIA, 1995; PEDRO, 2003, FAVARO et al., 2006; SOUSA et al., 2006), podendo veicular uma grande variedade de microrganismos patogênicos, entre eles a *Listeria monocytogenes*. Esta bactéria é patogênica para o homem e para os animais, tem caráter zoonótico e é ubiqüitária, de forma que a contaminação do leite pode ocorrer antes, durante ou após a ordenha ou, ainda, durante a fabricação e armazenamento dos derivados. Ela é resistente às condições ambientais e é capaz de se multiplicar sob refrigeração.

Embora as condições de produção do queijo Minas meia-cura e as características da bactéria evidenciem uma alta probabilidade de ocorrência do agente neste queijo, a literatura retrata uma baixa frequência de isolamento no leite cru e seus derivados. Isso porque a sobrevivência e/ou multiplicação do agente pode ser modulada pela interação com a microbiota acompanhante, pelo pH e pela atividade de água/umidade do queijo, entre outros.

A dose infectante desta bactéria não está bem estabelecida, mas é baixa, e por esta razão, a legislação brasileira determina ausência de *Listeria monocytogenes* em queijos de média e baixa umidade, no entanto, por ser um produto informal, o queijo Minas meia-cura não está ao alcance dos critérios oficiais, mas por similaridade é possível afirmar que a detecção do patógeno (em 25g)

indicaria potencial risco à saúde. Deste modo, o método de pesquisa oficial para a *Listeria monocytogenes* em alimentos é qualitativo, em que se emprega etapas de enriquecimento para recuperar células injuriadas e/ou promover o aumento em número do agente, favorecendo sua detecção nos ágaros seletivos. No entanto, métodos quantitativos são de suma importância para estudos epidemiológicos de dose-resposta, bem como a identificação da espécie e o estudo dos agrupamentos genéticos.

Considerando estes fatores, esse trabalho teve por objetivos avaliar a presença de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas meia cura comercializados nas feiras livres do município de São Paulo, quantificar *L.monocytogenes* nas amostras positivas para o agente, determinar as características físico-químicas de pH, Aw e umidade dos queijos, caracterizar fenotípica e genotipicamente os isolados e avaliar a atividade antagônica das bactérias lácticas presentes nos queijos no crescimento de *L. monocytogenes*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O gênero *Listeria* atualmente compreende seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* e *L. grayi* (JAY, 2000). Em relação a patogenicidade, a *L. monocytogenes* é a espécie mais importante para o homem e animais, *L. ivanovii* é patogênica para ovinos e caprinos podendo causar infecção em humanos sob certas condições, as espécies *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* são consideradas apatogênicas. Com exceção da *L. grayi* as demais espécies são contaminantes de alimentos (FARBER; PETERKIN, 1991). O gênero *Listeria* é constituído por organismos de morfologia cocóide a cocobacilar, gram-positivos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos (FARBER; PETERKIN, 1991).

A *L. monocytogenes* é um agente ubiqüitário e tem como reservatório o meio ambiente, assim, encontra-se disseminada em plantas, solo, amostras de água superficiais, silagem, esgoto, resíduos de abatedouro, leite de vacas saudáveis e com mastite, e fezes de humanos e animais (MCCARTHY, 1990; FABER; PETERKIN, 1991), e já foi descrita em bovinos, ovinos, caprinos, aves, suínos e animais silvestres (GRAY; KILLINGER, 1966; CHASSEIGNAUX et al., 2001).

Essa espécie apresenta grande resistência às condições ambientais e aos efeitos nocivos do congelamento e da dessecação (FORSYTHE, 2002; FRANCO; LANDGRAF, 2002) sendo capaz de se multiplicar em refrigeração. A multiplicação pode ocorrer entre -4°C e 50°C (FARBER; PETERKIN, 1991) embora a temperatura ótima esteja entre 30-37°C (SEELINGER; JONES, 1986); o congelamento comercial (-18°C) impede sua multiplicação (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2003). A atividade de água (Aw) mínima para multiplicação é 0,90, com ótimo entre 0,94 e 0,99. O potencial hidrogênio (pH) tolerado encontra-se na faixa de 5,0 e 9,6 (FABER; HARWING, 1996), com mínimo de 4,3 (FABER et al., 1989).

O alimento contaminado é considerado a principal fonte de infecção humana (CIESIELSKI et al., 1988). Os sintomas dependem do estado do hospedeiro; indivíduos não grávidos e não imunossuprimidos são mais resistentes. No entanto, os seguintes fatores são predisponentes à listeriose no indivíduo adulto, e que são significantes na taxa de mortalidade: neoplasias, AIDS, alcoolismo, diabetes, doenças cardiovasculares, transplante renal e terapia corticóide. Quando adultos

susceptíveis contraem a doença, meningite e septicemia são os sintomas mais comuns. Em mulheres grávidas os sintomas podem ser inaparentes ou serem típicos de gripe; pode ocorrer aborto, nascimento prematuro ou natimortalidade; quando o feto é contaminado no momento do parto os sintomas são de meningite (JAY, 2000).

Apesar da resistência da *L. monocytogenes* às condições adversas do meio e do fato do leite e derivados serem conhecidas fontes de transmissão desta bactéria, a frequência de isolamento do agente nesses produtos é variável.

Carvalho (2003) analisou 93 amostras de queijo Minas Frescal e 11 (11,8 %) foram positivas para o gênero *Listeria*, das quais 3 (3,2%) era *Listeria monocytogenes*. Destro et al. (1991) detectou 2 de 20 (10 %) amostras analisadas de queijo Minas Frescal industrializadas e comercializadas em Campinas, foram positivas para *L. monocytogenes*. Cerqueira et al. (1995) verificaram a ocorrência de *Listeria* spp em 3 das 30 amostras de queijo Minas produzido artesanalmente com leite cru, identificando 3,33% como *L. monocytogenes*. Silva et al. (1998) pesquisando a *L. monocytogenes* em queijos Minas Frescal dos tipos artesanal e industrializado e em queijos curados (Gorgonzola, Brie e Roquefort) obteve 31(30,1%) amostras positivas para *Listeria* spp, em 103 analisadas, o Minas Frescal apresentou maior frequência de *L. monocytogenes*: 7 de 17 amostras (41,17 %), as amostras industrializadas apresentaram menor ocorrência de *L. monocytogenes*, 1 de 33 (3,03 %) e os queijos curados mostraram 5,67 % de *L. monocytogenes*. Mata (2009) pesquisou *Listeria monocytogenes* em 48 amostras de queijo Minas artesanal da região do Serro (MG) e não detectou o agente em nenhuma amostra, utilizando a metodologia convencional e imunoanalítica VIDAS®-LMO. Algumas amostras foram submetidas à cura em temperatura ambiente e outras em refrigeração. Quando fabricou o queijo com leite cru e artificialmente contaminado com *L. innocua* (10 UFC/ml), detectou o agente em todos os tempos de maturação estudados (até 60 dias).

A literatura internacional também relata a ocorrência desse agente em queijos. Pini; Gilbert (1988) avaliaram a ocorrência de *Listeria* em 222 amostras de queijos do Reino Unido e outros países europeus, e encontraram 23 (10%) amostras positivas para *L. monocytogenes*. Ryser; Marth (1999) citaram, em uma revisão, maior ocorrência de *L. monocytogenes* em queijos macios e curados do que em queijos duros. Rudolf; Scherer (2001) pesquisaram *Listeria monocytogenes* em 329 amostras de queijos de diferentes países europeus e a detectaram em 6,3% das

amostras de queijos macios (12/192), 7,6% dos queijos semi duros (7/92) e 4,4% (2/45) dos queijos duros.

Abrahão et al. (2008) analisaram *Listeria monocytogenes* em sorvetes (60 amostras) e vários tipos de queijos (90 amostras), no Paraná, nenhuma amostra de sorvete foi positiva, mas 6,7% das amostras de queijo foram.

Em 2008, 138 casos de listeriose com 5 mortes foram confirmados (em laboratório) no Chile. Destes, 56 estão associados a um surto ligado ao queijo do tipo Brie Lescure. Duas amostras deste tipo de queijo foram coletadas de refrigeradores de dois pacientes, e através de análises moleculares foi comprovado que o perfil genotípico da bactéria contida no queijo era o mesmo da isolada nas vítimas. O leite utilizado na produção dos queijos, aparentemente foi descartada como fonte de contaminação, e a contaminação ambiental na unidade de produção é a suspeita mais provável (CHILES, 2008). Em dezembro de 2008, no Canadá, o governo fez um *recall* de queijo tipo ricota suspeito de contaminação por *L. monocytogenes*, porém nenhum caso de doença foi relatado (SANTA, 2008).

