**OCORRÊNCIA DE *Listeria*
monocytogenes EM LEITE CRU, LEITE
PASTEURIZADO TIPO C E QUEIJO MINAS
FRESVAL COMERCIALIZADOS EM
PIRACICABA**

VÂNIA TRAVAGLINI CASAROTTI
Bióloga

Orientador: Prof. Dr. RODOLPHO DE CAMARGO

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área de
Concentração: Ciência e Tecnologia
de Alimentos.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Julho - 1993

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca de Documentação - PCLQ/USP

Casarotti, Vânia Travaglini

C335o Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em leite cru,
leite pasteurizado tipo C e queijo minas frescal
comercializados em Piracicaba. Piracicaba, 1993.
109 p.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Bactéria láctica 2. Bactéria patogênica 3. Leite-
Bacteriologia 4. Queijo - Bacteriologia I. Escola Superior
de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 637.1277

**OCORRÊNCIA DE *Listeria*
monocytogenes EM LEITE CRU, LEITE
PASTEURIZADO TIPO C E QUEIJO MINAS
FRESAL COMERCIALIZADOS EM
PIRACICABA**

VÂNIA TRAVAGLINI CASAROTTI

Aprovada em: 03/09/1993

Comissão julgadora:

Prof. Dr. RODOLPHO DE CAMARGO

ESALQ/USP

Prof. Dr. CLAUDIO ROSA GALLO

ESALQ/USP

Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

ESALQ/USP

p/ Prof. Dr. RODOLPHO DE CAMARGO

Orientador

Aos meus pais, *Geraldo* e
Erlinda, por mais este
degrau galgado

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

- À DEUS, oceano de luz, por estar sempre comigo;
- Ao Dr. Rodolpho de Camargo, pela orientação, amizade e apoio dispensados;
- Ao Dr. Cláudio Rosa Gallo, pela amizade, estímulo e colaboração;
- À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", em especial ao Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, pelos recursos oferecidos;
- À FAPESP pelo auxílio financeiro concedido e à CAPES pela bolsa concedida para o desenvolvimento do curso;
- Aos meus pais pelo amor, dedicação e apoio e ao Ricardo A. M. Grizzo pelo amor, companheirismo e incentivo;
- À todos os professores e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, em especial aos Professores Dr. Antonio Joaquim de Oliveira e Professor Paulo César Vertoni e aos funcionários Sandra de Marchi Vello, Hilcias Arruda Nicolau, Denise de A. L. Baptista, Rosalina de F. Ocangne e Cecília H. Nogueira;
- À Heliana de Azevedo Gomes e Célia Regina de Ávila pela amizade e companheirismo.

SUMÁRIO

	pag.
RESUMO	iii
SUMMARY	iv
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	03
3. REVISÃO DA LITERATURA	04
3.1. Características gerais do gênero <i>Listeria</i> ...	04
3.1.1. Taxonomia	04
3.1.2. Características morfológicas e bioquí-	
micas	06
3.2. Ecologia	08
3.3. Natureza da doença	11
3.4. Surtos de listeriose de origem alimentar	17
3.5. Ocorrência de <i>Listeria monocytogenes</i> em leite	
e derivados	19
3.6. Efeito das condições ambientais e de proces-	
samento sobre <i>Listeria monocytogenes</i> , em pro-	
dutos lácteos	28
3.6.1. Resistência térmica	28
3.6.2. Sobrevivência	34
3.6.3. Outros efeitos	38

3.7. Metodologias laboratoriais para detecção e identificação de <i>Listeria monocytogenes</i>	47
4. MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1. Materiais	53
4.2. Método	56
4.2.1. Amostragem	56
4.2.2. Detecção, isolamento e identificação .	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

RESUMO

Amostras de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo minas frescal foram analisadas para a presença de *Listeria monocytogenes* através de uma metodologia desenvolvida basicamente para produtos lácteos por LOVETT (1987) e revisada por LOVETT & HITCHINS (1988).

Analisou-se um total de 20 amostras de cada produto de diferentes marcas comerciais, adquiridas em vários pontos de venda na cidade de Piracicaba, SP.

Segundo o padrão de amostragem e método adotados, não foi detectada a presença de *L. monocytogenes* ou outra espécie do gênero nas amostras analisadas dos referidos produtos. Foi possível observar diferenças no grau de seletividade dos meios seletivos utilizados, sendo o ágar LPM superior ao MMA. O crescimento de organismos não-*Listeria* sobre os meios seletivos pode indicar que os alimentos analisados correm o risco de estarem sendo expostos a contaminações de microrganismos importantes, inclusive patogênicos.

Com base na literatura e nos resultados obtidos, torna-se clara a necessidade de uma metodologia mais adequada para a detecção e isolamento de *L. monocytogenes* dos alimentos, tendo em vista que o patógeno pode apresentar-se em baixos números, no sentido de se obter resultados rápidos, seguros e reprodutíveis.

SUMMARY

Samples of raw milk, pasteurized milk C type and minas frescal cheese were analyzed for the presence of *Listeria monocytogenes* by a method developed for dairy products by LOVETT (1987) and by LOVETT & HITCHINS (1988).

A total of 20 samples of each product of different commercial brands was analyzed, acquired at various retail stores in Piracicaba, SP.

According to the pattern of sampling and methodology adopted, none of samples of the aforesaid products was positive for the presence of *L. monocytogenes* or another species of the genus. It was possible to observe differences in the degree of selectivity of the selective media utilized, notwithstanding the LPM agar showing to be superior to MMA. The growth of the non - *Listeria* organisms on the selective media may indicate that the foods analyzed might be exposed to important contaminations of microorganisms, including pathogenics.

Based on the literature and on the results obtained, becomes evident the need of a more suitable method for the detection and isolation of *L. monocytogenes* from foods, regarding that the patogen may appears in low numbers, with purpose to obtain rapid, reliable and reproducible results.

1. INTRODUÇÃO

Quando descrita pela primeira vez, *Listeria monocytogenes* foi considerada um patógeno de interesse veterinário. Posteriormente, a bactéria foi reconhecida como patogênica para o homem, e somente a partir da década de 80 e especialmente nos últimos anos, foi considerada passível de ser veiculada por vários alimentos.

Sua habilidade de multiplicação em temperaturas de refrigeração, a capacidade de sobrevivência durante longos períodos sob condições adversas e a ampla distribuição na natureza, são algumas das características que revelam a grande importância de *Listeria monocytogenes* como um problema para as autoridades de saúde pública e para as indústrias de alimentos.

Devido aos surtos de listeriose humana de origem alimentar registrados na literatura, os procedimentos de detecção e enumeração de *Listeria monocytogenes* a partir de alimentos, bem como o desenvolvimento de novos meios de cultura, vêm sendo bastante estudados.

De acordo com a literatura os produtos lácteos têm se mostrado contaminados por *Listeria monocytogenes*, porém no Brasil ainda existem poucos trabalhos sobre a ocorrência do gênero e de suas espécies em alimentos, bem como dados referentes a casos de listeriose de origem alimentar.

2. OBJETIVOS

Os produtos lácteos, pelas suas características nutricionais têm importância fundamental na alimentação de crianças e adultos, porém também constituem-se em excelente substrato para os microrganismos, inclusive patogênicos, como *Listeria monocytogenes*.

Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo verificar a ocorrência de *Listeria monocytogenes*, através de uma metodologia desenvolvida para produtos lácteos, em amostras de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo minas frescal de diferentes marcas comerciais, oferecidos à população da cidade de Piracicaba, em vários pontos de vendas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Características gerais do gênero *Listeria*

3.1.1. Taxonomia

O microrganismo foi descrito pela primeira vez por MURRAY et al. (1926), que verificaram a ocorrência de monocitose em coelhos e cobaios de laboratório infectados por um bacilo Gram positivo, sendo denominado *Bacterium monocytogenes*. PIRIE (1940), isolou um microrganismo semelhante do fígado de roedores, denominando-o de *Listerella hepatolytica* e, posteriormente renomeando-o de *Listeria hepatolytica*. O organismo hoje é conhecido como *Listeria monocytogenes*.

No início, o gênero *Listeria* foi descrito contendo 4 espécies: *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. denitrificans* e *L. murrayi* (SEELIGER & WELSHIMER, 1976). *L. monocytogenes* foi considerada até então, membro da família Corynebacteriaceae, ordem Eubacteriaceae (GRAY & KILLINGER, 1966). Posteriormente, com base na hibridização de DNA/DNA, o grupo de bactérias previamente chamado *L. monocytogenes*

(*L. monocytogenes* "lato sensu") foi redefinido, passando a conter 5 espécies, sendo somente uma delas chamada de *Listeria monocytogenes* (*Listeria monocytogenes* "stricto sensu") (DESTRO, 1990).

Na última edição do Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (SEELIGER & JONES, 1986), *L. monocytogenes* encontra-se junto com *Lactobacillus*, *Erysipelothrix*, *Brochothrix*, e outros gêneros, na seção intitulada bastonetes Gram-positivos, regulares, não formadores de esporos. Segundo o manual, o gênero *Listeria* inclui 5 espécies a saber: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*. A este grupo também pertencem 3 espécies "incertae sedis": *L. grayi*, *L. murrayi*, e *L. denitrificans*. Atualmente, *L. denitrificans* foi excluída do gênero e transferida para um novo gênero, *Jonesia*, como *Jonesia denitrificans* (KLINGER et al., 1988; FARBER & PETERKIN, 1991).

Segundo SEELIGER & JONES (1986), *L. monocytogenes* é patogênica ao homem e aos animais; *L. ivanovii* é patogênica principalmente aos animais, sendo raramente isolada de fontes humanas. As demais espécies, não são patogênicas. Por outro lado, McLAUCHLIN (1987), considerou que as espécies *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. innocua*, podem causar infecções ao homem e/ou aos animais.

3.1.2. Características morfológicas e bioquímicas

O gênero apresenta-se como bastonetes Gram-positivos não esporulados, caracteristicamente pequenos, podendo ocorrer em células isoladas, em cadeias curtas, arranjadas em forma de "V" ou palissada. Medem cerca de 0,5 μ m de comprimento (FERNANDES, 1984; SEELIGER & JONES, 1986). São produtores lentos de ácidos, não formam cápsulas e são móveis por flagelos peritríquios quando cultivados a 20 - 25°C, com movimento de tombamento ou rotatório (SEELIGER & JONES, 1986).

Bastante tolerantes ao sal, podem sobreviver por meses em uma solução com 25% de cloreto de sódio, mantida a 4°C. Microrganismo anaeróbio facultativo (VAN DENVER, 1988), cresce melhor em meio neutro ou ligeiramente alcalino. SEELIGER & JONES (1986), relatam crescimento em valores de pH entre 6,0 e 9,0; VAN DENVER (1988), verificou crescimento em pH de 9,6 até cerca de 5,2, concordando com BAHK & MARTH (1990), que relatam crescimento dentro dessa faixa de valores em queijo.

O organismo é considerado psicrotrófico, desenvolvendo-se porém, em ampla faixa de temperatura, de -0,4 a 50°C (JUNTILA et al. 1988), sendo o ótimo entre 30 - 37°C; não sobrevivem ao aquecimento a 60°C por 30 minutos (SEELIGER & JONES, 1986). A temperatura de 6°C, a fase log é atingida em 5 a 11 dias (BAHK & MARTH, 1990).

Quanto às características bioquímicas, são catalase positivos; oxidase negativos; fermentam glicose com produção de principalmente ácido lático; dão reação positiva nos testes do vermelho de metila e Voges - Proskauer; não utilizam citrato; não produzem indol; hidrolisam uréia, gelatina, caseína e leite (SEELIGER & JONES, 1986).

L. monocytogenes, *L. ivanovii* e *L. seeligeri* são hemolíticas. *L. monocytogenes* expressa uma β -hemolisina que produz zonas discretas de hemólise sobre ágar sangue. A hemolisina age sinergisticamente com a β -hemolisina de *Staphylococcus aureus* sobre eritrócitos de carneiro; a substância mediadora deste efeito é conhecida como fator CAMP, após CHRISTIE et al. (1944) terem sido os primeiros a descreverem o fenômeno em estreptococos do grupo B (FARBER & PETERKIN, 1991), sendo a sigla desta substância, derivada dos nomes dos autores.

No quadro 1, são apresentadas as características diferenciais das espécies aceitas do gênero *Listeria*, *L. grayi* e *L. murrayi*.

Quadro 1. Características diferenciais das espécies aceitas do gênero *Listeria*, *L. grayi*, *L. murrayi*.

Espécie	Pat. Camp. teste									
	beta hemólise	NO3/ NO2	Ferm. MAN	Ferm. RAM	Ferm. XIL	VM/ VP	Camun. dongo	<i>S. aureus</i>	<i>Rhodo- coccus equi</i>	
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	-	+	-	+/+	+	+	-	
<i>L. innocua</i>	-	-	-	v	-	+/+	-	-	-	
<i>L. ivanovii</i>	+	-	-	-	+	+/+	+	-	+	
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	v	+	+/+	-	-	-	
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	-	+	+/+	-	+	-	
<i>L. grayi</i>	-	-	+	-	-	+/+	-	-	-	
<i>L. murrayi</i>	-	+	+	v	-	+/+	-	-	-	

Fonte: Adaptado de SEELIGER & JONES, (1986).

3.2. Ecologia

As bactérias do gênero *Listeria* estão amplamente distribuídas na natureza (GRAY & KILLINGER, 1966; BAHK & MARTH, 1990), podendo ser isoladas do solo cultivado ou não, vegetação, silagem, forragem (WELSHIMER & DONKER-VOET, 1971; FREITAS et al. 1982; FENLON, 1985), efluentes tratados ou não, água de rio (HOFER, 1975; WATKINS & SLEATH, 1981; BAHK & MARTH, 1990), vegetais para o consumo humano (HEISICK et al., 1989a,b; BAHK & MARTH, 1990), de pelo menos 42 tipos de animais domésticos e selvagens (GRAY & KILLINGER, 1966; FREITAS et al., 1982;

BAHK & MARTH, 1990), aves (FENLON, 1985; BAHK & MARTH, 1990), peixes, crustáceos, mariscos e rãs (GRAY & KILLINGER, 1966; BAHK & MARTH, 1990) e de fezes de humanos e animais portadores assintomáticos (FREITAS et al., 1982; SKOVGAARD & NORRUNG, 1989; BAHK & MARTH, 1990).