Nero (2005) ressalta que a presença natural de uma microbiota com potencial inibitório pode resultar em uma baixa frequência no isolamento de *Listeria monocytogenes*; isso pode explicar os baixos índices de contaminação detectados em leite cru e seus derivados no Brasil. Rossland et al. (2005) relata que a disparidade na frequência do isolamento de *Listeria* em queijos pode derivar das alterações que as bactérias ácido lácticas produzem na matriz do produto, como produção de ácidos orgânicos (que reduzem o pH) ou de outros metabólitos como o peróxido de hidrogênio, diacetil e as bacteriocinas. Magro et al. (2000) ressalta que a capacidade de produzir grande quantidade de ácidos orgânicos em principal o ácido láctico, ao fermentar os carboidratos presentes nos alimentos e assim reduzirem o pH, é elementar na atividade antimicrobiana das bactérias lácticas.

As bactérias ácido lácticas apresentam forma de bastonetes ou cocos Gram positivos, não esporulados, aeróbios, microaerófilos ou anaeróbios facultativos. O grupo das bactérias ácido lácticas compreende 12 gêneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Jay, 2005).

Esse efeito inibitório de culturas lácteas sobre a *L. monocytogenes* é demonstrado por diversos pesquisadores. Elegado et al. (2004) através da metodologia do ágar *spot test* estudaram a capacidade de inibição do *Lactobacillus*

plantarum sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium* e *L. monocytogenes* e relataram a que apenas a cepa de *L. monocytogenes* teve seu desenvolvimento inibido. Em vinte amostras de produtos cárneos, De Martinis et al. (2003) observaram que *Leuconostoc* sp. e *L. sakei* foram capazes de inibir o crescimento de nove cepas de *L. monocytogenes*. Herreiros et al. (2005), no entanto, verificaram que não houve atividade antagônica de bactérias lácticas isoladas de queijo produzido na Espanha sobre *L. monocytogenes*.

A dose necessária para causar a doença ainda não está bem definida, estima-se que varia de 10^3 a 10^9 organismos por grama ou mililitro (FARBER; PERKIN, 1991). Esse fato influencia a política regulatória dos diversos países na definição de limites toleráveis para o agente nos alimentos. As políticas mais rígidas determinam a ausência de *L. monocytogenes* em 25 ou até 50g de alimento (em alguns casos essa exigência se restringe aos produtos destinados às pessoas do grupo de risco). Há países que consideram impossível obter alimentos crus livres de *Listeria* e que os riscos de contaminação do produto final podem ser reduzidos, mas não eliminados (JAY, 2000).

A Comissão Internacional para Especificações em Microbiologia de Alimentos (ICMSF) conclui que, no ponto de consumo, o alimento que não exceda 100 UFC/g é considerado aceitável para indivíduos hígidos (JAY, 2000). Também a FAO (1997) relata que pode ser tolerada a presença de um baixo número de *L. monocytogenes* nos produtos alimentares. No Brasil, o Ministério da Saúde, órgão competente para normatizar e fiscalizar os produtos de origem animal que estão no varejo, determina a ausência de *Listeria monocytogenes* em 25 gramas dos queijos de média, alta e muito alta umidade (ANVISA, 2001).

No isolamento do agente em alimentos, pesquisa qualitativa, empregam-se etapas de enriquecimento para recuperar células injuriadas e/ou promover o aumento em número do agente, favorecendo sua detecção nos ágaros seletivos. No entanto, métodos quantitativos, em placa (nos meios sólidos) ou em tubos (nos meios líquidos) podem ser utilizados. Dentre os métodos de quantificação dos microrganismos nos alimentos, a literatura ressalta que em alimentos contaminados com baixa quantidade de microrganismos o uso da técnica de NMP (número mais provável) apresenta melhores resultados comparado à técnica de contagem em placas (SWANSON et al., 2001). Isso pode ser explicado devido à absorção dos nutrientes ser facilitado quando presente em meio líquido, o que favorece a

recuperação de células injuriadas. O resultado obtido por esta técnica é uma estimativa estatística da média de microrganismos viáveis presentes na amostra (SWANSON et al., 2001). Nesta técnica a amostra é submetida à pelo menos três diluições decimais seriadas e alíquotas pré-estabelecidas de cada diluição são transferidas para três ou para cinco tubos contendo o meio de cultura próprio para o microrganismo. O resultado é determinado pelo número de tubos positivos em cada uma das diluições empregada tendo como base a tabela estatística de Hoskins para três ou para cinco tubos (FRANCO et al., 2003).

Vlaemynck e Moermans (1996) reportam que a presença de *Listeria* em baixos níveis de contaminação gera dificuldade de isolamento deste patógeno em leite e derivados e estimam que níveis abaixo de 10^2 UFC/mL de *Listeria* dificilmente são detectados pela metodologia tradicional.

Após o isolamento, as colônias suspeitas de serem *Listeria* spp são testadas por métodos bioquímicos para confirmar o gênero e identificar a espécie; outros métodos podem ser empregados para tipificação: sorologia, eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) ou ribotipagem (US FDA, 2003).

Além disso, diversos métodos têm sido pesquisados para detecção rápida de *L. monocytogenes*, dentre os quais alguns utilizam técnicas de ELISA, imunofluorescência, citometria de fluxo, hibridação de DNA e reação em cadeia pela polimerase (PCR). A PCR tem se destacado devido à grande sensibilidade, rapidez, especificidade e ao potencial de aplicação em larga escala. Diferentes autores descrevem oligonucleotídeos iniciadores, capazes de identificar e diferenciar *Listeria* spp e *L. monocytogenes* através da amplificação de regiões específicas do gene *hlyA* ou 16s rRNA (BESSESEN et al., 1990; BORDER et al., 1990, WESLEY et al., 2001).

O baixo poder discriminatório obtido pelos os métodos fenotípicos utilizados para caracterização da *L. monocytogenes* aliado a inadequação de sua utilização para estudos epidemiológicos envolvendo surtos de listeriose ou contaminação de alimentos pelo agente (GIOVANNACCI et al., 1999), métodos genotípicos têm sido utilizados para caracterização epidemiológica desta bactéria, sendo os mais citados a amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD), a análise com enzimas de restrição (REA), polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e a eletroforese em gel de campo pulsado ou PFGE (NAKAMA et al., 1998; GIOVANNACCI et al., 1999; YOSHIDA et al., 1999; CHASSEGNAUX et al., 2001).

Com especificidade e poder discriminatório variáveis, estes métodos têm apresentado bons resultados, mas em alguns casos são demorados, exigem equipamentos especiais e alto grau de padronização para obtenção de resultados confiáveis (DE ZOYZA; EFSTRATIOU, 2000). Cuenca (2004) descreve que o polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) é um método altamente reprodutível e excelente poder discriminatório dentre os métodos citados, porém menos discriminatório que o PFGE. Contudo, para alguns microrganismos, observa-se similaridade entre o poder discriminatório entre as duas técnicas, e em alguns, o AFLP se mostra mais discriminatório que o PFGE.

3 OBJETIVOS

- Avaliar a presença de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Meia Cura comercializados nas feiras livres do município de São Paulo;
- Quantificar *L.monocytogenes* nas amostras positivas para o agente;
- Determinar as características físico-químicas de pH, Aw e umidade dos queijos;
- Caracterizar fenotípica e genotípicamente os isolados;
- Avaliar a atividade antagônica das bactérias lácticas presentes nos queijos no crescimento de *L. monocytogenes*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

O número de amostras coletadas foi calculado com base no número de feiras livres que comercializavam queijo no município de São Paulo (277) em relação ao total de feiras (889), bem como sua distribuição na capital paulista. Estes dados foram obtidos na Secretaria de Serviços Central de Feiras. Também foram obtidos o número de feiras livres semanal, por região. Assim, utilizando o EpiInfo6 para calcular o tamanho da amostra, considerando uma amostra simples aleatória, ponderando o número pelas feiras em cada distrito administrativo, foram coletadas 165 amostras sendo: 54 amostras da zona Leste, 12 da zona central, 37 da zona oeste, 40 da zona sul e 22 da zona norte.

4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

O pH e umidade foram avaliados segundo métodos oficiais (BRASIL, 2003a) e A_w , em Analisador de Atividade de Água Aqualab Serie 3TE – Decagon, conforme instruções do fabricante.

4.3 PESQUISA DE *Listeria monocytogenes*

Foi seguida a metodologia oficial do MAPA (BRASIL, 2003b), que propõe o enriquecimento da amostra (25g em 225ml de caldo) empregando-se os meios:

1. Pré-enriquecimento: caldo UVM; incubação a 30°C/24h;
2. Enriquecimento Seletivo: caldo Fraser; incubação a 30°C/24h;
3. Isolamento: ágaras Palcam e Oxford; incubação a 30°C/24 - 48h;
4. Purificação: ágar inclinado TSA + YE; incubação a 30°C/24h;

5. Confirmação: testes iniciais: catalase; VM-VP; gram; motilidade; nitrito; e provas complementares: alfa hemólise; fermentação dos carboidratos xilose, ramnose e manitol; Camp test.

Em paralelo ao isolamento nos ágaros Palcam e Oxford, o caldo de enriquecimento seletivo era semeado também no Agar ALOA, descrito na literatura como o meio mais seletivo.

Havendo colônias suspeitas nos ágaros de isolamento Palcam e Oxford, 5 colônias eram purificadas, mas as provas bioquímicas foram realizadas inicialmente em apenas uma; em caso de resultado negativo para *Listeria monocytogenes*, as outras 4 foram testadas. O resultado foi expresso como presença ou ausência em 25g de queijo.

Com as cepas isoladas por esse método, foram realizadas as provas moleculares (Figura 1).

Figura 1 – Esquema de execução do isolamento e caracterização do agente

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Foi aplicada a técnica dos tubos múltiplos, seguindo o mesmo processo da pesquisa qualitativa (Figura 2).

O diluente empregado foi a água peptonada a 0,1%; 25g do queijo foram homogeneizadas com 250mL da diluição (diluição 10^{-1}) e procedida à diluição decimal e seriada até 10^{-3} ; cada diluição foi semeada em triplicata no caldo UVM (1mL da diluição em cada tubo) e Incubados a 30°C/24h.

Cada tubo era então semeado (0,1mL) em outro tubo contendo caldo Frazer, que foram incubados a 30°C/24h.

Todos os tubos foram semeados em placas de ágar Palcam e ALOA, com uso de alça de platina ou similar, que foram incubadas invertidas a 30°C/24-48h.

As placas que apresentaram colônias suspeitas 5 delas foram purificadas em ágar inclinado de TSA-YE e incubadas a 30°C/24-48h. A partir desses tubos foram realizadas as provas bioquímicas iniciais e complementares (catalase; VM-VP; gram; motilidade; nitrito; alfa hemólise; fermentação dos carboidratos xilose, ramnose e manitol; Camp test).

Para se obter o NMP, foram considerados positivos os tubos iniciais (UVM) que apresentaram pelo menos 1 colônia positiva para *L. monocytogenes*, das 5 testadas.

Figura 2- Esquema da técnica de quantificação do agente pelo método de número mais provável

4.5 AVALIAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS FENOTIPICAMENTE CARACTERIZADAS COMO *Listeria* spp :

Todas as cepas que mostraram motilidade característica de *Listeria* spp. foram submetidas a PCR para detectar a presença do gene *hlyA* e 16s (BORDER et al., 1990)

Como controle positivo foi utilizada cepa de *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115, 4b), mantida em ágar estoque semi-sólido, cedida pelo Laboratório de Sanidade Suína (FMVZ/USP).

4.5.1 Extração de DNA

Os cultivos bacterianos de *Listeria* spp e *L.monocytogenes* foram submetidos à lise em uma solução de proteinase K (20 mg/ml) e lisozima (100mg /ml) por 1 hora a 37°C. A partir deste lisado, o DNA bacteriano foi purificado pela extração de DNA baseada nas propriedades de lise e inativação de nucleases do Tiocianato de Guanidina junto às propriedades das partículas de terra diatomácea em ligar-se ao DNA. Este método para purificação de ácidos nucleicos foi descrito por Boom et al. (1990).

4.5.2 Amplificação do DNA

Utilizou-se 5 µl do DNA bacteriano, 4,0 mM de MgCl₂, 200 µM de cada deoxirribonucleotídeo trifosfato, 50 pmoles dos *primers* específicos para *Listeria* spp e *L. monocytogenes* (BORDER et al.,1990 - Quadro 1), 1.0 U de *Taq* DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e água até o volume final de 25 µl. A reação foi submetida à desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1,5 minuto, anelamento de 50°C por 1,5 minuto e extensão de 72°C por 2 minutos, finalizando com extensão a 72°C por 5 minutos.

Quadro 1 – Oligonucleotídeos utilizados para detecção do gênero *Listeria* e espécie *L. monocytogenes*

<i>Alvo</i>	<i>Gene</i>	<i>Nome</i>	<i>Seqüência (5´- 3´)</i>	<i>Amplicon (pb)</i>	<i>Referência</i>
<i>Listeria</i> spp	16S RNA	L1 U1	CTC CAT AAA GGT GAC CCT CAG CMG CCG CGG TAA TWC*	938	Border et al., 1990
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hlyA</i>	Lis1 Lis2	GCA TCT GCA TTC AAT AAA GA TGT CAC TGC ATC TCC GTG GT	174	Border et al., 1990

*M: A ou C; W: A ou T

4.5.3 Detecção do Produto de Amplificação

A detecção dos produtos de amplificação foi realizada através da eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) 1,5% utilizando-se tampão TBE 0,5 X (0,04 M tris-borato, 0,001 M de EDTA, pH 8,0).

Os fragmentos amplificados foram visualizadas no sistema de fotodocumentação ImageMaster® (Amershan Biosciences) por meio do uso do corante BlueGreen® (LGC Biotecnologia) com base na utilização de marcador de pares de base 100 *bp* DNA Ladder (LGC Biotecnologia).

4.6 CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DAS CEPAS

A caracterização da diversidade genômica foi realizada através das técnicas de Pulsed Field – PFGE (conforme GRAVES; SWAMINATHAN, 2001) e AFLP (conforme MCLAUCHILN et al., 2000) nas colônias positivas para *L. monocytogenes* nas reações de PCR.

4.6.1 Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP)

Foi utilizada a endonuclease de restrição *Hind III* como única enzima. Uma fração do DNA bacteriano foi submetida à clivagem pela enzima de restrição *Hind III*. Adaptadores específicos ADH1 e ADH2 foram acoplados aos terminais dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem. Uma alíquota destes fragmentos foram amplificados pela PCR, onde foram testados *primers* seletivos com variações nos nucleotídeos terminais, sendo testadas as seqüências HI-A, HI-T, HI-G e HI-C. A reação foi submetida a desnaturação a 94°C por 4 minutos seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 2,5 minutos a 72°C.

A detecção dos produtos da amplificação da AFLP foi realizada através de eletroforese em gel de Agarose 2,0%, com 12 µl do DNA digerido ligado e amplificado, 1,5 µl corante BlueGreen® (LGC Biotecnologia) e tampão TAE (0,04M tris-acetato [pH 8,5], 0,002M de EDTA) em corrida de 30 horas a 34 volts. O gel foi, então, fotografado por meio do Sistema Image Máster® (Amershan-Pharmacia Biothec). Os fragmentos foram identificados com base na utilização do marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen®).

4.6.2 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

Uma alíquota de 6,0 ml do cultivo bacteriano foi centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos e o pélete lavado com solução Pett IV (1M NaCl, 10mM Tris pH 8, 10mM EDTA), posteriormente centrifugada como a alíquota. Este novo pélete foi ressuspenso em 500 µl da mesma solução e então misturado com igual volume de agarose de baixo ponto de fusão (BioRad Laboratories) a 2,0% e, após homogeneização, transferidas para moldes plásticos. Os *plugs* (blocos) de agarose resultantes, contendo a amostra, foram submetidos a um processo de lise *in situ* com uma lavagem por 2 horas com solução de lise (1M NaCl, 10mM Tris pH 8, 200mM EDTA, 0,5% *Na-laurylsarkosine sodium salt*, 0,2% *deoxycholic acid sodium salt*, 1 mg lisozima/ ml) a 37°C, e após submetidos à desproteinização em solução (0,5 M EDTA, pH 8,0, 1% *Na-laurylsarkosine sodium salt*, 20 mg de proteinase K/ ml)

a 56°C *overnight*. Os *plugs* foram então primeiramente lavados com água ultra pura e depois com um tampão de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) e PMSF (1 mM), por duas vezes. Após, foram novamente lavados com água ultra pura para inativar o PMSF e, por fim, mais duas vezes com tampão TE. Os *plugs* foram estocados em 900 µl tampão TE até o momento da eletroforese.