O microrganismo também foi isolado de plantas processadoras de leite e produtos lácteos (FDA's, 1987; COX et al., 1989; CHARLTON et al., 1990), de plantas processadoras de produtos cárneos (WATKINS & SLEATH, 1981; SKOVGAARD & MORGEN, 1988), assim como de outros tipos de plantas processadoras de alimentos e também do ambiente doméstico (COX et al., 1989). Com relação ao ambiente das indústrias de alimentos, podem ser citados alguns sítios fortemente sujeitos à presença de *Listeria* spp. como, suprimentos de água não clorada, áreas com frio úmido, linhas que são limpas no local ("cleaned in place" - CIP), conexões cruzadas, pés de equipamentos, canais em forma de H, tubos, alças fechadas de frio circulante, armações emboloradas, abastecedores, enxaguadores, freezers, freezers descongelados, unidades de refrigeração, linhas condensadoras, resfriadores, ingredientes, "containers" de ingredientes, túneis de entrada e saída, suprimentos de ar, pisos e superfícies úmidas, etc (KNIGHT et al., 1988).

Devido à sua natureza ubiquitária, entre outras características, *L. monocytogenes* é um microrganismo

de grande preocupação para as indústrias de alimentos, bem como para os órgãos de saúde pública.

Embora o microrganismo seja amplamente distribuído no ambiente e seja bastante resistente quando comparado à outras bactérias, medidas de controle baseadas nos procedimentos de análises de riscos e pontos críticos de controle (ARPCC) aliadas à boas práticas de higiene, se adequadamente implementadas, podem ser efetivas na diminuição da incidência e nível deste organismo nos alimentos. Algumas das medidas básicas de controle que podem ser tomadas incluem o isolamento das áreas de produtos processados, das áreas de produtos crus; lançar mão de condições de processamento e controle para reduzir ou eliminar o organismo presente nos produtos crus; limpeza e sanificação efetivas para inibir o crescimento e prevenir contaminação cruzada; checagem das medidas adotadas para assegurar que as mesmas estão funcionando (FARBER, 1991; BRYAN, 1992¹).

Os Estados Unidos adotaram um nível de tolerância zero para a presença de *L. monocytogenes* nos alimentos prontos para o consumo, porém alguns países (particularmente a Alemanha) estão considerando níveis de tolerância de 100 UFC/g para classes especiais de

¹ BRYAN, F.L. (Food Safety Consultation and Training; Curso: Hazard Analysis Critical Control Point Approach, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas. Comunicação pessoal, 1992.

alimentos. Apesar dos avanços conseguidos sobre o assunto, não foi possível ainda, decidir se as agências reguladoras podem tolerar a presença de alguma *L. monocytogenes* em produtos prontos para o consumo (FARBER, 1991).

3.3. Natureza da doença

A listeriose é a enfermidade causada por *L.monocytogenes*. A doença pode ser tanto esporádica como epidêmica, sendo que a epidemiologia é pouco conhecida (FLEMING et al., 1985). A forma ou as formas de transmissão da listeriose ao ser humano ainda não estão bem compreendidas. Devido aos relatos de surtos envolvendo alimentos contaminados (SCHLECH et al. 1983; FLEMING et al., 1985; JAMES et al., 1985), atualmente assumiu-se que a doença seja transmitida ao homem principalmente por alimentos (CASSIDAY & BRACKETT, 1989; FARBER & PETERKIN, 1991; RORVIK & YNDESTAD, 1991; OLADEPO et al., 1992), assim como a animais. A presença de *L. monocytogenes* em alimentos, é provavelmente resultado de múltiplas causas, tanto diretas como indiretas (WEHR, 1987).

Na figura 1, é apresentado um ciclo hipotético de infecção por *L. monocytogenes* proposto por BRACKETT (1988).

Fig. 1. Ciclo hipotético de infecção por *L. monocytogenes* segundo BRACKETT, 1988.

Os sintomas primários da listeriose humana são meningite, aborto e septicemia (WEHR, 1987). A maioria dos casos de listeriose humana, ocorre em indivíduos que estejam em condições de saúde que resultem em deficiência de seu sistema imunológico, porém também pode vir a ocorrer em indivíduos aparentemente saudáveis (FARBER & PETERKIN, 1991). Os indivíduos pertencentes ao grupo de risco são

mulheres grávidas, recém-nascidos, adultos com mais de 60 anos e indivíduos imunocomprometidos ou com câncer, cirrose, diabetes, doenças cardiovasculares ou renais (McLAUCHLIN, 1987; WEHR, 1987; LOVETT & TWEDT, 1988; MARTH, 1988; FARBER & PETERKIN, 1991); sendo que a taxa de mortalidade para esse grupo, pode variar de 20 a 70 % e para os indivíduos sadios, a morte é um evento raro (GRAVANI, 1987; LOVETT & TWEDT, 1988).

A listeriose em indivíduos sadios pode manifestar-se como uma doença leve, algumas vezes com sintomas de gripe e febre (GRAVANI, 1987). O desenvolvimento da doença em mulheres grávidas resulta em aborto ou parto de bebês ainda com vida e agudamente doentes (WEHR, 1987), devido à transmissão da infecção ao feto via transplacentária ou durante o parto (BAHK & MARTH, 1990).

As formas mais comuns de manifestação da listeriose, principalmente em recém-nascidos, idosos e indivíduos imunocomprometidos, são a meningite e a meningoencefalite. Entretanto, outras formas de listeriose podem ocorrer, como: cutânea (através do contato direto com animais infectados); septicemia com faringite e mononucleose; conjuntivite, podendo ser seguida por meningite purulenta; pneumonia; granulomatose séptica e cervicoglandular (forma incomum). As infecções podem também

se manifestar como artrite, osteomielite, abscesso espinhal e cerebral, peritonite, colicistite (MARTH, 1988).

Cabe destacar que nem todos os indivíduos que entram em contato com *L. monocytogenes* desenvolvem a doença e isto sugere que deva existir, no organismo humano, algum tipo de resistência. Com base em estudos feitos com camundongos, parece que *L. monocytogenes* no sangue é rapidamente retirada pelo fígado e, em menor extensão, pelo baço. A destruição do microrganismo no fígado é função dos macrófagos residentes no tecido, que são ativados pelos produtos solúveis (linfoquinas) de linfócitos "T" sensibilizados, derivados do timo. Os fagócitos mononucleares são especialmente importantes, mas os macrófagos peritoneais e os leucócitos polimorfonucleares são também ativos. Dessa forma, fica claro que os indivíduos que desenvolvem a listeriose são aqueles nos quais este processo normal de resistência falhou (BAHK & MARTH, 1990).

O mecanismo da doença ainda não foi bem esclarecido, porém a rota infectiva das células oralmente ingeridas, parece ser a penetração das células intestinais, localizando-se dentro dos macrófagos, onde se multiplicam. Após o rompimento da célula, as bactérias disseminam-se pelo organismo, provocando uma bacteremia, capaz de afetar o sistema nervoso central (LOVETT & TWEDT, 1988; FARBER & PETERKIN, 1991). KUHN et al. (1988), concluíram que a

hemolisina é necessária para a sobrevivência intracelular do microrganismo, e não para sua entrada inicial.

Os indivíduos acometidos pela listeriose podem espalhar a bactéria através de secreções nasais e da garganta, urina, fezes, secreções conjuntivais, pus da epiderme, e sangue. Estima-se que a taxa de excreção fecal de *L. monocytogenes* de pessoas normais é de no mínimo 1 %, enquanto que para pacientes sintomáticos é de 26 % (BAHK & MARTH, 1990).

A parede celular de *L. monocytogenes* parece estar envolvida na sua patogenicidade, embora uma variedade de constituintes possam contribuir para o efeito total. Um polissacarídeo tóxico, da parede celular, solúvel em água é capaz de induzir linfopenia e granulocitose. Da mesma forma, proteínas e carboidratos que aparecem nos extratos, são antigênicos, pirogênicos, ou capazes de induzir linfopenia e granulocitose. Lipídeos, provavelmente fosfolipídeos, produzem marcada monocitose e depressão das atividades dos linfócitos. *L. monocytogenes*, produz ainda hemolisinas filtráveis e solúveis, capazes de atacar os eritrócitos da maioria dos mamíferos (BAHK & MARTH, 1990). Ocorrem linhagens virulentas e avirulentas, sendo que as hemolisinas de *L. monocytogenes* são claramente associadas à virulência. A despeito da associação com a virulência, o significado patológico da expressão da hemolisina, não está esclarecido (SCHLECH, 1988). Embora muitos possíveis

fatores de virulência tenham sido descritos para o organismo, a hemolisina listeriolisina O e a proteína P60 parecem ser os dois principais fatores de virulência de *L. monocytogenes* (FARBER, 1991).

A dose infectante de *L. monocytogenes* para seres humanos, ainda não foi determinada, porém os relatos de surtos de listeriose sugerem que esta seja baixa (WEHR, 1987). Com relação ao período de incubação, a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1988) sugere, com base nos estudos de alguns surtos, que esse período para adultos varie de uma a algumas semanas.

Os antibióticos normalmente escolhidos para o tratamento da listeriose são a penicilina e a ampicilina. A maioria das linhagens de *L. monocytogenes* são também sensíveis à tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol e cefalotina (BAHK & MARTH, 1990).

L. monocytogenes foi subdividida em 13 sorotipos, 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e e 7 (o último não foi completamente caracterizado) (McLAUCHLIN, 1987; SLADE, 1992), sendo que os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b, causam a maioria dos casos da doença (FARBER & PETERKIN, 1991). Este esquema de sorotipagem tem pouco significado prático na discriminação, já que uma grande proporção de linhagens de *L. monocytogenes* de infecções humanas e animais pertencem a um dos 13 sorotipos. Portanto, a sorotipagem é de uso limitado na

elucidação da epidemiologia da listeriose. Embora a fagotipagem tenha demonstrado boa capacidade de discriminação e reprodução, somente cerca de 67% das linhagens de *L. monocytogenes* dos sorogrupos 1/2 e 4 são tipáveis com os fagos atualmente disponíveis (McLAUCHLIN, 1987; SLADE, 1992).

3.4. Surto de listeriose de origem alimentar

Embora tenha sido bem documentada a transmissão direta da listeriose a partir de animais infectados a trabalhadores rurais e veterinários, com o desenvolvimento de lesões cutâneas, a transmissão da doença tanto esporádica como epidêmica por meio dos alimentos, permaneceu desconhecida até pouco mais de 10 anos atrás (FARBER & PETERKIN, 1991).

A literatura registra um surto de listeriose ocorrido em Halle, Alemanha em 1966 envolvendo 279 pessoas, e outro surto ocorrido na região de Anjou, França em 1978 com 162 pessoas envolvidas, sendo que em ambos os surtos os agentes de transmissão da doença não foram determinados (McLAUCHLIN, 1987).

Em 1979, houve um surto de listeriose associado com *L. monocytogenes* sorotipo 4b envolvendo 20 pacientes adultos de 8 diferentes hospitais de Boston, EUA,

tendo sido considerados como as possíveis fontes de transmissão alface, tomates e alpo crus (HO et al., 1986).

Em 1981, ocorreu um surto de listeriose na Nova Escócia, Canadá, envolvendo *L. monocytogenes* sorotipo 4b, registrando 41 casos e 18 óbitos. A salada tipo "coleslaw", preparada com repolho cru, foi incriminada como veículo de transmissão. O repolho foi cultivado em solo fertilizado com estrume de carneiro cru e compostado, sendo que alguns dos animais haviam morrido de listeriose. Um outro detalhe importante, é que após a colheita, o repolho foi armazenado por um longo período sob refrigeração, o que funcionou como um enriquecimento seletivo (SCHLECH et al., 1983).

No mesmo ano de 1981, o consumo de ostras e peixes crus em Auckland, Nova Zelândia, resultou em 21 casos de listeriose (LENNON et al., 1984).

Entre junho e agosto do ano de 1983, 49 pessoas desenvolveram a listeriose resultando em 14 mortes, num surto ocorrido em Massachusetts, EUA. Neste surto, os veículos envolvidos foram o leite pasteurizado integral e o leite pasteurizado com 2% de gordura, apesar de não ter sido detectada nenhuma falha no processo de pasteurização. *L. monocytogenes* foi isolada de 15 das 124 amostras de leite (12%) obtidas antes da pasteurização e de 2 das 14 amostras obtidas de filtros de leite (14%). Muitos sorotipos diferentes foram identificados, incluindo 1a, 3b,

4ab e 4b, com predomínio do sorotipo 4b (FLEMING et al., 1985).

Na Califórnia, EUA, no ano de 1985 ocorreu um surto de listeriose envolvendo inúmeras pessoas que ingeriram um queijo macio tipo mexicano. As investigações sugeriram que possa ter ocorrido uma mistura de leite cru contaminado com leite pasteurizado durante a produção dos queijos e/ou uma contaminação após a pasteurização do leite (SILLIKER, 1987). Este foi o primeiro surto de listeriose registrado, onde o alimento envolvido na epidemia foi identificado e devolvido durante o surto (FARBER & PETERKIN, 1991).

No período de 1983 e 1987, no Cantão de Vaud, Suíça, o queijo macio tipo "Vacherin" foi associado a 122 casos de listeriose, ocorrendo 31 mortes (WHO, 1988).

A literatura também registra casos isolados de listeriose envolvendo queijos macios (SWAMINATHAN et al., 1988; AZADIAN et al., 1989), "nuggets" de frango (KACZMARSKI & JONES, 1989), salsichas de peru, e linguiça de porco tipo Cajun (FARBER, 1991).

3.5. Ocorrência de *L. monocytogenes* em leite e derivados

Além de suas importantes características nutricionais, a coleta e o beneficiamento do leite (ordenha, transporte, resfriamento, pasteurização,

distribuição), bem como a produção de seus derivados, envolvem diversas etapas que se não forem bem controladas, poderão favorecer a contaminação e/ou multiplicação de *L. monocytogenes*.

Alguns autores consideram a silagem, muitas vezes usada para alimentar o gado no inverno, uma importante fonte de *Listeria* spp., a qual pode contaminar os animais, a carne e o leite consumidos pelo homem, sendo que com base nestas considerações e em alguns estudos realizados, foi sugerida a ocorrência de sazonalidade no isolamento da bactéria (COLEMAN, 1986; WEHR, 1987; LOVETT, 1987; LIEWEN & PLAUTZ, 1988; BAHK & MARTH, 1990). Por outro lado, FARBER et al. (1988), FENLON & WILSON (1989), LUND et al. (1991) e MOURA (1992), de acordo com os estudos realizados, consideraram não haver relação entre a incidência de *L. monocytogenes* no leite e a alimentação do gado com silagem.