Uma fração do *plug* foi submetida à digestão com a enzima de restrição *Apal* e outra porção com a enzima de restrição *AscI* e posteriormente adicionada ao gel de agarose 1%. A eletroforese foi conduzida num período de 22 horas a 6 V/cm, ângulo fixo de 120°, com pulso inicial de 4,0 s e final de 40 s em tampão TBE 0,5 X mantido a 14°C, utilizando o sistema de eletroforese CHEF DR III Chiller System (Bio-Rad). O gel foi corado por 20 minutos em corante Gel Red® (Biotium) e então, fotografado por meio do Sistema Image Master® (Amersham-Pharmacia Biothec).

4.7 PESQUISA DA ATIVIDADE ANTAGÔNICA DAS BACTERIAS LÁTICAS PRESENTES NOS QUEIJOS

Vinte amostras do queijo Minas meia cura foram submetidas à diluição decimal seriada e semeadas em duplicata na superfície de placas de ágar Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (incubação a 37°C por 48h). Das diluições que apresentaram colônias isoladas, 24 colônias foram selecionadas de cada amostra para o teste de inibição de cepa padrão de *L. monocytogenes* (ATCC 19115, 4b).

Foi empregada a técnica *spot-on-the-lawn*, conforme Lewus e Montville (1991) e Nero (2005), com adaptações. Cada uma das colônias foi semeada por picada em triplicata em ágar MRS (duas placas foram usadas no teste de inibição e uma como controle, para futura análise morfológica), incubadas a 37°C por 48h.

Após crescimento das colônias, nas duas placas usadas no teste foi adicionada uma sobrecamada de 7 mL de TSA semi-sólido (50% da proporção indicada no rótulo do produto) inoculado com 0,1 mL de uma cultura de *L. monocytogenes* (ATCC 19115, 4b) contendo aproximadamente 10⁶ UFC/mL.

A padronização da densidade do inóculo de *L. monocytogenes* foi realizada através do controle da turbidez com escala de McFarland 0,5 que em contagem em placa foi equivalente a 1×10^6 UFC/mL.

As placas foram re-incubadas a 37°C por 48h. As colônias que apresentaram halo de inibição no meio foram submetidas à coloração de Gram e prova de catalase. As colônias que apresentaram como Gram positiva e catalase negativa foram classificadas como bactérias lácticas, conforme Alexandre et al. (2002)

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi feita a descrição dos dados das análises físico-químicas e microbiológicas encontradas.

Não foi feito um estudo de correlação entre as características físico-químicas e a presença do agente devido ao baixo número de amostras positivas.

Para análise estatística dos fragmentos gerados pelas técnicas de PFGE e AFLP foi utilizado o programa Bionumerics 6.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgica). A similaridade das amostras foi estimada por meio do coeficiente de Dice. Com a matriz de similaridade gerada será possível determinar os grupos pelo método de "Unweighthed Pair-Group Method Using Arithmetic Average" (UPGMA).

A incerteza associada à frequência de *Listeria monocytogenes* nos queijos foi calculada pela distribuição beta do processo binomial utilizando-se o software @Risk 5.7 para Microsoft Excel (Palisade Corporation).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletadas e analisadas 165 amostras providas de 157 feirantes. Este número difere entre si devido à coleta de mais de uma amostra do mesmo feirante, quando as condições do produto permitiam verificar que se tratava de lotes diferentes (tempo de maturação, por exemplo).

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS

Os resultados das análises físico-químicas mostraram grande variabilidade dos dados, sugerindo falta de controle do processo de fabricação desse tipo de queijo, o que era esperado, em função de ser um produto fabricado em condições não controladas. Durante a coleta de amostras, foi observada visualmente a discrepância entre os estágios de maturação, de textura e de umidade entre os queijos vendidos sob a demoninação de “queijo minas meia cura”, como ilustra a figura 3.

Figura 3 - Variedade de queijos vendidos como Minas meia cura na feira livre em São Paulo.

Como o critério microbiológico estabelecido para queijos é baseado na sua classificação quanto à umidade (BRASIL, 1994), os resultados físico químicos estão apresentados na tabela 1, agrupados conforme o teor de umidade das amostras.

Observa-se na tabela que a maioria das amostras foram classificadas como queijo de baixa (57,6%) ou de média (34,5%) umidade.

A despeito da maioria das amostras (92,1%) ser de baixa ou média umidade, os valores médios da A_w , nos diferentes grupos, foram muito próximos e relativamente altos, acima de 0,9. Os valores da A_w para o conjunto das amostras variaram de 0,86 a 0,98. Sousa et al. (2006) registraram A_w de queijos minas meia cura entre 0,83 e 0,98 enquanto Favaro et al (2006) obtiveram valores entre 0,94 e 0,98.

Quanto ao pH, houve grande variação também, o valor mínimo registrado foi de 4,3 e o máximo foi de 7,5. Nota-se que também não houve, aparentemente, uma correlação com a evolução da maturação (indiretamente avaliada pela redução da umidade). Seria de se esperar que a proteólise que ocorre durante a cura, aumentasse o pH do produto. Houve poucos dados nas categorias de alta umidade e muito alta umidade para que se aplicasse um teste estatístico para avaliar esse aspecto. Favaro et al (2006) obtiveram pH de queijos minas meia cura entre 4,6 e 5,3.

Tabela 1 - Resultado descritivo das análises físico químicas de queijos minas meia cura provenientes de feira livres, segundo a classificação oficial pelo teor de umidade

classificação quanto ao teor de umidade	número de amostras na categoria	descritivo	U (%) (++++)	Aw (+++++)	Ph (++++++)
m.a.U. (†) (> 55%)	n=1 (0,6%)	análise descritiva	55,4	0,93	5,2
a.U. (††) (46-54,9 %)	n=12 (7,3%)	Média	47,4	0,95	5,7
		Desvio padrão	2,64	0,021	0,58
		Mediana	46,0	0,95	5,5
		Mínimo	46,0	0,92	5,3
		Máximo	53,0	0,98	7,1
m.U. (†††) (36-45,9 %)	n=57 (34,5%)	Média	40,1	0,95	5,5
		Desvio padrão	2,80	0,015	0,54
		Mediana	40,0	0,95	5,4
		Mínimo	36,0	0,91	4,6
		Máximo	46,0	0,98	7,5
b.U. (††††) (< 35%)	n=95 (57,6%)	Média	28,0	0,94	5,2
		Desvio padrão	4,45	0,02	0,49
		Mediana	28,0	0,94	5,2
		Mínimo	18,0	0,86	4,3
		Máximo	34,0	0,98	6,8

(†)Muito alta umidade; (††)Alta umidade; (†††) Média umidade; (††††) Baixa umidade;

(+++++) umidade percentual; (++++++) atividade de água; (++++++) potencial hidrogeniônico

Não há muitos dados na literatura sobre queijo minas meia cura, talvez, pela dificuldade de se determinar o que é esse produto, já que não há um padrão oficial. Os dados disponíveis de produtos que se assemelham a ele retratam uma variedade nos resultados, confirmando a falta de padronização. Mata (2009), analisando queijos Minas artesanal (que é um tipo minas com cura curta) da Cooperativa de Produtores Rurais do Serro (MG) obteve, aos 37 dias de maturação, os seguintes resultados médios de umidade, Aw e pH: 49,10%; 0,913 e 5,24. Aos 69 dias de maturação, houve alteração significativa dos valores médios de Aw e pH: 0,924 e 5,66. Machado et al.(2004) analisaram queijo minas artesanal e encontraram valores médios de pH-4,98 e umidade de 50,8%; Ide et al. (2001), encontraram valores médios em queijo minas colonial de pH 5,43 e umidade de 43,72%.

5.2 PESQUISA QUALITATIVA DE *Listeria monocytogenes*

Das 165 amostras analisadas, 53 apresentaram colônias suspeitas de *Listeria* spp nos ágaros Palcam ou Oxford. De cada uma dessas 53 amostras, 5 colônias foram purificadas em TSA, totalizando 265. Das 265 colônias, 103 foram classificadas como gênero *Listeria* pelas provas: motilidade, redução de nitrato, catalase e gram. Destas, 35 apresentaram resultados de VM-VP e fermentação de açúcares com característica de *L. monocytogenes*, mas também compatível com *L. innocua*. Todas essas colônias apresentaram atividade hemolítica no ágar sangue de carneiro 5%, no entanto, o Camp test (ágar Columbia) mostrou-se inconclusivo. Não foi possível definir a presença/ausência de *Listeria monocytogenes* em nenhuma amostra (25g) utilizando apenas as provas fenotípicas, devido a dificuldades com o Camp teste.