A infecção do úbere da vaca, é de preocupação especial, já que o patógeno pode ser liberado no leite de animais mastíticos.

Segundo a literatura, quando *L. monocytogenes* está presente nos alimentos, sua população é geralmente baixa, cerca de menos de 10^2 células/ml ou grama de alimento, sendo que seu crescimento pode ser sobrepujado pela microflora acompanhante (LOVETT, 1988a; GOLDEN et al.,

1988a; DONNELLY, 1988; FERNANDEZ-GARAYZABAL & GENIGEORGES, 1990; BAILEY et al., 1990a).

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

Um aspecto muito importante, consiste em evitar que os produtos lácteos pasteurizados sofram pós-contaminação com *L. monocytogenes*, pois devido à sua natureza psicrótrófica e ao fato de que os microrganismos competidores tenham sido eliminados, o patógeno poderá sobreviver e proliferar durante o armazenamento refrigerado. Como consequência, poderá atingir níveis perigosos de população, tornando-se portanto, um problema de saúde pública (VAN DENVER, 1988).

Nos diversos trabalhos que vêm sendo desenvolvidos no sentido de verificar a ocorrência de *L. monocytogenes* nos produtos lácteos, pode ser verificada uma variação importante nos resultados obtidos pelos autores. Neste sentido, cabe ressaltar que foram adotadas metodologias diferentes para a obtenção desses resultados.

Num estudo relativamente recente, DOMINGUEZ-RODRIGUEZ et al. (1985), analisaram um total de 95 amostras refrigeradas de leite cru, provenientes da região central e oeste da Espanha. *L. grayi* foi isolada de 89,5% das

amostras, *L. monocytogenes* de 45,3%, *L. innocua* de 15,8%, *L. welshimeri* de 3,1% e *L. seeligeri* de 1,05%. Tais resultados podem ser considerados bastante elevados em relação a outros estudos.

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

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

STONE (1987), desenvolveu um trabalho na Nova Zelândia onde foram analisadas 71 amostras de leite cru, durante um período de 7 meses. A incidência de *L. innocua* nas amostras foi de 14%, de *L. grayi* de 10%, de *L. welshimeri* de 1,4%, e de *L. monocytogenes* de 0%.

COMI et al. (1987), analisaram 140 amostras de queijos de diversos tipos para detectar a presença de *L. monocytogenes*. Os autores isolaram o microrganismo a partir de uma única amostra, a qual havia sido produzida artesanalmente com leite de cabra.

FARBER et al. (1987), investigaram a presença de *Listeria* spp. em 374 amostras de queijos macios e semi-duros, encontrando somente 2 amostras positivas para *L. monocytogenes* e uma para *L. innocua*.

LOVETT et al. (1987), durante o período referente a outubro de 1984 e agosto de 1985, analisaram a

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

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

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

DONNELLY et al. (1988), utilizaram 2 metodologias diferentes para a detecção de *L. monocytogenes* em 939 amostras de leite cru, sendo que somente 15 amostras (1,6%) foram positivas para o microrganismo.

CANTONI et al. (1989), na Itália, utilizando-se de ensaio imunoenzimático, obtiveram resultado positivo para *L. monocytogenes* em 14 das 375 amostras de queijo Gorgonzola, em 14 das 216 amostras de queijo Taleggio e em 5 das 95 amostras de queijo Itálico. Não foi obtido resultado positivo para o microrganismo a partir da análise

de 1150 amostras de outros tipos de queijos. Houve positividade em 9 dos 72 "swabs" de superfícies e equipamentos de manufatura de queijos.

No Canadá, FARBER et al. (1989), obtiveram todas as 14 amostras de leite pasteurizado negativas para a presença de *L. monocytogenes*, e somente 2 positivas entre as 530 amostras analisadas de produtos para sorvete.

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

De um total de 252 amostras de leite cru provenientes de tanques de armazenamento das fazendas,

TIWARI & ALDENRATH (1990b), verificaram que apenas 10 amostras (4%) estavam contaminadas com *Listeria* spp., sendo que 4 amostras (1,6%) abrigavam *L. monocytogenes* e 6 amostras (2,0%) abrigavam *L. innocua*. Por outro lado, a partir de 15 amostras de leite provenientes de tanques de plantas processadoras, obtiveram 4 amostras (26,6%) contaminadas com *L. monocytogenes* e 1 amostra contaminada com *L. innocua*. Das 8 amostras de creme cru analisadas, 2 estavam contaminadas com *L. innocua* e nenhuma delas abrigava *L. monocytogenes*.

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

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

DESTRO et al. (1991), no Brasil, não isolaram *Listeria* spp. a partir da análise de 20 amostras de leite pasteurizado. Analisando também 20 amostras de leite cru, os autores obtiveram isolamento somente de *L. innocua* em

2,0% das amostras, e da análise de 20 amostras de queijo minas frescal, obtiveram 40,0% de positividade para *Listeria* spp., sendo *L. innocua* 30,0%, *L. monocytogenes* 10,0%, *L. seeligeri* 5,0% e *L. welshimeri* 5,0%.

RORVICK & YNDESTAD (1991), na Noruega, analisaram um total de 90 amostras de queijo macio importado, encontrando 10 amostras (11,0%) positivas para *L. monocytogenes*. Os autores sugeriram que a contaminação possa ter ocorrido principalmente durante o manuseio do produto nos estabelecimentos de venda, já que 7 das 10 amostras positivas foram adquiridas num mesmo estabelecimento.

Amostras ambientais de usinas de leite de Vermont, EUA, foram analisadas por KLAUSNER & DONNELLY (1991), os quais isolaram *L. innocua* em 16,1% das amostras e *L. monocytogenes* em 1,4%.

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

examinadas, somente 1 (1,05%) foi positiva para *L. monocytogenes*; e das 33 amostras de queijo macio, 1 (0,3%) foi positiva para *L. seeligeri*.

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

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

3.6. Efeito das condições ambientais e de processamento sobre *L. monocytogenes* em produtos lácteos

3.6.1. Resistência térmica

L. monocytogenes pode estar presente no leite cru, em suspensão ou dentro dos leucócitos bovinos que são transferidos para o produto, dependendo da maneira predominante pela qual a mesma teve acesso ao leite: por contaminação exógena (do ambiente) ou endógena (animal doente), respectivamente (VAN DENVER, 1988).

A eficácia da pasteurização HTST na eliminação de células de *L. monocytogenes* em leite bovino contaminado, vem sendo questionada desde o relato do surto de listeriose no ano de 1983, em Massachussets, o qual envolveu o consumo de leite pasteurizado integral e com 2% de gordura. Nenhuma falha foi detectada no processo de pasteurização dos produtos, sendo sugerido que a localização intracelular do microrganismo dentro dos leucócitos bovinos, promove uma ação protetora contra o calor durante o processo (FLEMING et al., 1985).

Por outro lado, para alguns pesquisadores como CRAWFORD et al. (1989) e FEDIO & JACKSON (1989), existem 2 possibilidades teóricas para a detecção de *L. monocytogenes* no leite submetido ao processo de pasteurização HTST: a) o leite, antes da pasteurização,

estar contaminado com um nível suficientemente alto do patógeno, que possa possibilitar a sobrevivência de alguns destes ao processo; b) ocorrência de uma pós-contaminação do produto pelo ambiente.

Assim sendo, têm sido desenvolvidos vários trabalhos acerca da resistência térmica de *L. monocytogenes* à pasteurização do leite, porém os dados obtidos a este respeito são controvertidos. Deve ser levado em conta que, nos diversos trabalhos, há uma variação na adoção do tamanho do inóculo, da linhagem do microrganismo, do meio de suspensão e das metodologias de aquecimento e recuperação do microrganismo.

Investigações sobre a resistência térmica da bactéria suspensa na concentração de 10^5 células/ml de leite integral cru, foram realizadas por BRADSHAW et al. (1985), utilizando-se da técnica do tubo selado. Os resultados obtidos revelaram um valor $D_{71,7^{\circ}\text{C}}$ de 0,9 segundos, indicando que *L. monocytogenes* não resiste à pasteurização clássica.

DONNELLY & BRIGGS (1986), pesquisaram a resistência térmica de algumas linhagens de *L. monocytogenes* em leite integral, leite desnatado e em leite com 11% de sólidos não gordurosos. A composição do leite não afetou a resistência térmica do microrganismo, sendo que todas as linhagens usadas neste estudo apresentaram um valor $D_{82,7^{\circ}\text{C}}$ de 1 minuto ou menos,

concluindo que a pasteurização deve eliminar o organismo do leite cru.

BUNNING et al. (1986), estudaram a resistência térmica das células de *L. monocytogenes* localizadas no interior dos fagócitos de camundongos e das células do microrganismo suspensas em leite cru. O valor $D_{71,7^{\circ}\text{C}}$ obtido para as células fagocitadas foi de 1,9 segundos, já para as células suspensas o valor obtido foi de 1,6 segundos, demonstrando que a localização intracelular da bactéria não ofereceu proteção contra a inativação térmica.

BRADSHAW et al. (1987), estudando a resistência térmica da linhagem Scott A em produtos lácteos, observou que o valor $D_{71,7^{\circ}\text{C}}$ em leite integral e leite desnatado, variou de 1,7 a 2,7 segundos. Em mistura para sorvete, o valor $D_{79,4^{\circ}\text{C}}$ observado foi de 2,6 segundos. Em todos os produtos, *L. monocytogenes* estava suspensa numa concentração de 10^5 células/ml.

Comparando as metodologias do tubo selado e do tubo de ensaio para observar a resistência térmica de *L. monocytogenes*, DONNELLY et al. (1987) obtiveram, para o teste do tubo selado, um valor $D_{62^{\circ}\text{C}}$ de 0,1 a 0,4 minutos, com rápida inativação de todas as linhagens utilizadas. Com o método do tubo de ensaio, não foi possível verificar a inativação completa em até 30 minutos na temperatura de 62°C .

DOYLE et al. (1987), utilizaram o leite proveniente de vacas infectadas artificialmente com *L. monocytogenes*, verificando que quando o microrganismo encontrava-se intracelularmente, o mesmo pôde sobreviver à 71,7°C durante 15 segundos.

BUNNING et al. (1988), verificaram que a localização intracelular das células de *L. monocytogenes* em fagócitos bovinos não ofereceu proteção ao microrganismo contra a pasteurização, porém tendo em vista sua resistência térmica, os autores sugeriram que possa haver sobrevivência à pasteurização HTST, se o inóculo for grande.

SUAREZ-FERNANDEZ et al. (1989), utilizaram-se de um pasteurizador de uma planta piloto para estudar a resistência térmica de *L. monocytogenes*, verificando que desde que o inóculo não seja superior a 10^5 UFC/ml, a pasteurização pode ser considerada eficiente na destruição do microrganismo, concordando com considerações de FEDIO & JACKSON (1989).

LOVETT et al. (1990), avaliaram a capacidade de inativação de *L. monocytogenes* Scott A de um equipamento de pasteurização comercial operado a 72-73°C/15-16 segundos. *L. monocytogenes* foi testada no leite cru, livremente suspensa (10^5 UFC/ml), internalizada nos fagócitos bovinos "in vitro" (10^3 a 10^5 UFC/ml), e internalizada nos fagócitos bovinos "in vivo" ($1,4 \times 10^3$ a

9,5 x 10³ UFC/ml); sendo utilizados 3 diferentes procedimentos para detectar o microrganismo após o tratamento térmico. Os pesquisadores não detectaram células viáveis de *L. monocytogenes* Scott A, em nenhuma das amostras analisadas nas 3 situações em que as células se encontravam.

BRADSHAW et al. (1991), obtiveram um valor D_{71,7°C} de 2,0 segundos, para células de *L. monocytogenes* Scott A em leite cru, sendo que os autores consideraram que sua presença em leite pasteurizado se deva a falhas no processo de pasteurização ou à uma contaminação pós-pasteurização.

MEYER & DONNELLY (1992), observaram que as células injuriadas de *L. monocytogenes* que sobreviveram a um tratamento térmico a 55°C por 20 minutos, são capazes de se recuperar tanto em leite integral como em leite com 2% de gordura, sendo que a taxa de recuperação aumentou exponencialmente quando a temperatura de incubação foi aumentada de 4 para 37°C. Este aspecto é de grande importância tendo em vista as condições de tempo e temperatura sob as quais vários produtos são produzidos e distribuídos. Os autores consideraram ainda que, nenhuma das técnicas atuais de detecção de *Listeria*, são adequadas para a detecção de organismos injuriados.

Contudo, avanços recentes sobre o assunto registram alguns fatores que podem influenciar a

termorresistência das células, e talvez ajudem a explicar algumas discrepâncias da literatura. O primeiro fator, descrito por alguns pesquisadores como FEDIO & JACKSON (1989) e por KNABEL et al. (1990), se refere ao fenômeno chamado de resposta ao choque térmico, onde as células de *L. monocytogenes* que foram expostas à temperaturas subletais por um curto período de tempo, demonstraram um sensível aumento na resistência ao calor. Outro fator importante, foi descrito por KNABEL et al. (1990), onde os autores verificaram que as células de *L. monocytogenes* que cresceram a 43°C, foram mais termotolerantes quando comparadas àquelas que sofreram um choque térmico ou àquelas que cresceram à temperaturas mais baixas do que 43°C. Finalmente, estes mesmos autores verificaram que números sensivelmente maiores de células de *L. monocytogenes* injuriadas pelo calor, podem ser recuperados através de procedimentos de recuperação estritamente anaeróbios do que pelos procedimentos aeróbios convencionais. Acreditou-se que a sensibilidade das células estressadas de *L. monocytogenes* ao oxigênio, se deva à inativação das enzimas catalase e superóxido dismutase durante o aquecimento.

Cabe destacar, que a respeito da inativação térmica de *L. monocytogenes*, a Organização Mundial da Saúde considerou a pasteurização um processo seguro para a diminuição do nível de listérias presentes no leite (WHO,

1988). A Food and Drug Administration (FDA), recomenda aquecimento do leite ou produtos lácteos a 71,7°C por pelo menos 15 segundos. Se o conteúdo de gordura do produto for de mais de 10%, a temperatura deve ser elevada em 2,9°C (BRADSHAW et al., 1987).