A dificuldade na interpretação dos resultados do Camp teste é apontada na literatura (STELMA, 1987). A orientação oficial (para análise de produtos cárneos e amostras ambientais - BRASIL, 2005) para situações em que o Camp teste não der uma reação positiva, mas a colônia for hemolítica, é que se proceda a identificação genética do isolado com testes baseados no RNA ribossômico.

Todas as 103 colônias suspeitas de serem *Listeria* spp. pelo método fenotípico foram submetidas à reação de PCR, segundo Border et al. (1990). Os resultados evidenciaram a presença de *Listeria monocytogenes* em 3% amostras (5/165) de queijo. A incerteza sobre esse parâmetro, calculada pela distribuição beta (Figura 4), expressa que, com o intervalo de confiança de 90%, o resultado de positividade para *L. monocytogenes* variou de 1,6% a 6,2%, com média de 3,6%.

Figura 4 – Frequência distribuição de *L. monocytogenes* em amostras de queijo tipo Minas meia cura comercializados em feiras livres em São Paulo.

No país, pesquisas demonstram uma ampla variação de ocorrência de *L. monocytogenes* em queijos, que varia de zero a 48% (SILVA et al., 2011; BARANCELLI et al., 2011; PINTADO et al., 2005) que modo geral a é baixa (SILVA et al., 2011). Mata (2009) não isolou *L. monocytogenes* em nenhuma das 48 amostras queijos Minas artesanal (um tipo minas com cura curta) provenientes da região do Serro (MG), assim como Andrade (2009) não isolou *L. monocytogenes* em 27 amostras de queijo tipo Serra da Canastra (27/0), Borelli et al.(2003) em queijos minas curado (40/0%), Velloso et al.(2003) em queijo minas Araxá (248/0), Fiorentini et AL .(2001) em queijo Colonial (75/0), Leite et al. (2002) em queijos tipo coalho (51/0), Schittler et al. (2002) em queijo colonial (75/0), e Vialta et al.(2004) em queijo Minas (206/0). Enquanto Vieira et al. (2001) encontrou em em 8% de queijo Minas frescal (50/ 8%) , Sousa et al. (2000) em 20% de 50 amostras de Queijo tipo coalho, Schocken-Iturrino et al.(2001) em 15 % de queijo minas frescal (40/15%).

É interessante ressaltar que no presente estudo, as 5 amostras positivas na reação de PCR para *L. monocytogenes* eram provenientes das 5 regiões de São Paulo. Isso indica que, embora a baixa frequência, a distribuição geográfica é

generalizada no município de São Paulo (Zonas Sul, Leste, Oeste, Norte e Central). Sendo que o queijo é um produto pronto para consumo e será ingerido sem tratamento térmico, o que poderia minimizar o risco de consumo. E embora a baixa frequência sabe-se que a listeriose, é a causa de, aproximadamente, 28% das mortes resultantes por doenças transmitidas por alimentos e apresenta a maior taxa de hospitalização de todas elas (SILVA et al., 2011).

As amostras em que a *Listeria monocytogenes* foi isolada apresentaram-se como queijos de média ou baixa umidade, evidenciando dois fatos: essa espécie sobrevive em queijo de baixa umidade, embora não haja critério microbiológico para essa classe de queijo, e sugere que umidade/*Aw* mais alta pode favorecer microrganismos com atividade antagônica à *Listeria monocytogenes*.

Volokhov et al (2007) demonstram que cepas atípicas hemolíticas de *Listeria innocua* apresentaram clusters de um gene análogo da ilha de patogenicidade (LIPI-1) presente em cepas de *L. monocytogenes* isoladas de alimentos. Reações hemolíticas produzidas por *L. innocua* são questionadas por Capita et al. (2001), que reporta quando usados meios de cultura como o BHI, diversas cepas desta espécie apresentam comportamento hemolítico.

É interessante observar que, das 11 colônias que a PCR identificou como *L. monocytogenes* (do total de 103 colônias analisadas) apenas 9 colônias haviam sido classificadas como potencial *L. monocytogenes* pelo teste fenotípico. Assim, a PCR detectou como *L. monocytogenes* duas colônias que os testes fenotípicos assinalaram como gênero *Listeria*.

Essa discrepância entre os resultados fenotípicos e genotípicos também é observada em outros trabalhos. Paixão (2010) descreve ter encontrado 370 colônias classificadas como *L. monocytogenes* pela técnica de PCR. Estas colônias também foram submetidas à sorotipificação e, por essa técnica, 348 colônias foram tipificadas como *L. monocytogenes*, e as 22 demais tipificadas como *L. innocua* não tipáveis.

O quadro 2 mostra as características das amostras que apresentaram *Listeria monocytogenes*. Observa-se que os queijos eram de média (3 amostras) e baixa (2 amostras) umidade, evidenciando a necessidade de se estabelecer critério de tolerância para esse agente também em queijos de baixa umidade; os padrões microbiológicos tanto do MAPA (BRASIL, 1994) quanto do MS (ANVISA, 2001) não contemplam esse agente nessa categoria de queijos. Observa-se que os limites

inferiores, mas que ainda deram suporte ao crescimento do agente, foram de 28% para Umidade, 0,92 de A_w e 5,1 de pH.

Quadro 2 - Características das amostras de queijo tipo minas meia cura que foram sugestivas na pesquisa de *Listeria monocytogenes*

classificação da amostra	U (%)	A_w	pH
média umidade	36	0,96	5,5
	44	0,94	5,3
	30	0,94	5,1
baixa umidade	28	0,92	5,4
	32	0,95	6,8

5.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA PELO MÉTODO QUANTITATIVO

Esse método foi aplicado as 5 amostras que apresentaram colônias sugestivas de *Listeria monocytogenes* no ágar ALOA. Não houve detecção de *Listeria monocytogenes* por esse método.

A detecção do agente pelo método qualitativo com a subsequente não detecção pelo método quantitativo sugere que o nível de contaminação apresentava-se entre os limites de detecção das técnicas, que são: 1 UFC/25g ou 0,04 UFC/g para a qualitativa e 3 NMP/g para a quantitativa. O fenômeno poderia, ainda, estar relacionado ao fato de que os contaminantes não se distribuírem homogeneamente nos alimentos.

Como já citado, de maneira geral a ocorrência do agente em queijos no Brasil é baixa, mas a literatura ressalta que diversos autores encontraram altas populações de coliformes nos produtos analisados e sugerem que a baixa ocorrência de *L. monocytogenes* em queijos pode ser resultado das altas populações de coliformes presentes nesses produtos, por competirem com a *Listeria* no alimento e interferirem no isolamento do patógeno (ARAGON-ALEGRO et al., 2006; NERO 2005). Barancelli et al. (2011) ressalva que em uma baixa população do agente associada a

injúria subletal causada pelo processamento do alimento dificultam a recuperação do agente no caldo de enriquecimento

5.4 PERFIS GENOTÍPICOS DAS CEPAS PELAS TÉCNICAS DE PFGE e AFLP

Com o objetivo de verificar uma possível correlação entre as cepas isoladas, as onze cepas de *L. monocytogenes* foram caracterizadas através das técnicas de AFLP e PFGE.

Em ambas as técnicas, o dendograma apresentou dois *clusters*: o cluster A corresponde as cepas isoladas dos queijos 1 e 2, e o cluster B que corresponde as cepas isoladas dos queijos 3, 4 e 5. Ressalta-se que em um deles contém as colônias referentes a duas amostras analisadas – feiras das zonas central e sul – e um outro, com colônias de outras amostras – zonas leste e oeste e norte.

Apesar de não ter sido realizada a sorotipagem das colônias, supõe-se que este resultado demonstre a subdivisão da *L. monocytogenes* de acordo com sua linhagem genética. Ripabelli et al (2000) relata que, embora a técnica de AFLP não seja suficientemente discriminatória para tipagem epidemiológica, ela confirmou a observação da divisão das colônias em duas linhagens: um grupo com sorotipos 1/2a e 1/2c, e outro com sorotipos 1/2 b, 3b e 4b. Pela técnica de PFGE, Kerounanton et al. (1998), descreve uma divergência genética entre cepas de *L. monocytogenes* 1/2a e 1/2c em relação aos isolados de 4b, assim como observado por Paixão (2006).

As duas técnicas geraram um dendograma com cinco diferentes perfis (pulsotipos) denominados P1 a P5 mostrados nas figuras 2, 3 e 4 e cada pulsotipo representou uma amostra não havendo diferença de caracterização das amostras entre as técnicas, assim como entre as 2 enzimas utilizadas na técnica de PFGE.