3.6.2. Sobrevivência

Tendo em vista que, *L. monocytogenes* apresenta notável capacidade de sobrevivência e muitas vezes crescimento sob condições adversas, podem ser citados alguns trabalhos sobre seu comportamento em condições de produção e armazenamento de produtos lácteos.

O processo de "spray drying" aplicado ao leite desnatado, permitiu a sobrevivência de *L. monocytogenes* e sua persistência no produto por um período de 12 semanas a temperatura ambiente. Foi observado que a carga inicial do patógeno (cerca de 10^5 a 10^6 UFC/g do alimento) no alimento sofreu uma redução não só durante o processo (cerca de 1,0 a 1,5 log₁₀), mas ao longo de um período de armazenamento de 16 semanas a 25°C (DOYLE et al., 1985).

Com relação aos queijos, PAPAGEORGIOU & MARTH (1989b), consideram que *L. monocytogenes* comporta-se diferentemente nos vários tipos do produto, sendo que seu comportamento varia desde a inibição, a sobrevivência e, ao

crescimento, dependendo principalmente das condições durante a manufatura, amadurecimento e estocagem do queijo, como condições de temperatura na manufatura, composição do queijo, temperaturas de amadurecimento e armazenamento, culturas lácticas "starters", pH do queijo, linhagens patogênicas envolvidas, população inicial de listérias no leite, e possivelmente outros fatores ainda desconhecidos.

RYSER et al. (1985), estudando o comportamento de *L. monocytogenes* durante a manufatura do queijo Cottage, observaram uma variação nos números do microrganismo. Até o momento do cozimento da massa, o número do microrganismo permaneceu inalterado, apresentando posteriormente, um decréscimo a níveis não detectáveis pela metodologia, sendo que após 8 semanas de estocagem a 3°C, houve positividade em 52,7% das amostras analisadas.

DOMINGUEZ-RODRIGUEZ et al. (1987), relataram a sobrevivência de *L. monocytogenes* a manufatura de um queijo semi-duro similar ao queijo tipo Manchego, sendo que ao final de 60 dias de maturação, as contagens foram muito similares à concentração inicial no leite. Foi verificada também, uma contagem maior na coalhada do que no sêro, que pode ser explicada pelo fato de o microrganismo poder estar ligado à caseína, e assim concentrar-se na coalhada.

Com relação ao queijo Cheddar, RYSER & MARTH (1987a), observaram que o número de *L. monocytogenes*

permaneceu constante durante o processamento, porém sofreu um aumento durante as fases de prensagem e maturação. O período de sobrevivência variou de acordo com a linhagem, sendo de 154 até 434 dias.

Por outro lado, no queijo Camembert, RYSER & MARTH (1987b), observaram uma elevação no número de *L. monocytogenes* logo após as 24 horas de processamento, com subsequente queda ao longo de 18 dias de maturação. O número máximo da bactéria foi atingido aos 65 dias de maturação, coincidindo com um aumento no pH do produto.

YOUSEF & MARTH (1988a), verificaram que após a fabricação do queijo Colby, o número de *L. monocytogenes* permaneceu constante durante algumas semanas, com um decréscimo quase linear durante a estocagem do produto, sendo que uma maior sobrevivência esteve associada aos queijos com maior teor de umidade.

PAPAGEORGIOU & MARTH (1989b), estudaram o comportamento de 2 linhagens de *L. monocytogenes*, Scott A e CA, durante a manufatura do queijo azul. Houve um aumento nos números de *L. monocytogenes* durante as primeiras 24 horas de processamento, sendo que o crescimento cessou quando o pH do coalho caiu para 4,85. As populações de ambas as linhagens diminuíram significativamente durante os primeiros 50 dias de amadurecimento, aparentemente pela presença de *Penicillium roqueforti* que promoveu intensa proteólise e lipólise, com posterior produção de ácidos

graxos livres. A elevação do pH, durante 50 a 120 dias, permitiu a sobrevivência de *L. monocytogenes*, porém sem multiplicação.

KOVINCIC et al. (1991), relataram a sobrevivência de *L. monocytogenes* após um período de 90 dias de maturação do queijo semi-duro Trappist.

GENIGEORGES et al. (1991), estudaram o crescimento e a sobrevivência de 4 linhagens de *L. monocytogenes* em 49 amostras de 24 tipos de queijo, incubados a 4,8 e 30°C por cerca de 36 dias. Dos queijos testados, 36,7% suportaram crescimento em pelo menos uma das temperaturas testadas, incluindo queijo macio tipo espanhol, Ricota, Teleme, Brie, Camembert, e Cottage. Os queijos que não suportaram crescimento e causaram morte gradual do patógeno em todas as temperaturas foram, Cotija, Azul, Tillamook, Cracker Barrel, Muenster, Feta, Kasseri e Limburger.

BUAZZI et al. (1992), verificaram que durante as etapas da manufatura do queijo Suíço, as populações de *L. monocytogenes* linhagens Califórnia, Ohio e V7, oscilaram entre aumentos e decréscimos, conforme as condições do momento. Já na etapa de amadurecimento, após 80, 77 ou 66 dias, não foi possível a detecção do patógeno, sendo que os autores consideraram que a maturação deste queijo por 60 dias, permite que o produto esteja livre de *L.*

monocytogenes, se a contaminação inicial for baixa no leite (menor ou igual a 10^2 UFC/ml).

3.6.3. Outros efeitos

A literatura relata que a taxa de crescimento de *L. monocytogenes* aumenta com a adição de ingredientes como o açúcar, cacau e carragenina ao leite. Isto talvez possa ser explicado pelo fato do cacau adicionar ao meio aminoácidos essenciais, peptídeos, carboidratos, gorduras e outros fatores de crescimento; assim como o açúcar que contribui com a sacarose; e a carragenina que atua como um substrato para o crescimento do microrganismo, tornando o meio mais viscoso (ROSENOW & MARTH, 1987a; PEARSON & MARTH, 1990).

GEORGE et al. (1988), realizaram um estudo onde foram observados os efeitos do pH e da temperatura sobre o crescimento de várias linhagens de *L. monocytogenes*, em meio de cultura. Os autores verificaram que sob temperaturas de refrigeração (4°C), torna-se necessário um pH igual a 5,23 para que haja crescimento; por outro lado em temperaturas mais elevadas ($20 - 30^{\circ}\text{C}$), pode ser verificado crescimento mesmo a pH de 4,39.

PAPAGEORGIOU & MARTH (1989a), observaram que o tempo de geração de *L. monocytogenes* é maior a 4°C do que a 22°C , quando em presença de 6% de cloreto de sódio. Em

leite desnatado e sêro desproteínizado contendo 12% de cloreto de sódio, ocorre inativação em até 130 dias a 4°C.

BAYLEY et al. (1990b), verificaram que quando o número de células viáveis (1 a 4) e de células injuriadas pelo calor (200 a 1100) de *L. monocytogenes* Scott A era baixo, valores de pH abaixo de 5,5 não possibilitaram nenhuma recuperação do microrganismo.

Estudando os efeitos do pH, da concentração de sal e da temperatura sobre a sobrevivência e crescimento de *L. monocytogenes* em meio de cultura, COLE et al. (1990) observaram que a sobrevivência do microrganismo a baixos valores de pH e concentrações salinas, foi fortemente dependente da temperatura. Os valores mínimos de pH que permitiram sobrevivência de um inóculo inicial de 10^4 células, após 4 semanas, foram 4,66 a 30°C, 4,36 a 10°C e 4,12 a 5°C. Estes limites foram dependentes da concentração salina, sendo que baixas concentrações de sal (4 - 6%) aumentaram a sobrevivência e altas concentrações de sal reduziram a sobrevivência a valores de pH limitantes. As bases fisiológicas deste efeito protetor da baixa concentração salina a valores de pH baixos, são desconhecidas.

De acordo com estudos realizados, combinações de agentes anti-fúngicos e acidificantes reduzem as taxas de sobrevivência de *L. monocytogenes*. Observou-se que em queijos contendo sorbato de potássio e ácido acético, houve

um grande decréscimo na população do patógeno, seguido pela acidificação com ácidos láctico e acético e finalmente, pela acidificação somente com ácido láctico. Os efeitos do uso do propionato de sódio foram semelhantes, exceto que a combinação com os ácidos láctico mais acético, foi mais efetiva do que com o ácido acético somente. Os resultados também mostraram que o patógeno aparentemente não cresce em queijo acidificado a pH 5,5 a 5,1, ou em queijo não-acidificado com pH 5,3 a 5,4 (ANTIFUNGAL, 1987).

SORRELS et al. (1989), estudaram o efeito bactericida de alguns ácidos utilizados na acidificação do caldo tripticaseína de soja, a diferentes valores de pH e períodos de tempo e temperaturas de incubação. Baseando-se em valores equivalentes de pH, a ordem para o efeito bactericida foi: ácido acético > ácido láctico > ácido cítrico $\geq$ ácido málico > ácido hipoclorídrico, em todos os períodos e temperaturas de incubação. A maior atividade antimicrobiana foi observada a 35°C, a maior sobrevivência foi a 10°C e, o maior crescimento foi a 25°C.

AHAMAD & MARTH (1989), observaram que o grau de inibição do crescimento de *L. monocytogenes* pelos ácidos acético, cítrico e láctico, aumenta de acordo com a diminuição da temperatura.

ASPERGER et al. (1989), observaram que as concentrações mínimas inibitórias do crescimento do microrganismo, para o ácido propiônico a pH 5,6 foi 0,15%,

para o ácido acético a pH 5,0 foi 0,23%, e para o ácido láctico a pH 5,0 foi 0,3%. As concentrações mínimas bactericidas observadas foram, 0,65% a pH 3,98 para o ácido láctico, 1% a pH 3,9 para o ácido acético e 1,1% a pH 4,15 para o ácido propiônico.

Terc-butil-hidroquinonas (TBHQ) e propilparaben são significativamente mais efetivos na inibição de *L. monocytogenes* do que sorbato de potássio, quando em pH básico e a 35°C, conforme observaram PAYNE et al. (1989).

EL-SHENAWY & MARTH (1992), observaram que o caldo triptosado contendo 0,05 ou 0,15% de propionato de sódio, apresentou crescimento de *L. monocytogenes* a 13 e 35°C quando o pH foi ajustado para 5,6 com ácido acético, tartárico, láctico ou cítrico, embora no caso dos dois últimos, a fase lag tenha sido prolongada, assim como houve aumento na concentração de propionato. Quando o pH do caldo foi ajustado para 5,0 com os ácidos acético e tartárico, o patógeno foi inibido ou inativado por 0,15 ou 0,3% de propionato. A concentração de 0,3% de propionato em presença de pH de 5,6 obtido com os ácidos acético e tartárico, inibiu o crescimento do patógeno, por outro lado, para os ácidos láctico ou cítrico, a inibição foi ocasional.

SCHAACK & MARTH (1988a), analisando o comportamento de *L. monocytogenes* em presença das bactérias lácticas, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus*

bulgaricus, inoculados em leite desnatado e em mistura para iogurte, observaram que a inoculação conjunta de ambas as bactérias lácticas, promoveu maior inibição do patógeno do que somente *S. thermophilus*, porém menor inibição do que somente *L. bulgaricus*. A inibição de *L. monocytogenes* mostrou-se diretamente proporcional às linhagens das culturas lácticas, ao tamanho do inóculo e à temperatura de incubação (a 42°C maior do que a 37°C). Observou-se ainda, a morte de *L. monocytogenes*, quando o pH caiu para 4,0.

Em outro estudo, SCHAACK & MARTH (1988c) relataram a sobrevivência de *L. monocytogenes* por 2 a 13 semanas, em presença de *Streptococcus lactis*, sendo que a sobrevivência foi dependente da temperatura de incubação e do tamanho do inóculo. A presença de *Streptococcus cremoris*, permitiu a sobrevivência do patógeno por um período de 4 a 13 semanas. Por outro lado, *L. bulgaricus* exibiu marcada ação inibidora sobre o patógeno, o qual sobreviveu de 3 dias a 1 semana, sob refrigeração.

Os mesmos autores (SCHAACK & MARTH, 1988b), verificaram crescimento de *L. monocytogenes* em presença de *S. lactis* e *S. cremoris*, porém o patógeno foi sensivelmente e/ou completamente inibido em valores de pH abaixo de 4,75. Possivelmente, a produção pelas bactérias de peróxido de hidrogênio, compostos voláteis e antibióticos, promova ação conjunta com a concentração de hidrogênio, na inibição de *L. monocytogenes*.

CARMINATI et al. (1989), testaram 7 linhagens de *Streptococcus lactis* com relação à inibição de 6 linhagens de *L. monocytogenes*. Os resultados obtidos sugeriram que todas as substâncias inibidoras produzidas pelas linhagens testadas de *S. lactis*, parecem ser bacteriocinas, demonstrando modo de ação bactericida sobre o patógeno sem lise celular.

ASPERGER et al. (1989), observaram forte atividade bactericida de *Streptococcus faecium* E1 contra 98% das linhagens de *Listeria* testadas. As substâncias inibidoras de *Streptococcus lactis* 1881, *Pediococcus pentosaceus* e *Streptococcus thermophilus* foram significativamente menos ativas.

CRAWFORD et al. (1989), consideram que a variabilidade da flora natural do leite, pode interferir com o crescimento e recuperação de *L. monocytogenes*, tendo observado que *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus lactis* inibem o crescimento do patógeno, mas por outro lado, *Pseudomonas* spp. estimulam seu crescimento, muito provavelmente devido à sua atividade proteolítica.

FARRAG & MARTH (1989), trabalhando com 3 linhagens de *L. monocytogenes* em combinação com *Pseudomonas fluorescens*, inoculadas em leite desnatado, verificaram que o crescimento do patógeno foi modestamente aumentado após 7 dias de incubação a 7°C, mas não a 13°C. A partir de 14 dias e até o período final de incubação (56 dias), foi

observada discreta inativação de *L. monocytogenes* por *P. fluorescens*.

TRAN et al. (1990), verificaram que *Listeria* spp. foram inibidas por algumas espécies de *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Pediococcus*, e estimuladas por *Pseudomonas* spp.

O comportamento de *L. monocytogenes* frente a ação da nisina, foi estudado por BENKERROUM & SANDINE (1988). Utilizando-se do ágar tripticaseína de soja, os autores verificaram que o patógeno é sensível à nisina em concentrações que variaram de 740 a 10^5 UI/ml, e 1,85 a 10^3 UI/ml quando o meio utilizado foi o ágar MRS.

ASPERGER et al. (1989), verificaram que a concentração mínima inibitória de nisina contra *Listeria* foi de 400 a 800 UI/ml, e a concentração mínima bactericida foi de 600 a 1000 UI/ml, inativando cerca de 10^6 células/ml dentro de 24 horas.

A lactoferrina bovina pode ter influência sobre *L. monocytogenes*, dependendo da concentração e do seu grau de saturação de ferro, conforme foi observado por PAYNE et al. (1990). Verifica-se um efeito bacteriostático da lactoferrina sobre o patógeno, quando há uma diminuição no grau de saturação de ferro, sendo eficiente a baixas concentrações.

WAKABAYASHI et al. (1992), relatam que o mecanismo de ação da lactoferrina contra *L. monocytogenes*

ainda é desconhecido, mas a consideram como um importante agente antimicrobiano bastante útil no controle do crescimento e sobrevivência deste patógeno. Os autores observaram completa inibição de 4 linhagens de *L. monocytogenes* a baixas concentrações de lactoferrina, as quais variaram de 0,3 a 9 µg/ml, dependendo da linhagem e do meio de cultura usado.

DOMINGUEZ-RODRIGUEZ et al. (1987), verificaram que *L. monocytogenes* é pouco suceptível às concentrações de peróxido de hidrogênio que normalmente são utilizadas para a preservação do leite, sendo que seu efeito bactericida é maior em temperaturas elevadas.

Baseando-se em estudos de monitoramento de plantas de laticínios, para a contaminação pós-pasteurização por *L. monocytogenes*, a FDA (Food and Drug Administration) considera sanificantes à base de cloro a 100 ppm, ácidos aniônicos a 200 ppm, compostos quaternários de amônia a 100 ppm e iodóforos a 25 ppm, recomendados para o controle de *Listeria* spp. (FDA'S, 1987).

KNIGHT et al. (1988), testaram 25 réplicas de sanificantes comercialmente disponíveis, contra *L. monocytogenes*, nas concentrações de 10, 50 e 100 ppm. Os compostos fenólicos inibiram o crescimento da bactéria nas 3 concentrações. Resultados positivos foram ocasionais a 10 ppm de solução de cloro, de solução de iodo e de compostos quaternários de amônia, sendo que a 50 e 100 ppm, não foi

obtida nenhuma positividade. Os resultados obtidos corroboram com as recomendações da FDA.

KRYSINSKI et al. (1992), avaliaram a habilidade de uma grande variedade de compostos limpadores e sanificantes na remoção e/ou inativação de *L. monocytogenes* aderida a superfícies. A resistência das células aderidas, tanto aos limpadores como aos sanificantes, foi dependente da natureza da superfície, sendo maior sobre poliéster/poliuretano, seguida por poliéster e finalmente por aço inoxidável. A completa remoção e/ou inativação, foi obtida em muitos casos onde a sanificação foi precedida pelo uso dos limpadores.

Estudando os efeitos da radiação ultra violeta sobre *L. monocytogenes* inoculada em ágar triptose, YOUSEF & MARTH (1988b) observaram que as ondas longas não tiveram ação sobre o patógeno, já as ondas curtas causaram uma diminuição nos números. A taxa de inativação das células foi diretamente proporcional a intensidade das ondas curtas, sendo que as células liofilizadas foram mais resistentes que as não liofilizadas.

HASHISAKA et al. (1989), verificaram que a radiação gama foi efetiva contra *L. monocytogenes* a um nível de 16,8 KGy em queijo mozzarella e 24,4 KGy em sorvete.

Os tratamentos químicos ou físicos usados no processamento de alimentos têm como uma de suas finalidades, a eliminação dos microrganismos. Porém,

segundo WARBURTON et al. (1992), certos tratamentos quando aplicados a níveis subletais, podem produzir várias injúrias estruturais e fisiológicas nos microrganismos não esporulados. As injúrias metabólicas, muitas vezes, resultam em inabilidade de recuperação e formação de colônias visíveis nos meios seletivos que devem suportar o crescimento destes microrganismos, conseqüentemente podem escapar à detecção, oferecendo risco à saúde humana devido à possibilidade de recuperação subsequente das células injuriadas, durante o armazenamento do alimento.

3.7. Metodologias laboratoriais para detecção e identificação de *L. monocytogenes*

As metodologias para o isolamento de *L. monocytogenes* estão frequentemente em estado de aperfeiçoamento (HITCHINS & TRAN, 1990), tendo em vista os esforços de vários pesquisadores em aumentar as chances de recuperação da bactéria nos diversos alimentos e os resultados variados obtidos nos diferentes trabalhos realizados.

Os esforços para o isolamento de *L. monocytogenes* dos alimentos pelo plaqueamento direto não têm tido sucesso, particularmente no que se refere a alimentos com grandes populações de microflora competitiva (BAYLEY et al., 1990). Porém, GOLDEN et al. (1988b)

consideram que o plaqueamento direto possa ser utilizado para recuperar células injuriadas ou não de *L. monocytogenes*, a partir de alimentos que contenham baixas populações da microflora do alimento. De qualquer forma, a maioria dos meios de isolamento que têm sido desenvolvidos para a recuperação do patógeno, envolvem a combinação com um prévio procedimento de enriquecimento.

Entre os primeiros métodos usados para a recuperação de *L. monocytogenes* de amostras ambientais e de alimentos, está o chamado "enriquecimento a temperatura baixa (4°C)" (GRAY & KILLINGER, 1966), o qual explora a natureza psicrotrófica da bactéria, inoculada em caldo nutriente. Apesar de eficiente, este procedimento tem a desvantagem de requerer um período de incubação prolongado (podendo chegar a 3 meses), não sendo adequado para situações onde se necessita de resultados rápidos, como investigações epidemiológicas de surtos, análise de alimentos suspeitos, e monitoramento de rotina de alimentos perescíveis e não-perescíveis (SWAMINATHAN et al., 1988).

Mais recentemente, a incorporação de agentes seletivos aos meios de enriquecimento, os quais devem inibir o crescimento de outros microrganismos que não a listéria, mostrou-se vantajosa em relação ao enriquecimento a temperaturas baixas, já que o período de enriquecimento pode ser reduzido a poucos dias e a temperatura de incubação pode ser a ótima de crescimento do microrganismo.

Contudo, mesmo o enriquecimento seletivo não está livre de limitações, já que é possível que os agentes seletivos presentes no meio de enriquecimento venham a promover alguma atividade inibitória contra *L. monocytogenes*, especialmente se o organismo estiver estressado (LOVETT, 1988a; GOLDEN et al., 1988b; CASSIDAY & BRACKETT, 1989).

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

MCCLAIN & LEE (1988), descreveram um método indicado para o isolamento de *L. monocytogenes* a partir de produtos cárneos, o qual ficou conhecido como método do USDA - FSIS (United States Department of Agriculture - Food

Safety and Inspection Service). São utilizados dois caldos de enriquecimento, primário (LEB 1) e secundário (LEB 2) contendo ácido nalidíxico e acriflavina, e plaqueamento em LPM. Em 1989, MCCLAIN & LEE revisaram o método, sendo que o caldo de enriquecimento secundário passou a ser o caldo Fraser (FRASER & SPERBER, 1988), o qual é uma modificação do caldo original do USDA pela adição de citrato férrico e cloreto de lítio; e o plaqueamento feito em meio OXFORD modificado, originalmente descrito por CURTIS et al. (1989), que contém como agentes seletivos cloreto de lítio, colistina e moxalactam.

Outros procedimentos de enriquecimento têm sido usados como, o caldo de enriquecimento para *Listeria* da Merck (MERCK, 1982), o caldo de enriquecimento para *Listeria* (LEB) de DONNELLY & BAIGENT (1986), contendo ácido nalidíxico e acriflavina como agentes seletivos, o caldo triptose adicionado de 2% de citrato de sódio, utilizado por YOUSEF et al. (1988) para a análise de amostras de queijo; o caldo de enriquecimento L-PALCAMY contendo os agentes seletivos polimixina B, cloreto de lítio, acriflavina e moxalactam (ou ceftazidima ou latamoxef) (LUND et al., 1991). Da mesma forma, a literatura relata o desenvolvimento de vários outros meios sólidos para a recuperação de *L. monocytogenes* dos alimentos, além dos já citados nas metodologias da FDA e USDA-FSIS. Tais formulações incluem o ágar Vogel Johnson modificado (MVJ),

contendo como agentes seletivos ácido nalidíxico, bacitracina, moxalactam e telurito de potássio, e o ágar McBride modificado - ARS (ARS-MMA), contendo feniletanol, cloreto de lítio, anidrido glicínico, cicloheximida, ácido nalidíxico, moxalactam e bacitracina, ambos os meios desenvolvidos por BUCHANAN et al. (1987); o ágar RAPAMY, contendo ácido nalidíxico e acriflavina como agentes seletivos, e o ágar PALCAM, contendo polimixina B, acriflavina, cloreto de lítio e moxalactam (ou ceftazidima ou latamoxef), desenvolvidos por VAN NETTEN et al. (1988b); o ágar ALPAMY, o qual é uma modificação do ágar RAPAMY pela retirada do ácido nalidíxico e adição de cloreto de lítio (VAN NETTEN et al., 1988a).

A identificação dos isolados é realizada através do exame da morfologia colonial e celular, coloração da colônia de acordo com o meio de isolamento, coloração de Gram, motilidade celular, produção de indol, H₂S, urease, catalase, e ácidos a partir de glicose, lactose e sacarose; redução de nitrato; fermentação de xilose, ramnose e manitol; e produção de hemolisina (LOVETT, 1987), sendo que os resultados obtidos são comparados às características clássicas do microrganismo, descritas por SEELIGER & JONES (1986).

Tendo em vista que os métodos culturais desenvolvidos são considerados lentos e de resultados variáveis pela maioria dos pesquisadores, métodos rápidos

têm sido desenvolvidos para a detecção de *L. monocytogenes* dos alimentos, podendo ser citados, o método da citometria de fluxo (DONNELLY & BAIGENT, 1986; DONNELLY et al.; 1988), a técnica do ensaio imunoenzimático (ELISA) (MATTINGLY et al., 1988; OLADEPO et al. 1992), a hibridização de DNA (DATTA et al.; 1988; KLINGER & JOHNSON, 1988) e a eletroforese (BIBB et al, 1989).

A despeito dos testes bioquímicos clássicos para a identificação de *L. monocytogenes*, têm sido descritos sistemas de identificação rápida como o cartão de identificação de Gram positivos Vitek, Mast ID, Micro ID, API 50 CH, API 20 STREP, API-Zym (FARBER, 1991).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

- Amostras
 - leite bovino cru (1000 ml) embalado por 6 diferentes produtores cooperados;
 - leite bovino pasteurizado tipo C (1000 ml) produzido por 6 diferentes laticínios;
 - queijo minas frescal (500 g) produzido por 6 diferentes laticínios.
- Meios de cultura
 - caldo de enriquecimento (EB), formulado segundo LOVETT & HITCHINS (1988);
 - ágar McBride modificado (MMA), formulado segundo LOVETT & HITCHINS (1988);
 - ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LPM), formulado segundo LOVETT & HITCHINS (1988);

- ágar tripticaseína de soja adicionado de 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE);
 - caldo tripticaseína de soja adicionado de 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE);
 - meio sultifo-indol-motilidade (SIM);
 - caldo básico de púrpura de bromocresol, adicionado de 1,5% de ágar, 0,5% de xilose, 0,5% de ramnose e 0,5% de manitol;
 - ágar sangue, adicionado de 5% de sangue desfibrinado de cavalo e 5% de sangue desfibrinado de carneiro;
 - caldo MR-VP;
 - ágar tríplice açúcar ferro (TSIA);
 - ágar uréia de Christensen;
 - meio semi-sólido de nitrato.
-
- Soluções:
 - solução a 0,5% de acriflavina;
 - solução a 0,5% de ácido nalidíxico;
 - solução a 1,0% de cicloheximida em solução 40% de etanol;
 - solução a 1,0% de moxalactam;
 - solução de cristal violeta para Gram;
 - solução a 20% de lugol;
 - solução de safranina para Gram;
 - solução de peróxido de hidrogênio 1,0 e 10%;

- reativo de Kovac;
- solução a 5% de alfa-naftol;
- reagentes A (ácido sufanílico em solução 5N de ácido acético) e B (solução de α -naftilamina) para redução de nitrato.

- Equipamentos:
 - balança MICRONAL B600;
 - estufa incubadora FANEM mod. 002;
 - microscópio BAUSCH & LOMB;
 - lupa SPENCER;
 - iluminador FISHER SCIENTIFIC;
 - espelho de microscópio ZEISS adaptado a um tripé para observação de colônias por iluminação transmitida.

- Outros:
 - equipamentos e vidrarias de uso corrente em microbiologia;
 - cultura padrão de *L. monocytogenes* proveniente do Helth Protection Branch - Canadá;
 - cultura de *Staphylococcus aureus* β -hemolítico;
 - cultura de *Rhodococcus equi*

4.2. Método

4.2.1. Amostragem

Durante um período de 4 meses (9 de março a 25 de junho de 1992) foram realizadas 6 coletas de amostras, totalizando 20 amostras de leite cru, 20 de leite pasteurizado tipo C e 20 de queijo minas frescal, comercializados em Piracicaba. Inicialmente foi coletada uma amostra de cada produto, como ensaio preliminar.

As amostras de leite cru provenientes de 6 produtores diferentes foram adquiridas junto à Cooperativa local em sacos plásticos de 1.000 ml, embaladas pelo próprio produtor.

As amostras de queijo minas frescal de 5 marcas comerciais diferentes e as amostras do mesmo produto, sem marca comercial e registro no S.I.F., bem como as amostras de leite pasteurizado tipo C de 6 marcas comerciais diferentes, foram coletadas em suas embalagens originais. As amostras dos referidos produtos foram adquiridas em estabelecimentos comerciais de pequeno, médio e grande portes.