A técnica de PFGE é considerada a *gold standard* e deveria diferenciar mais as amostras entre si, quando comparada à técnica de AFLP. Nesse caso, não foi o que ocorreu, havendo muito pouca similaridade entre os perfis gerados, porém esse fato pode ser devido à pequena quantidade de colônias analisadas no estudo.

Os 5 pulsotipos encontrados, cada um representando uma amostra, indica que as cepas isoladas de um mesmo queijo, possivelmente são cepas clonais. E no intuito de estabelecer ligação epidemiológica dos queijos estes agrupamentos

gerados pelos dendogramas indicam que provavelmente não exista uma origem comum entre os queijos.

Figura 5 – Dendograma AFLP das colônias de *L. monocytogenes* isoladas de queijo tipo Minas meia cura comercializados em feiras livres no município de São Paulo

Figura 6 – Dendograma obtido pela análise do gel de *L. monocytogenes*, utilizando a enzima de restrição *ApaI* baseado no coeficiente de similaridade de Dice demonstrando a relação genética dos 5 pulsotipos gerados a partir de 11 isolados obtidos nesta pesquisa

Figura 7 – Dendograma obtido pela análise do gel de *L. monocytogenes*, utilizando a enzima de restrição *AscI* baseado no coeficiente de similaridade de Dice demonstrando a relação genética dos 5 pulsotipos gerados a partir de 11 isolados obtidos nesta pesquisa

Sabe-se que tanto o leite como o ambiente de processamento podem ser as fontes de contaminação dos queijos, e que o processo de pasteurização adequado garante a destruição de *L. monocytogenes* no leite, no entanto, pode ocorrer a recontaminação e, assim, produtos lácteos elaborados com leite pasteurizados também pode ser fonte de *Listeria* (KABUKI, 2004). Diversos estudos demonstram um perfil genotípico de cepas de *L. monocytogenes* isoladas no produto acabado igual à de isolados do ambiente, maquinários e utensílios usados na fabricação do queijo, como demonstrado por Destro et al. (1996), Brito et al. (2008), Silva et al. (2001), Silva et al. (1998) e Pintado et al. (2009). Estes dados salientam a importância das boas práticas de fabricação, principalmente a higienização do ambiente e dos equipamentos nos laticínios, visto a capacidade de sobrevivência e multiplicação do agente nestes equipamentos.

5.5 RESULTADOS DO TESTE DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DA *LISTERIA*

É importante ressaltar que a metodologia utilizada para este teste, neste estudo, é laboriosa e mostrou-se inúmeras vezes imprecisa. Os resultados relatados foram apenas o que realmente mostraram-se sem alguma dúvida como positivos.

De 20 amostras de queijos testadas, 7 apresentaram colônias inibidoras no crescimento de *L. monocytogenes*. No total de 480 colônias testadas, 32 (6,66%) apresentaram antagonismo determinado pela formação de um halo evidente e bem definido ao redor da colônia teste (Figura 8 e 9).

As 32 colônias que apresentaram antagonismo foram gram positivas e catalase negativas, sendo classificadas como bactérias lácticas.

Grande parte dos isolados apresentaram forma de coccus, especificamente diplococcus e alguns poucos bastonetes, características comuns das bactérias ácido lácticas que são utilizadas como “startes” na fabricação dos queijos. É importante ressaltar que em uma amostra (amostra não utilizada para resultados do trabalho) foram identificadas colônias gram positivas, catalase positiva com forma tetrade, compatível com o gênero *Micrococcus*, que se mostra patogênico ao homem.

Os resultados dessa etapa da pesquisa contribuem para explicar a baixa frequência de isolamentos da *Listeria monocytogenes* no queijo minas meia cura.

Considerando as amostras que foram positivas para *Listeria monocytogenes*, as características físico químicas desses queijos, observadas no quadro 2, apresentado anteriormente, podem ter contribuído para inibir uma eventual microbiota antagônica presente nas amostras, favorecendo assim o crescimento da *Listeria monocytogenes*.

Figura 8 – Halo de inibição formado por microrganismos isolados de queijo tipo Minas meia cura após 48h de incubação a 37°C.

Figura 9 – Halo de inibição formada por microrganismos isolados de queijo tipo Minas meia cura após 48h de incubação a 37°C

Nero (2005) salienta que este tipo de inibição é provavelmente causada por bacteriocinas. O autor ressalta que a qualidade microbiológica do leite no Brasil é baixa e a presença natural de uma microbiota com grande potencial inibitório pode resultar em uma baixa frequência no isolamento de microrganismos patógenos.

Rosslund et al. (2005) sugerem ainda que a baixa frequência de isolamento de *Listeria* em queijos pode ainda derivar das alterações que as bactérias lácticas produzem na matriz do produto, como produção de ácidos orgânicos (que reduzem

o pH) ou de metabólitos, além das bacteriocinas, como o peróxido de hidrogênio e diacetil.

O efeito inibitório de culturas lácteas sobre a *L. monocytogenes* é demonstrado por outros pesquisadores. Elegado et al. (2004) através da metodologia do ágar *spot test* estudaram a capacidade de inibição do *Lactobacillus plantarum* sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium* e *L. monocytogenes* e relatou a que apenas a cepa de *L. monocytogenes* teve seu desenvolvimento inibido. Em vinte amostras de produtos cárneos, De Martinis et al.(2003), observaram que *Leuconostoc* sp. e *L. sakei* foram capazes de inibir o crescimento de nove cepas de *L. monocytogenes*. Herreiros et al. (2005), no entanto, não observaram atividade antagônica de bactérias lácticas, isoladas de queijo produzido na Espanha, sobre *L. monocytogenes*.

6 CONCLUSÕES

A frequência de *Listeria monocytogenes* em queijo tipo minas meia cura é baixa e, quando presente, encontra-se em baixos níveis de contaminação. No entanto, do ponto de vista geográfico, o agente encontra-se no queijo tipo minas meia cura de todas as regiões do município de São Paulo.

As amostras em que a *Listeria monocytogenes* foi isolada apresentaram-se como queijos de média ou baixa umidade.

Não houve quantificação do agente nas amostras positivas p. *L. monocytogenes*, sugerindo um nível baixo de contaminação.

A caracterização genotípica das amostras, tanto na técnica de PFGE, quanto na técnica de AFLP, sugere que as amostras positivas para o agente possivelmente, não possuem a mesma origem de contaminação.

As bactérias láicas presentes nos queijos possuem efeito inibitório sobre a *L. monocytogenes*.

REFERENCIAS

ABRAHÃO, W. M.; ABRAHÃO, P. R. S.; MONTEIRO, C. L. B.; PONTAROLO, R. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese and ice cream produced in the State of Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 289-296, 2008.

ALEXANDRE, D.P; SILVA, M.R.; SOUZA, M.R.; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 4, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010209352002000400014>. Acesso em: Ago/2012

ANDRADE, C.R. **Diagnóstico da qualidade microbiológica de queijo Serra da Canastra e caracterização de bactérias do gênero *Enterococcus***. 2009. 98f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12** de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.

ARAGON-ALEGRO, L.C.; SOUZA, K.L.O.; NUNES T.P.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T. Influência de coliformes na população de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas frescal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 10., 2006, Curitiba. **Anais...** Campinas: SBCTA, 2006.

BARANCELLI, G. V.; SILVA-CRUZ, J. V.; PORTO, E.; OLIVEIRA, C. A. F. *Listeria Monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 1, 2011.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do Leite**. São Paulo. Nobel. 1991.

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

BESSESEN, M. T.; LUO, Q.; ROTBART, H. A.; BLASER, M. J.; ELLISON, R. T. Detection of *Listeria monocytogenes* by using the polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2930-2932, 1990.

BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANSS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM VAN DILLEN, P.M.E.; NOORDA, J.V. Rapid and simple method for purification of nucleic acids **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495–503, 1990.

BORDER, P.M.; HOWARD, J.J.; PLASTOW, G.S.; SIGGENS, K.W. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. **Letters of Applied Microbiology**, v. 11, p. 158-162, 1990.

BORELLI, B. M.; LACERDA, I. C. A.; CARRARA, C. L.; SANTOS, D. A.; SILVA, M. C. C.; CARMO, L. S. Perfil microbiológico queijos Minas curado produzido na Serra da Canastra. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22., 2003, Florianópolis, 2003. **Anais...** Florianópolis, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Resolução n.69** de 11 de março de 1996. Regulamento Técnico geral para a fixação dos requisitos microbiológicos de queijos. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta>>. Acesso em: 31 ago 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa n.22** de 14 de abril de 2003(a). Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químico para o controle de leite e produtos lácteos. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta>>. Acesso em: 31 ago 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa n.62** de 26 de agosto de 2003(b). Métodos Analíticos Oficiais para análises microbiológicas para o controle de produtos de origem animal. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>>. Acesso em: 31 ago 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- MAPA. Secretaria de Defesa Agropecuária SDA /Coordenação Geral de Apoio Laboratorial – CGAL. **Instrução Normativa n. 40**, de 12 de dezembro de 2005. ANEXO. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos e amostras ambientais com esponjas. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=9808>>. Acesso em 31 ago 2010.

BRITO, J. R.; SANTOS, E. M. P.; ARCURI, E. F.; LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; SOUZA, G. N.; CERQUEIRA, M. M. P. O.; BELTRAN, J. M. S.; CALL, J. E.; LIU, Y.; PORTO-FETT, A. C. S.; LUCHANSKY, J. B. Retail survey of Brazilian milk and Minas Frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence,

relatedness and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 15, p. 4954-4961, 2008.

CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C.; MORENO, B. Occurrence of *Listeria species* in retail poultry meat and comparison of a cultural/immunoassay for their detection **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, p. 75–82. 2001.

CARVALHO, J. D. G. **Avaliação da Qualidade de Queijos Tipo Minas Frescal Elaborados por Diferentes Processos Tecnológicos e comercializados em Campinas- SP**. 2003. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

CERQUEIRA, M. M. O. P.; LEITE, M. O.; FONSECA, L. M.; SOUZA, M. R.; MESQUIARI, M.; RODRIGUES, R. Frequência de *Listeria* sp e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas produzido artesanalmente. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 13., 1995, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora, 1995.

CHASSEIGNAUX, E.; TOQUIN, M.T.; RAGIMBEAU, C.; SALVAT, G.; COLIN, P.; ERMEL, G. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from the enviroment, raw meat and raw products in two poultry- and pork-processing plants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 888-899, 2001.

CHILE'S LISTERIA OUTBREAK. Food alert, 22/12/ 2008. Disponivel em: <<http://efoodalert.blogspot.com/2008/12/chiles-listeria-outbreaks.html>> Acesso em 31 ago 2010.

CIESIELSKI, C. A.; HIGHTOWER, A. W.; PARSONS, S. K.; BROOME, C. V. Listeriose in the United States: 1980-1982. **Archives of Internal Medicine**, v. 148, p. 1416-1419, 1988.

CORREIA, M. **Características microscópicas de queijos prato, mussarela e mineiro comercializados em feiras livres na cidade de São Paulo**. 1995. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

CUENCA, F. F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiologia molecular de las enfermedades infecciosas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 6, n. 22, p. 94-98, 2004.

DE MARTINIS, E. C. P.; FREITAS, F. Z. Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocin formation. **Food Control**, v. 14, n. 3, p. 197-200, 2003.

DESTRO, M. T. ; LEITÃO, M. F. ; FARBER, J. M. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 62, v. 2, p. 705-11, 1996.

DESTRO, M.T.; SERRANO, A. De M.; KABUKI, D.Y. Isolation of *Listeria* species from some brazilian meat and dairy products. **Food Control**, v.2, n.2, p.110-112, 1991.

DE ZOYZA, A.; EFTRATIOU, A. Use of amplified fragment length polymorphisms for typing *Corynebacterium diphtheriae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3843-3845, 2000.

ELEGADO, F. B.; GUERRA, M. A. R. V.; MACAYAN, R. A.; MENDOZA, H. A.; LIRAZAN, M. B. Spectrum of bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* BS and fingerprint by RAPD-PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, n. 1, p. 11-18, 2004.

FAO- Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. Garantia da Qualidade dos Produtos da Pesca. **Documento Técnico sobre as Pescas**, n.334, Roma, FAO. 1997. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/003/T1768P/T1768P00.HTM>>. Acesso em março de 2007.

FARBER, J.M.; HARWIG, J. The Canadian position on *Listeria monocytogenes* in read to eat foods. **Food Control**, v.7, n.4/5, p.253-258, 1996.

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

FARBER, J.M.; SANDERS, G.W.; DUNFIELD, S.; PRESCOTT, R. The effect of various acidulants on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology** , v. 9, p. 181-183, 1989.

FAVARO, C. F.; AMAKU, M.; BALIAN, S. C.; TELLES, E.O. Determination of water activity, pH, coagulase positive *Staphylococcus* counts, total and fecal coliform counts in Minas meia cura cheese sold in street markets in the southern region of the city of São Paulo. **Veterinária e Zootecnia**, v. 13, n. 2, p. 201-207, 2006.

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

FIORENTINI, A. M.; KLAJN, V. M.; VICENZI, R.; BELLÉ, T.; SCHITTLER, L.; SERRO, A. Avaliação da incidência de *Listeria monocytogenes* em queijos coloniais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21., 2001, Foz do Iguaçu. **Anais**. Foz do Iguaçu, 2001.

FORSYTHE, S.F. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

FRANCO, B. D. G .M.; LANDGRAF. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo. Atheneu, 1996.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J.P.M. **Tecnologia de Queijos**. São Paulo. Dipemar. 1994.

GIOVANNACCI, I.; RAGIMBEAU, C.; QUEGUINER, S.; SALVAT, G.; VENDEUVRE, J. L.; CARLIER, V.; ERMEL, G. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, p. 127-140, 1999.

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

GRAVES, L. M.; SWAMINATHAN, B. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, p.55–62, 2001.

HERREROS, M. A.; SANDOVAL, H.; GONZÁLEZ, L.; CASTRO, J. M.; FRESNO, J. M.; TORNADIJO, M. E. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from armada cheese (a Spanish goat's milk cheese). **Food Microbiology**, v. 22, n. 5, p. 455-459, 2005.

HALL, P.A.; LEDENBACH, L.; FLOWERS, R.S. Acid-Producing Microorganisms. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. A. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. p. 201-207.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 2465-2466, 1988.

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods, *Microorganisms in foods 7: Microbiological testing in food safety management*. [S.l]: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002.

IDE, L. P. A.; BENEDET, H. D. Contribuição ao conhecimento do queijo colonial produzido na região serrana do estado de Santa Catarina, Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, p.1351-1358, 2001.

JANTZEN, M. M.; NAVAS, J.; PAZ, M.; RODRIGUEZ, B.; SILVA, W. P.; NUNEZ, M.; MARTINEZ-SUAREZ, J.V.. Evaluation of ALOA plating medium for its suitability to recover high pressure-injured *Listeria monocytogenes* from ground chicken meat. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 3, p.313–317, 2006.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. London. Chapman & Hall, 2000.

KABUKI, D. Y. **Rastreamento de *Listeria monocytogenes* em indústrias processadoras de queijo fresco tipo latino, nos Estados Unidos da América, empregado a subtipagem molecular**. 2004. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

KEROUANTON, A.; BRISABOIS, A.; DENOYER, E.; DILASSER, F.; GROUT, J.; SALVAT, G.; PICARD, B. Comparison of five typing methods for the epidemiological study of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 61-71, 1998.

LEITE, C. C.; GUIMARÃES, A. G.; RIBEIRO, N. S.; ASSIS, P. N. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em queijo do tipo coalho comercializado em Salvador. **Revista Analytica**, v. 2, p. 38-41, 2002.

LEWUS, C. B. AND MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 13, p. 145-150, 1991

LONCAREVIC, S.; OKLAND, M.; SEHIC, E.; NORLI, H.S.; JOHANSSON, T. Validation of NMKL method No. 136 — *Listeria monocytogenes*, detection and enumeration in foods and feed. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 154–163, 2008.

LOÑDONO, M. M. D. **Determinação das Características de Fabricação, Padrões Físico-Químicos, Sensoriais e de Comercialização do Queijo Minas Meia-Cura e Comparação com os Queijos Minas Padrão e Prato**. 1998. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Londrina, Londrina, 1998.

MACHADO, E. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; FONSECA, L. M.; SOARES, F. M.; PEREIRA JUNIOR, F. N. Características Físico-Químicas e Sensoriais do Queijo Minas artesanal produzido na Região do Serro, Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 516-521, 2004.

MAGRO, M. L. M.; CORBACHO, J. M. M.; SORRIBES, C. H. Las bacteriocinas de las bacterias lácticas 1: Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección. **Alimentaria**, v. 37, p. 59-66, 2000.

MATA, G.M.S.C. **Comparação de métodos para pesquisa de *Salmonella* sp. Ee *Listeria* sp. e avaliação microbiana e físico química em queijos minas artesanais**. 2009. **Dissertação** (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2009.