Procurou-se adotar um padrão exequível tanto para o número e marcas comerciais das amostras analisadas, como para o número, categorias de estabelecimentos e produtores amostrados. Dessa forma, as amostras dos

produtos em questão foram coletadas e analisadas com 3 a 4 repetições ao longo do período de análises.

Todas as amostras, ao serem adquiridas, foram acondicionadas em recipientes isotérmicos com gelo picado e transportadas ao laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, iniciando-se as análises dentro de um período de 2 horas.

4.2.2. Detecção, isolamento e identificação

Para a detecção, isolamento e identificação de *Listeria monocytogenes* foi utilizada a metodologia sugerida pela "Food and Drug Administration" (FDA), desenvolvida basicamente para produtos lácteos, descrita na 6ª edição (supl. 9/87) do Bacteriological Analytical Manual por LOVETT e posteriormente revisada por LOVETT & HITCHINS (1988).

Aliquotas de 25 g ou 25 ml das amostras de leite bovino cru e pasteurizado tipo C e de queijo minas frescal, foram adicionadas a 225 ml do caldo de enriquecimento (EB), com incubação a 30°C. Às 24 horas e às 48 horas de incubação do EB, foram feitas estrias nos meios seletivos ágar McBride modificado (MMA) e ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LPM), sendo as placas dos respectivos meios incubadas a 30°C por um período de 48 horas. Após o período de incubação, as placas de MMA e LPM

foram observadas para a presença de colônias típicas de *Listeria* spp., sob luz transmitida num ângulo de 45° conforme adaptação do esquema descrito por MCCLAIN & LEE (1988). As colônias de *Listeria* spp. sobre MMA devem apresentar-se verde azuladas e sobre LPM verde azuladas ou brancas.

Colônias suspeitas de serem do gênero *Listeria* foram selecionadas em número de 5, entre as placas de MMA e LPM, e purificadas em ágar tripticaseína de soja com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE), com posterior incubação a 30°C por 24 a 48 horas.

Após a incubação das placas de TSA-YE, as mesmas foram observadas sob luz transmitida num ângulo de 45°C, para a presença de colônias verde azuladas, características do gênero *Listeria* sobre o meio TSA-YE. As colônias características de *Listeria*, foram submetidas aos testes de identificação referentes à: motilidade em tombamento em gota pendente; crescimento em forma de "guarda-chuva" em meio semi-sólido sulfito-indol-motilidade (SIM); morfologia e coloração de Gram; produção de catalase; produção de urease; produção de indol; produção de H₂S; produção de ácidos a partir da glicose, lactose e sacarose em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI); produção de hemolisina em ágar sangue de cavalo; redução de nitrato; fermentação de xilose, ramnose e manitol em meio básico de

púrpura de bromocresol; e teste da hemólise sinérgica do fator CAMP em ágar sangue de carneiro.

Os isolados obtidos a partir dos testes de identificação foram enviados à Fundação Instituto Oswaldo Cruz para caracterização sorológica.

A Figura 2 mostra um fluxograma dos passos realizados para detecção, isolamento e identificação de *L. monocytogenes* de acordo LOVETT & HITCHINS, 1988.

Figura 2. Detecção, isolamento e identificação de *L. monocytogenes* (LOVETT & HITCHINS, 1988).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após as análises das amostras de leite cru e pasteurizado e de queijo minas frescal, ao longo do período de análises, segundo o método adotado, não foi detectada a presença de *L. monocytogenes* em nenhuma das amostras das 3 categorias de produtos lácteos, de diferentes procedências e marcas comerciais. Da mesma forma, não foi detectada a presença de nenhuma outra espécie de *Listeria* nas amostras analisadas com o método em questão.

No que se refere às análises das amostras de leite cru e de queijo minas frescal, foi possível observar que as placas de ágar McBride modificado (MMA), de um modo geral, na maioria das vezes, apresentaram um crescimento intenso de colônias de colorações variadas (verde azuladas, levemente azuladas com brilho furta-cor, cremes, brancas), quase sempre numa mesma placa, sendo que muitas vezes, não foi observado crescimento de colônias verde azuladas sobre este meio.

As colônias verde azuladas, obtidas a partir das amostras de leite cru e queijo minas frescal, sobre o meio MMA, ao longo do período de análises, não foram

confirmadas como *Listeria* spp. através da realização de testes de identificação a nível de gênero, envolvendo: motilidade em tombamento em gota pendente, morfologia e coloração de Gram, produção de indol, produção de H₂S, crescimento em forma de "guarda-chuva" em ágar semi-sólido SIM, produção de catalase, produção de urease, produção de ácidos em TSI. O ocorrido reflete a facilidade de se selecionar colônias suspeitas negativas para *Listeria* spp., sobre o MMA. DESTRO (1990), observou um baixo índice de correlação entre as colônias suspeitas testadas e as colônias confirmadas como *Listeria* spp., obtidas a partir de MMA.

Por outro lado, as placas do ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LPM) apresentaram-se em sua maioria, com crescimento variável, de intenso a nulo, de colônias brancas ou verde azuladas tendendo a brancas e, em menor escala, obteve-se algumas placas com crescimento variável de colônias de coloração amarelada. De acordo com MCCLAIN & LEE (1988), as colônias suspeitas de serem *Listeria* spp., sob luz transmitida, aparecem sobre LPM com tonalidade branca, e todas as colônias muito pequenas tendem a ser verde azuladas; as colônias que não são suspeitas de serem *Listeria* spp., tendem a ser amareladas ou alaranjadas. Porém, as colônias brancas ou verde-azuladas, suspeitas de pertencerem ao gênero *Listeria* spp.,

quando submetidas aos testes de identificação anteriormente citados, não foram confirmadas como tal.

Com relação às análises das amostras de leite pasteurizado tipo C, as placas de MMA apresentaram-se, de um modo geral, com crescimento variável, de intenso a incipiente, em termos de número de colônias de colorações creme, verde azulada, branca e levemente azulada com brilho furta-cor. Muitas vezes, foram observados até 3 tipos diferentes de colônias numa mesma placa, no que se refere ao aspecto coloração. Porém, quando o crescimento de colônias sobre MMA foi intenso, o mesmo foi sempre sensivelmente menor quando comparado ao crescimento obtido nas placas de MMA referente às análises de leite cru e queijo minas frescal. Provavelmente, este fato se deva à pasteurização, que é capaz de diminuir sensivelmente a carga microbiana do produto.

As placas de LPM, no caso das análises das amostras de leite pasteurizado tipo C, apresentaram um padrão de crescimento bastante distinto, tanto das placas de MMA referentes às mesmas amostras do produto, como das placas de LPM referentes às análises do leite cru e do queijo minas frescal. Houve predomínio de placas sem crescimento algum e uma minoria de placas com crescimento incipiente. O crescimento observado nas placas, foi sempre de colônias de uma única tonalidade, verde azuladas,

cremes, ou brancas, com maior frequência de colônias brancas.

As colônias que se aproximaram da tonalidade verde azulada sobre MMA e verde azulada ou branca sobre LPM, da mesma forma que para as colônias obtidas nas análises das amostras de leite cru e de queijo minas frescal, foram submetidas aos testes de identificação a nível de gênero, anteriormente citados. Também neste caso, as colônias selecionadas, não foram confirmadas como *Listeria* spp. com base nos testes a que foram submetidas.

A fim de se ter uma maior segurança no descarte das colônias isoladas a partir de todos os produtos analisados, além dos testes preliminares de identificação a nível de gênero, submeteu-se as colônias isoladas, a partir de todas as categoriais de produtos, tanto no meio MMA como no LPM, aos testes bioquímicos indicados para a diferenciação das espécies: redução de nitrato; fermentação de xilose, ramnose e manitol em ágar púrpura de bromocresol; produção de hemolisinas em ágar sangue de cavalo; teste da hemólise sinérgica do fator CAMP sobre ágar sangue de carneiro; e análise sorológica. Da mesma forma, não houve confirmação do gênero e espécie.

Com relação à questão da seletividade dos meios MMA e LPM, utilizados neste estudo, foi possível verificar que o MMA é um meio pobre em seletividade, já que permitiu o desenvolvimento de uma variedade de colônias, o

que veio dificultar a percepção e visualização das colônias suspeitas de *Listeria* spp., bem como pode ter contribuído para uma repressão de seu crescimento a níveis detectáveis. Ao mesmo tempo, observou-se uma superioridade do meio LPM sobre o MMA, com relação à seletividade, pois embora tenha ocorrido crescimento de colônias de mais de um tipo de tonalidade sobre o LPM, este fato ocorreu em menor intensidade e em fases de análises e placas distintas, bem como à partir de marcas comerciais diferentes.

A literatura registra alguns resultados variados, a respeito da seletividade dos meios LPM e MMA.

LEE & MCCLAIN (1986), compararam o crescimento de culturas estoques sobre LPM e MMA, obtendo-se 5 das 27 e 27 das 27 linhagens não-*Listeria* crescendo sobre LPM e MMA, respectivamente, concluindo que o ágar LPM controla o crescimento de muitas bactérias e permite o crescimento de *L. monocytogenes*.

Os meios MMA e LPM, foram considerados pouco seletivos por BUCHANAN et al. (1987), particularmente com respeito ao crescimento de contaminantes estafilococos, estreptococos e micrococos.

LOVETT (1988b), comparando o ágar LPM e o MMA no isolamento de *Listeria* spp. de queijos macios, não encontrou nenhuma diferença aparente na performance dos dois meios.

SWAMINATHAN et al. (1988), observaram uma certa inibição de *L. monocytogenes* sobre o ágar LPM, registrando que o mesmo recuperou menos células de certas linhagens, do que o MMA.

A capacidade seletiva do ágar LPM e de outros meios, foi avaliada por LOESSNER et al. (1988). O ágar LPM inibiu o crescimento de todas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas. Com respeito à recuperação de *L. monocytogenes*, o meio apresentou uma boa performance, porém inibiu completamente o crescimento de *L. murray* e *L. grayi*. Estudando o crescimento de culturas mistas, foram facilmente distinguidos 2 tipos de colônias sobre o LPM, *Listeria* spp. e *Pseudomonas*. As colônias de *Listeria*, mostraram-se atípicas quanto à morfologia celular, quando crescendo sobre LPM, principalmente em cultura mista, provavelmente devido aos antibióticos ativos contra a parede celular e à produção de substâncias extracelulares por certos microrganismos. Tal fenômeno pode ser significativo para explicar a dificuldade de recuperação de *L. monocytogenes* dos alimentos.

CURTIS et al. (1989), observaram que as colônias de listéria foram facilmente reconhecidas sobre MMA quando em cultura pura, mas podem passar despercebidas ou possivelmente serem suprimidas em presença de um crescimento intenso de contaminantes.

FERNANDEZ - GARAYZABAL & GENIGEORGIS (1990), consideraram o ágar LPM superior ao MMA na recuperação de *L. monocytogenes* à partir de carne bovina crua e queijo macio espanhol, além do mesmo ser mais efetivo que o MMA na repressão da microflora competidora. Os autores verificaram ainda, uma inibição de *L. ivanovii* e *L. seeligeri* sobre o ágar LPM.

Estudando a recuperação de *L. monocytogenes* de 3 diferentes sorotipos (4b, 286 e 3a), TIWARI & ALDENRATH (1990a) verificaram que o MMA foi pouco satisfatório na recuperação do patógeno, sendo que numerosos organismos não-*Listeria* se desenvolveram, alguns destes semelhantes na aparência a *Listeria*, mas posteriormente confirmados como estreptococos e lactobacilos. O LPM teve boa performance com duas das linhagens (4b e 286), mas pouco efetivo com uma das linhagens (3a), demonstrando que certas linhagens podem não ser detectadas, principalmente quando presentes em baixos números.

LUND et al. (1991), testando a habilidade de alguns meios de plaqueamento no isolamento de *Listeria* spp., verificaram que o MMA apresentou menos amostras positivas para *Listeria* (21,3%) do que LPM (25,3%), atribuindo a maior seletividade de LPM à adição de moxalactam e cloreto de lítio, este último numa concentração 10 vezes maior que no MMA.

MOURA (1992), observou baixa seletividade do LPM, permitindo o crescimento de grande parte da microbiota acompanhante presente nas amostras de leite analisadas, sendo que muitas vezes tais contaminantes apresentaram colônias de tonalidade azulada, dificultando a análise.

As propriedades seletivas e diferenciais dos meios mais recentemente desenvolvidos, ágar OXFORD (OX), ágar OXFORD modificado (MOX) e o ágar PALCAM (PAL), facilitam a identificação e recuperação das colônias de *L. monocytogenes* (colônias negras com depressão central, rodeadas por um halo negro) e inibição da microflora normalmente presente nos alimentos, revelando sensível superioridade, principalmente sobre MMA (CURTIS et al., 1989; NORTHOLD, 1989; WALKER et al., 1990; TIWARI & ALDENRATH, 1990a; LUND AT AL., 1991; MOURA, 1992) embora alguns autores como LUND et al. (1991) e WARBURTON et al. (1992), tenham considerado o meio LPM similar aos meios anteriormente citados, em sua habilidade de isolar *Listeria* spp.

A fase do enriquecimento seletivo pode ser considerada de importância fundamental para o isolamento de *L. monocytogenes*, já que deve proporcionar condições para uma elevação da população de listérias a níveis detectáveis, bem como reprimir o desenvolvimento da microflora presente no alimento, melhorando assim, a eficiência do plaqueamento seletivo. Tal consideração

baseia-se no fato de que o plaqueamento direto mesmo em meios considerados bastante seletivos como o ágar OXFORD não permitiu a detecção de *L. monocytogenes* em alguns produtos lácteos (BUAZZI et al., 1992; HARVEY & GILMOUR, 1992), ou por outro lado, a combinação de certos caldos de enriquecimento em 1 ou 2 estágios (como caldo Fraser modificado (MFB) e L-PALCAMY) com certos meios seletivos (LPM, OX e PAL), e a incubação de alguns caldos de enriquecimento por 48 horas e não somente por 24 horas, permitem um aumento no número de amostras positivas para *L. monocytogenes* (LUND et al., 1991; WARBURTON et al., 1992). Desta forma, os resultados obtidos neste estudo podem sustentar esta suposição, no sentido de que através do plaqueamento nos meios seletivos, não foi detectada a presença do patógeno, ao mesmo tempo que recuperou-se uma variedade de outros tipos de colônias, principalmente sobre MMA.

De acordo com LUND et al. (1991), a frequência de ocorrência de todas as espécies de *Listeria* pode ser dependente de fatores tais como, a metodologia utilizada para o isolamento, o número de células do patógeno presentes no alimento, a localização geográfica, o padrão de amostragem, a qualidade do leite.

Neste sentido, cabe ainda destacar que, a literatura relata, com raras exceções, uma baixa concentração de *L. monocytogenes* nos alimentos, sendo que

muitas vezes, conforme assinalaram CASSIDAY et al. (1989), seu isolamento dos alimentos é difícil, devido à presença de uma microflora que ocorre naturalmente no alimento e à capacidade dos meios de enriquecimento de incrementar o crescimento da população de listérias a um nível detectável.

Segundo SLADE (1992), o crescimento parece ser dependente, sobretudo da habilidade de *Listeria* spp. superar com sucesso os microrganismos competidores durante o processo de seleção, que normalmente ocorre quando da utilização de procedimentos de isolamento, envolvendo combinações de pré-enriquecimentos não seletivos e/ou enriquecimentos seletivos, seguidos de plaqueamento em meios seletivos e/ou não seletivos. HEISICK et al. (1989b), consideram que a detectabilidade do patógeno através de alguns métodos (FDA, USDA, gene-track, *Listeria*-tek) é uma função dos níveis e condições da população listerial inicial, e dos tipos e números de microrganismos da microflora.

Vários trabalhos sobre a ocorrência de *L. monocytogenes* vêm sendo realizados pela comunidade científica de diversos países, em face da preocupação gerada pelo potencial patogênico e de sobrevivência deste patógeno, porém a comparação entre os resultados obtidos torna-se difícil, devido à variedade de metodologias e padrões de amostragem utilizados nos diversos trabalhos.

Muitas vezes, de acordo com a literatura, pode ser verificada baixa incidência do patógeno numa amostragem elevada e vice-versa, ou ainda a incidência não corresponder a tais padrões. A nível de condições brasileiras, o estabelecimento de uma relação comparativa, torna-se prejudicado pelo reduzido número de trabalhos ainda existentes sobre o assunto, aliado à variação em termos de metodologias e amostragem. No que diz respeito ao queijo minas frescal, o fato do mesmo ser um queijo tipicamente brasileiro vem colaborar com esta dificuldade.

Porém, a despeito das diferenças existentes entre os diversos trabalhos, com relação à análise das amostras de leite cru, os resultados obtidos neste estudo, para a presença de *L. monocytogenes*, concordam com alguns daqueles encontrados na literatura, como STONE (1987) que obteve ausência de positividade para o patógeno, nas amostras do produto analisadas na Nova Zelândia, LOVETT et al. (1987) na Califórnia, MASSA et al. (1990) na Itália, DESTRO (1990) no Brasil, ou mesmo LUND et al. (1991) que obtiveram ausência de positividade para o microrganismo em algumas das amostras analisadas semanalmente, e ORTIZ de URBINA (1992) na região de Cojedes. De certa forma, os resultados obtidos podem estar relacionados aos resultados de baixa incidência do patógeno relatados na literatura, no sentido de refletirem a possibilidade de obtenção de ausência de positividade, frente a isolamentos em números

baixos. Assim sendo, podem ser destacados os trabalhos de BREER & SCHOPER et al. (1988), que obtiveram 1,0% de positividade para *L. monocytogenes*; FARBER et al. (1988) com 1,3% de positividade, DONNELLY et al. (1988) com 1,6%, DAVIDSON et al. (1989) com 1,6%, FENLON & WILSON (1989) com 2,6%, TIWARI & ALDENRATH (1990) com 1,6%, LUND et al. (1991) com 3%, GREENWOOD et al. (1991) com 3,6%.

No que diz respeito às amostras de leite pasteurizado tipo C, a ausência de positividade para *L. monocytogenes* obtida neste estudo, concorda com os resultados obtidos em vários estudos como os de PAPAGEORGIOU & MARTH (1989b), FARBER et al. (1989), LOVETT et al. (1990), TIWARI & ALDENRATH (1990), DESTRO (1990), MOURA (1992), EL MARRAKCHI et al. (1993). Tais resultados corroboram com a afirmação de que a pasteurização seja um processo seguro para a eliminação de baixos números de *L. monocytogenes* no leite, bem como suportam o conceito de que as células do patógeno presentes no leite pasteurizado são contaminantes ambientais não injuriados (WHO, 1988, CRAWFORD et al., 1989).

A ausência de positividade, obtida para as amostras de queijo minas frescal, é conflitante com os resultados obtidos por DESTRO (1990), no Brasil, que obteve 2 amostras positivas para *L. monocytogenes* em 20 amostras do produto, analisadas de acordo com uma modificação da metodologia proposta por MCCLAIN & LEE (1988).

O crescimento de organismos não-*Listeria*, sobre os meios seletivos utilizados neste estudo, pode indicar que os alimentos analisados correm o risco de estarem sendo expostos a contaminações importantes de microrganismos, inclusive patogênicos, não só com relação ao leite pasteurizado, que muitas vezes é consumido sem qualquer outro tratamento, mas também ao leite cru, já que o mesmo frequentemente é vendido à domicílio na cidade de Piracicaba, e ao queijo minas frescal, o qual muitas vezes é feito a partir de leite cru e vendido em feiras e mercados. O ocorrido merece atenção não só das autoridades de saúde pública, mas também dos produtores dos referidos alimentos, no sentido da adoção de um rigoroso sistema de boas práticas de higiene durante a produção, bem como de um sistema de análises de risco e pontos críticos de controle, já que tais alimentos são amplamente consumidos pela população.

Os resultados obtidos neste estudo para *L. monocytogenes* e outras espécies do gênero, nas amostras dos produtos lácteos analisados de acordo com o método adotado, podem ser considerados bastante importantes, tendo em vista a diversidade de relatos à cerca da performance dos meios de enriquecimento e de plaqueamento utilizados neste estudo e de outros meios referidos na literatura, bem como a diversidade de resultados obtidos nos vários estudos realizados sobre a ocorrência do patógeno em produtos

láceos, os quais estão sujeitos a influências de várias condições como, ambientais, de processamento e armazenamento dos alimentos, microflora presente, níveis e condições do patógeno, etc. Tal fato torna evidente a necessidade de uma metodologia mais adequada para a detecção e o isolamento do patógeno a partir de alimentos, tendo em vista que o mesmo pode apresentar-se em baixos números, no sentido de se obter resultados rápidos, seguros e reprodutíveis.

6. CONCLUSÕES

- Não foi detectada a presença de *Listeria monocytogenes* ou nenhuma outra espécie do gênero, utilizando-se do método em questão para a análise das amostras de leite bovino cru, leite bovino pasteurizado tipo C e queijo minas frescal.

- Os resultados corroboram com a literatura no sentido de que *L. monocytogenes* pode estar normalmente presente nos alimentos em baixas concentrações, ou que seu crescimento pode ser sobrepujado pela microflora acompanhante, tendo em vista a diversidade de colônias que cresceram nos meios seletivos utilizados, principalmente no MMA.

- Nas análises das amostras de leite cru e queijo minas frescal, as placas de MMA e de LPM apresentaram-se com crescimento intenso e variável (de intenso a nulo) de colônias de colorações diversas, respectivamente.

- Nas análises das amostras de leite pasteurizado tipo C, as placas de MMA e de LPM apresentaram-se com crescimento variável (de intenso a incipiente) e predominantemente sem crescimento algum de colônias de colorações diversas, respectivamente.

- O meio LPM foi superior ao MMA, no que se refere à seletividade.

- A comparação entre os resultados obtidos neste estudo e aqueles referidos na literatura torna-se difícil, tendo em vista a variedade de métodos, padrões de amostragens e principalmente resultados relatados nos diversos trabalhos.

- O crescimento de organismos não-*Listeria* sobre os meios seletivos utilizados neste estudo, merece atenção das autoridades de saúde pública e dos produtores dos referidos alimentos, pois os mesmos podem estar sendo expostos a contaminações de microrganismos importantes, inclusive patogênicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHAMAD, N. & MARTH, E.H. Behavior of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21 and 35°C in triptose broth acidified with acetic, citric, or lactic acid. **Journal of Food Protection**, Ames, 52(10): 688-95, Oct. 1989.

ANTIFUNGAL agents, acidifiers affect. *Listeria* survival. **Dairy and Food Sanitation**, Ames, 7(3): 408, Aug. 1987.

ASPERGER, H.; URL, B.; BRANDL, E. Interactions between *Listeria* and ripening flora of cheese. **Netherland Milk and Dairy Journal**, Meppel, 43(3): 287-98. 1989.

AZADIAN, B.S.; FINNERTY, G.T.; PEARSON, A.D. Cheese-borne *Listeria* meningites in immunocompetent patient. **Lancet**, Boston, 1(8633): 322-3, 1989.

- BAHK, J. & MARTH, E.H. Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. In: CLIVER, D.O., ed. Foodborne diseases. San Diego, Academic Press, 1990. Cap. 18, p.247-57.
- BAILEY, J.S.; FLETCHER, D.L.; COX, N.A. Effect of enrichment of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, Ames, 53(6): 505-7, June 1990a.
- BAILEY, J.S.; FLETCHER, D.L.; COX, N.A. Efficacy of enrichment media for recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, Ames, 53(6): 473-7, June 1990b.
- BANKERROUM, N. & SANDINE, W.E. Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science*, Champaign, 71(12): 3237-45, Dec. 1988.
- BIBB, W.F.; SCHWARTZ, B.; GELLIN, B.G.; PLIKAYTIS, B.D.; WEAVER, R.E. Analysis of *Listeria monocytogenes* by multilocus enzyme electrophoresis and application of the method to epidemiologic investigations. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, 8(3): 233-9, June 1989.

- BRACKETT, R.E. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. *Food Technology*, Champaign, 42(4): 162-4, 178, apr. 1988.
- BRADSHAW, J.G.; PEELER, J.T.; TEWDT, R.M. Thermal resistance of *Listeria* spp. in milk. *Journal of Food Protection*, Ames, 54(1): 12-4, Jan. 1991.
- BRADSHAW, J.G.; PEELER, J.T.; CORWIN, J.J.; HUNT, J.M.; TEWDT, R.M. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in dairy products. *Journal of Food Protection*, Ames, 50(7): 543-4, 556, July 1987.
- BRADSHAW, J.G.; PEELER, J.T.; CORWIN, J.J.; HUNT, J.M.; TIERNEY, J.T.; LARKIN, E.P.; TEWDT, R.M. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in milk. *Journal of Food Protection*, Ames, 48(9): 743-5, Sept. 1985.
- BREER, C. & CHOPFER, K. *Listeria* and food. *Lancet*, Boston, 2: 1022, 1988.
- BUAZZI, M.M.; JOHNSON, M.E.; MARTH, E.H. Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Swiss cheese. *Journal of Dairy Science*, Champaign, 75(2): 380-6, Feb. 1992.

BUCHANAN, R.L.; STAHL, H.G.; ARCHER, D.L. Improved plating media for simplified, quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in foods. **Food Microbiology**, London, 4(3): 269-75, July 1987.

BUNNING, V.K.; CRAWFORD, R.G.; BRADSHAW, J.G.; PEELER, J.T.; TIERNEY, J.T.; TWEEDT, R.M. Thermal resistance of intracellular *Listeria monocytogenes* cells suspense in raw bovine milk. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, 52(6): 1398-402, Dec. 1986.

BUNNING, V.K.; DONNELLY, C.W.; PEELER, J.T.; BRIGGS, E.H.; BRADSHAW, J.G.; CRAWFORD, R.G.; BELIVEAU, C.M.; TIERNEY, J.T. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* within bovine milk phagocytes. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, 54(2): 364-70, Feb. 1988.

CANTONI, C.; VALENTI, M.; COMI, G. *Listeria* in formaggi e in salumi. **Industrie Alimentari**, Pinerolo, 27(264): 859-61, 1988. Apud **Dairy Science Abstracts**, Wallingford, 51(3): 123, Mar. 1988. (Resumo).

CARMINATI, D.; GIRAFFA, G.; BOSSI, M.G. Bacteriocin-like inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, Ames, 52(9): 614-7, Sept. 1989.

CASSIDAY, P.K. & BRACKETT, R.E. Methods and media to isolate and enumerate *Listeria monocytogenes*: a review. *Journal of Food Protection*, Ames, 52(3): 207-14, Mar. 1989.

CHARLTON, B.R.; KINDE, H.; JENSEN, L.H. Environmental survey for *Listeria* species in California milk processing plants. *Journal of Food Protection*, Ames, 53(3): 198-201, Mar. 1990.

CHRISTIE, R.; ATKINS, N.E.; MUNCH-PETERSON, E. A note on lytic phenomenon shown by group B streptococci. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, Adelaide, 22: 197-200, 1944.

COLE, M.B.; JONES, M.V.; HOLYOAK, C. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*, Reading, 69(1): 63-72, July 1990.

- COLEMAN, N.W. Controlling *Listeria hystertia* in your plant. *Dairy and Food Sanitation*, Ames, 6(12): 555-7, Dec. 1986.
- COMI, G.; CANTONI, C.; D'AUBERT, S. Indagine sulla presenza di *Listeria monocytogenes* nei formaggi. *Industrie Alimentari*, Pinerolo, 26(247): 216-8, 1987. Apud *Dairy Science Abstracts*, Wallingford, 50(3): 125, Mar. 1988. (Resumo).
- COX, L.J.; KLEISS, T.; CORDIER, J.L.; CORDELLANA, O.; KONKEL, P.; PEDRAZZINI, C.; BEUMER, R.; SIEBENGA, A. *Listeria* spp. in food processing, non food and domestic environments. *Food Microbiology*, London, 6(1): 49-61, Mar. 1989.
- CRAWFORD, R.G.; BELIVEAU, C.M.; PEELER, J.T.; DONNELLY, C.W.; BUNNING, V.K. Comparative recovery of uninjured and heat-injured *Listeria monocytogenes* cells from bovine milk. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 55(6): 1490-4, June 1989.
- CURTIS, G.D.W.; MITCHELL, R.G.; KING, A.F.; GRIFFIN, E.J. A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, 8(3): 95-8, Mar. 1989.

DATTA, A.R.; WENTZ, B.A.; HILL, W.E. Identification and enumeration of β -hemolytic *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated dairy products. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, 71(3): 673-5, May/June 1988.