MCCARTHY, S.A. *Listeria* in the environment. In: MILLER, A.J.; SMITH, J.L. SOMKUTI, G.A. (Ed.). **Foodborne listeriosis. Society for Industrial Microbiology**. New York: Elsevier Science Publishing, 1990. p. 25-29.

MCLAUCHLIN, J.; RIPABELLI, G.; BRETT, M. M.; THRELFALL, E.J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 21-28, 2000.

NAKAMA, A.; MATSUDA, M.; ITOH, T.; KANEUCHI, C. Molecular typing of *Listeria monocytogenes* isolated in Japan by pulsed-field gel electrophoresis. **J. Vet. Med. Sci.**, v.60, n.6, p.749-752, 1998.

NERO, L.A. *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção. 2005. **Tese** (doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

OKTEM, A. B.; BAYRAM, G.; CEYLAN, A. E. YENTÜR, G. Prevalence of *L. Monocytogenes* in some Turkish foodstuffs. **Journal of Food Quality**, v. 29, n. 1, p. 76-86, 2006.

OLIVEIRA, J. S. **Queijo: Fundamentos Tecnológicos**. São Paulo : Ícone. 1986.

ORNELAS, E. A.; FERNANDES, T. M.; ASSIS, F. L. A.; SILVA, M. C. C. S.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Perfil microbiológico de amostras de queijo minas

artesanal produzidos na Serra da Canastra-MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23., 2005, Santos. **Anais...** Santos, 2005.

PAIXÃO, R. **Isolamento e Caracterização de Amostras de *Listeria monocytogenes* em Sistemas Intensivos de Produção de Suínos e Abatedouros.** 2006. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- USP, São Paulo, 2006.

PEDRO, S. C. M. **Avaliação da Qualidade Higiénico Sanitária dos Locais de Venda e de Amostras de Queijo Minas Meia-Cura, Comercializado na Cidade de São Paulo.** 2003. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PINI, P. N.; GILBERT, R. J. The occurrence in the U.K. of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 317-326, 1988.

PINTADO, C. M.; GRANT, K. A.; HALFORD-MAW, R.; HAMPTON, M. D.; FERREIRA, M. A.; MCLAUCHLIN J. Association between a case study of asymptomatic ovine listerial mastitis and the contamination of soft cheese and cheese processing environment with *Listeria monocytogenes* in Portugal. **Foodborne Pathogens and Disease**.v.6, n. 5, p. 569-575, 2008

PINTAR, K.; COOK, A.; POLLARI, F.; RAVEL, A.; LEE, S.; ODUMERU, J. A. Quantitative effect of refrigerated storage time on the enumeration of *Campylobacter*, *Listeria*, and *Salmonella* on artificially inoculated raw chicken meat. **Journal of Food Protection**, v. 3, n. 70, p. 739-743, 2007.

PINTO, P.S.A.; GERMANO, M.I.S.; GERMANO, P.M.L. Queijo Minas: Problema Emergente da Vigilância Sanitária. **Higiene Alimentar**, v.10, n.44, p.22-27, 1996.

POMPERMAYER, D. M. C. *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* incidence in low moisture cheese produced in Rio Grande do Sul - Brasil. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS, 7., 2002, Santiago. **Anais...** Santiago, 2002.

RIPABELLI, G.; MCLAUCHIN, J.; THRELFALL, E. J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Listeria monocytogenes*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 23, p. 132–136, 2000.

ROCHE, S. M.; GRACIEUX, P. ; VELGE, P. Poor detection of low-virulence field strains of *L. monocytogenes* is related to selective agents in selective media and is unrelated to PrfA. **Food Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 21-26, 2009.

ROSSLAND, E.; LANGSRUD, T.; GRANUM, P. E.; SORHAUG, T. Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *Bacillus cereus* in milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 193-200, 2005.

RUDOLF, M.; SCHERER, S. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 63, n. 1/2, p. 91-98, 2001.

RYSER, E. T.; MARTH, E. H. **Listeria, listeriosis and food safety**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1999.

SANTA LUCIA brand ricotta cheese recalled for listeria. CBC news, 3/12/2008. Disponível em: <<http://www.cbc.ca/consumer/story/2008/12/03/listeria-recall>>

SCHITTLER, L.; FIORENTINI, A. M.; VICENZI, R.; RIEGER, A.; TONDO, E.; SERRO, A. Avaliação da incidência de *Listeria monocytogenes* em queijos coloniais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 28., 2002, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, 2002.

SCHOCKEN-ITURRINO R. P.; POIATTI, M. L.; VIEIRA, S. D.; SESANA, J. C.; SESANA, R. C. Microbiological quality of handmade produced type "Minas frescal" cheese, commercialized in the region of Jaboticabal-SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21., 2001, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu, 2001.

SEELINGER, H. P. R.; JONES, D. Genus *Listeria*. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p.1235-1245, 1986.

SILVA, M. C. D.; DESTRO, M. T.; HOFER, E.; TIBANA, A. Characterization and evaluation of some virulence markers of *Listeria monocytogenes* strains isolated from Brazilian cheeses using molecular, biochemical and serotyping techniques. **International Journal of Food Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 275-280, 2001.

SILVA, A. S.; ARAGON, C. C.; SANTANA, E. H. W.; DESTRO, M. T.; COSTA, M. R.; ALEGRO, L. C. A. *Listeria monocytogenes* em Leite e Produtos Lácteos no

Brasil: Uma Revisão. **UNOPAR Científica. Ciências biológicas e da saúde** v. 13, n. 1, p. 59-67. 2011.

SILVA, M .C .D.; HOFER, E. TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 3, p. 354-356, 1998.

SOUZA, D. D. P.; GUIMARÃES, R.; VILLELA, F. R. M. A.; MENDES, H. M .F.; OLIVEIRA, N. S .P.; TUCCI, T. M.; BRAGA, M. C.; BALIAN, S. C.; TELLES, E.O. Avaliação da qualidade higiênico- sanitária de queijo minas frescal e meia cura comercializados de forma informal em Jacareí-SP. **REVISA**, v. 2, n. 1, p.60-63, 2006.

STELMA JR, G. N.; REYES, A .L.; PEELER, J. T.; FRANCIS, D. W.; HUNT, J. M.; SPAULDING, P. L.; JOHNSON, C. H.; LOVETT, J. Pathogenicity Test for *Listeria monocytogenes* Using Immunocompromised Mice. **Journal of clinical Microbiology**, v. 25, n. 11, p. 2085-2089, 1987.

SWANSON, K.M.J.; PETRAN, R.L.; HANLIN, J.H. Culture Methods for Enumeration of Microorganisms. In: DOWNES F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: American Public Health Association, 2001. p. 53-62.

WESLEY, I.V.; HARMON, K.M.; RAMOS, A.; DICKSON, J. Application of a multiplex PCR assay for the simultaneous confirmation of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.**, v.65, p.780-785, 2001.

YOSHIDA, T.; TAKEUCHI, M.; SATO, M.; HIRAI, K. Typing *Listeria monocytogenes* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. **J. Vet. Med. Sci.**, v.61, n.7, p.857-860, 1999

US FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. **Bacteriological Analytical Manual** (2003). Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>>

VELLOSO, C. R. V.; XAVIER, E.; GUSMÃO, M. D.; LOPES, A. C. F.; MELO, C. A.; PENA, L. A. Avaliação da composição e qualidade microbiológica dos queijos Minas Araxá, do Serro e Canastra. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 7., 2003,. **Anais...** Belo Horizonte, 2003.

VENTURA, R.F. Queijo Minas “Meia Cura”; Características Físico-Químicas. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 10., 1998, Juiz de Fora. **Anais...** Belo Horizonte, 1988.

VIALTA, A.; MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; BARBIERI, M. K.; GRAEL- MARACA, E. T.; SOUZA, F. K. H. Caracterização microbiológica e microscópica de leite e queijos comercializados informalmente no estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19., 2004, Recife. **Anais...** Recife. 2004.

VIEIRA, S. D.; POIATTI, M. L.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; VIEIRA, H.; ANDRADE, T. M. *Listeria monocytogenes* in type “Minas frescal” craft cheese, marketed in the area of Araguaiana-TO. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21., Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu, 2001.

VLAEMYNCK, G. M.; MOERMANS, R. Comparison of LEB and Fraser enrichment broths for the detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in raw milk dairy products and environmental samples. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 11, p. 1172-1175, 1996.

VOLOKHOV, D. V.; DUPERRIER, S.; NEVEROV, A. A.; GEORGE, J.; BUCHRIESER, C.; HITCHINS, A. D. The presence of the internalin gene in natural atypically hemolytic *Listeria innocua* strains suggests descent from *L. monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology** v. 73, n. 6, p. 1928-1939, 2007.