DAVIDSON, J.D.; SPRUNG, D.W.; PARK, C.E.; RAYMAN, M.K. Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp and *Yersinia enterocolitica* in Manitoba raw milk. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, Ottawa, 22(1): 70-4, Feb. 1989.

DESTRO, M.T. Isolamento de *Listeria* spp e estudo de sua ocorrência em carne, leite e derivados. Campinas, 1990. 73p. (Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP).

DESTRO, M.T.; SERRANO, A.M.; KABUKI, D.Y. Isolation of *Listeria* species from some brazilian meat and dairy products. **Food Control**, London, 2(2): 110-2, 1991.

DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, L.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.F.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; BLANCO, J.L.; SUAREZ, G. Fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture ripening of semi-hard cheese. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, 4(6): 125-7, 1987.

DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, L.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.F.;
VASQUEZ-BOLAND, J.A.; RODRIGUEZ-FERRI, E.; SUAREZ-
FERNENDEZ, G. Isolation de micro-organismes du genre
Listeria à partir de la lait cru destiné à la
consommation humaine. **Canadian Journal of Microbiology**,
Ottawa, 31(10): 938-41, Oct. 1985.

DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, L.; GARAYZABAL, J.F.F.; FERRI, E.R.;
VASQUEZ, J.A.; GOMEZ-LUCIA, E.; AMBROSIO, C.; SUAREZ, G.
Viability of *Listeria monocytogenes* in milk treated with
hydrogen peroxide. **Journal of Food Protection**, Ames,
50(8): 636-9, Aug. 1987.

DONNELLY, C.W. Historial perspectives on methodology to
detect *Listeria monocytogenes*. **Journal Association of
Official Analytical Chemists**, Arlington, 71(3): 644-6,
1988.

DONNELLY, C.W. & BAIGENT, G.J. Method for flow cytometric
detection of *Listeria monocytogenes* in milk. **Applied
and Environmental Microbiology**, Baltimore, 52(4): 689-
95, Oct, 1986.

DONNELLY, C.W. & BRIGGS, E.H. Psychrotrophic growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* as a function of milk composition. **Journal of Food Protection**, Ames, **49**(12): 994-8, 1002, Dec. 1986.

DONNELLY, C.W.; BAIGENT, G.J.; BRIGGS, E.H. Flow cytometric for automated analysis of milk containing *Listeria monocytogenes*. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, **71**(3): 655-8, May/June 1988.

DONNELLY, C.W.; BRIGGS, E.H.; DONNELLY, L.S. Comparison of heat resistance of *Listeria monocytogenes* in milk as determined by two methods. **Journal of Food Protection**, Ames, **50**(1): 14-7, Jan. 1987.

DOYLE, M.P. & SCHOENI, J.L. Comparison of produces for isolating *Listeria monocytogenes* in soft, surface-ripened cheese. **Journal of Food Protection**, Ames, **50**(1): 4-6, Jan. 1987.

DOYLE, M.P.; MESKE, L.M.; MARTH, E.H. Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and storage of nonfat dry milk. **Journal of food Protection**, Ames, **48**(9): 740-2, Sept. 1985.

DOYLE, M.P.; GLASS, K.A.; BEERY, J.T.; GARCIA, G.A.;
POLLARD, D.J.; SCHULTZ, R.D. Survival of *Listeria*
monocytogenes in milk during high-temperature, short-
time pasteurization. **Applied and Environmental**
Microbiology, Baltimore, 53(7): 1433-8, July 1987.

EL MARRAKCHI, A.; HAMANA, A.; EL OTHMANI, F. Occurence of
Listeria monocytogenes in milk and dairy products
produced or imported into Marocco. **Journal of Food**
Protection, Ames, 56(3): 256-9, Mar. 1993.

EL-SHENAWY, M.A. & MARTH, E.H. Behavior of *Listeria*
monocytogenes in the presence of sodium propionate
together with food acids. **Journal of food Protection**,
Ames, 55(4): 241-5, Apr. 1992.

FARBER, J.M. *Listeria monocytogenes*. **Journal Associations**
of Official Analytical Chemists, Arlington, 74(4): 701-
4, 1991.

FARBER, J.M. & PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a
food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**,
Baltimore, 53(3): 476-511, Sept. 1991.

FARBER, J.M.; SANDERS, G.W.; JOHNSTON, M.A. A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. *Journal of Food Protection*, Ames, 52(7): 456-8, July 1989.

FARBER, J.M.; SANDERS, G.W.; MALCOLM, S.A. The presence of *Listeria* spp in raw milk in Ontario. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 34(2): 95-100, Feb. 1988.

FARBER, J.M.; JOHNSTON, M.A.; PURVIS, U.; LOITT, A. Surveillance of soft and semi-soft cheeses for the presence of *Listeria* spp. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, 5(2): 157-63, 1987.

FARRAG, S.A. & MARTH, E.H. Growth of *Listeria monocytogenes* in the presence of *Pseudomonas fluorescens* at 7 or 13°C in skim milk. *Journal of food Protection*, Ames, 52(12): 852-5, Dec. 1989.

FDA's dairy product safety initiatives preliminary status report. *Dairy and Food Sanitation*, Ames, 7(3): 124-7, Mar. 1987.

FEDIO, W.M. & JACKSON, H. Effect of tempering on the heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, 9(5): 157-60, Nov. 1989.

- FENLOW, D.R. Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. **Journal of Applied Bacteriology**, Reading, 59(6): 537-43, Dec. 1985.
- FENLON, D.R. & WILSON, J. The incidence of *Listeria monocytogenes* in raw milk from farm bulk tanks in north-east Scotland. **Journal of Applied Bacteriology**, Reading, 66(3): 191-6, Mar. 1989.
- FERNANDES, J.C.T. *Listeria*. In: GUERREIRO, M.G., ed. **Bacteriologia especial**. Porto Alegre, Sulina, 1984. p.327-32.
- FERNANDEZ-GARAYZABAL, J. & GENIGEORGES, C. Quantitative evaluation of three selective enrichment broth and agars used in recovering *Listeria* microorganisms. **Journal of Food Protection**, Ames, 53(2): 105-10, Feb. 1990.
- FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.; DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, L.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; BLANCO CANCELO, L.; SUAREZ-FERNANDEZ, G. *Listeria monocytogenes* dans le lait pasteurisé. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, 32(2): 149-50, Feb. 1986.

FLEMING, D.W.; COCHI, S.L.; MacDONALD, K.L.; BRONDUM, J.; HAYES, P.S.; PLIKAYTIS, B.D.; HOLMES, M.B.; AUDURIER, A.; BROOME, C.V.; REINGOLD, A.L. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, 312(14): 404-7. Feb. 1985.

FRASER, J.A. & SPERBER, W.H. Rapid detection of *Listeria* spp in food and environmental samples by esculin hydrolisis. **Journal of Food Protection**, Ames, 51(10): 762-5, Oct. 1988.

FREITAS, M.A.Q.; SANTOS, J.A.; MAGALHÃES, H.; CARVALHO, E.C.Q. Abcesso cerebral por *Listeria monocytogenes* em bovino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 17(1): 137-41, jan. 1982.

GENIGEORGIS, C.; TOLEDO, J.H.; GARAYZABAL, F.J. Selected microbiological and chemical characteristics of illegally produced and marketed soft hispanic style cheeses in California. **Journal of Food Protection**, Ames, 54(8): 598-601, Aug. 1991.

GEORGE, S.M.; LUND, B.M.; BROCKLEHURST, T.F. The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, 6(6): 153-6, June 1988.

GOLDEN, D.A.; BEUCHAT, L.R.; BRACKETT, R.E. Evaluation of seletive direct plating media for their suitability to recover uninjured, heat-injured, and freeze-injured *Listeria monocytogenes* from foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, 54(6): 1451-6, June 1988a.

GOLDEN, D.A.; BEUCHAT, L.R.; BRACKETT, R.E. Direct plating technique for enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, 71(3): 647-50, May/June 1988b.

GRAVANI, R.B. Bacterial foodborne diseases. **Dairy and Food Sanitation**, Ames, 7(3): 137-41, Mar. 1987.

GRAY, M.L. & KILLINGER, A.H. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, 30(2): 309-82, June 1966.

GREENWOOD, M.H.; ROBERTS, D.; BURDEN, P. The occurrence of *Listeria* species in milk and dairy products: a national survey in England and Wales. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, 12(2/3): 197-206, Feb. 1991.

HARVEY, J. & GILMOUR, A. Occurrence of *Listeria* species in raw milk and dairy products produced in Northern Ireland. *Journal of Applied Bacteriology*, Reading, 72(2): 119-25, Feb. 1992.

HASHISAKA, A.E.; WEAGANT, S.D.; DONG, F.M. Survival of *Listeria monocytogenes* in mozzarella cheese and ice cream exposed to gamma irradiation. *Journal of Food Protection*, Ames, 52(7): 490-2, July 1989.

HAYES, P.S.; FEELEY, J.S.; GRAVES, L.M.; AJELLO, G.W.; FLEMING, D.W. Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 51(2): 438-40, Feb. 1986.

HEISICK, J.E.; WAGNER, D.E.; NIERMANN M.L. ; PEELER, J.T. *Listeria* spp. found on fresh market produce. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 55(8): 1925-7, Aug. 1989a.

HEISICK, J.E.; HARREL, F.M.; PETERSON, E.H.; MCLAUGHLIN, S.; WAGNER, D.E.; WESLEY, I.V.; BRYNER, J. Comparison of four procedures to detect *Listeria* spp. in foods. *Journal of Food Protection*, Ames, 52(3): 154-7, Marc. 1989b.

HITCHINS, A.D. & TRAN, T. Initial cell concentration and selective media effects on the isolation of *Listeria monocytogenes* from enrichment cultures of inoculated foods. *Journal of Food Protection*, Ames, 53(6): 502-4, June 1990.

HO, J.L.; SHANDS, K.N.; FRIEDLAND, G.; ECKIND, P.; FARSEER, D.W. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. *Archives of Internal Medicine*, Chicago, 146: 520-4, 1986.

HOFER, E. Isolamento e caracterização de *Listeria monocytogenes* em água de esgoto. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 73(1/2): 31-8, 1975.

JAMES, S.M.; FANNIN, S.L.; AGEE, B.A.; HALL, B.; PARKER, E.; VOGT, J.; RUN, G.; WILLIAMS, J.; LIEB, L.; PRENDERGAST, T.; WERNER, S.B.; CHIN, J. Listeriosis outbreak association with mexican-style cheese - California. *Morbidity and Mortality Weekly Reports*, Washington, **34**: 357-9, 1985.

JUNTILA, J.R.; NIEMALA, S.I.; HIRN, J. Minimum growth temperature of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *Journal of Applied Bacteriology*, Reading, **65**(4): 321-7, Oct. 1988.

KACZMARSKI, E.B. & JONES, D.M. Listeriosis and ready-cooked chicken. *Lancet*, Boston, **1**(8637): 549, Mar. 1989.

KLAUSNER, R.B. & DONNELLY, C.W. Environmental sources of *Listeria* and *Yersinia* in Vermont dairy plants. *Journal of Food Protection*, Ames, **54**(8): 607-11, Aug. 1991.

KLINGER, J.D. & JOHNSON, A.R. A rapid nucleic acid hybridization assay for *Listeria* in foods. *Food Technology*, Champaign, **42**(7): 66-70, July 1988.

KLINGER, J.D.; JOHNSON, A.; CROAN, D.; FLYNN, P. WHIPPIE, K.; KIMBALL, M.; LAWRIE, J.; CURIALE, M. Comparative studies of nucleic acid hybridizations assay for *Listeria* in foods. *Journal Association of Official Analytical Chemists*, Arlington, 71(3): 669-73, May/June 1988.

KNABEL, S.J.; WALKER, H.W.; HARTMAN, P.A.; MENDONÇA, A.F. Effects of growth temperature and strictly anaerobic recovery on the survival of *Listeria monocytogenes* during pasteurization. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 56(2): 370-6, Feb. 1990.

KNIGHT, M.T.; BLACH, J.F.; WOOD, D.W. Industry perspective on *Listeria monocytogenes*. *Journal Association of Official Analytical Chemists*. Arlington, 71(3): 682-3, May/June 1988.

KOVINCIC, I.; VUJICIC, I.E.; SVABIC-VLAHOVIC, M.; VULIC, M.; GAGIC, M.; WESLEY, I.V. Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Trappist cheese. *Journal of Food Protection*, Ames, 54(6): 418-20, June 1991.

KRYSINSKI, E.P.; BROWN, L.J.; MARCHISELLO, T.J. Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. *Journal of Food Protection*, Ames, 55(4): 246-51, Apr. 1992.

KUHN, M.; KATHARIOU, S.; GOEBEL, W. Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, Washington, 56: 79-82, 1988.

LEE, W.H. & McCLAIN, D. Improved *Listeria monocytogenes* selective agar. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 52(5): 1215-7, Nov. 1986.

LENNON, D; LEWIS, B.; MANTELL, C.; BECROFT, D.; DOVE, B.; FARMER, K.; TONKIN, S. YEATES, N.; STAMP, R. MICKLESON, K. Epidemic perinatal listeriosis. *Pediatric Infectious Disease Journal*, Baltimore, 3: 30-4, Mar. 1984.

LIEWEN, M.B. & PLAUTZ, M.W. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Nebraska. *Journal of Food Protection*, Ames, 51(11): 840-1, Nov. 1988.

- LOESSNER, M.J.; BELL, R.H.; JAY, J.M.; SHELEF, L.A.
Comparison of seven plating media for enumeration of
Listeria spp. **Applied and Environmental Microbiology**,
Baltimore, 54(12): 3003-7, Dec. 1988.
- LOVETT, J. *Listeria* isolation. In: ESTADOS UNIDOS.
DEPARTMENT OF HEALT, EDUCATION AND WELFARE, FOOD AND
DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual**.
6.ed. Washington, 1984/87. Supl. 9.
- LOVETT, J. Isolation and enumeration of *Listeria*
monocytogenes. **Food Technology**, Champaign, 42(4): 172-
5, Apr. 1988a.
- LOVETT, J. Isolation and identification of *Listeria*
monocytogenes in dairy products. **Journal Association of**
Official Analytical Chemists, Arlington, 71(3): 658-60,
1988b.
- LOVETT, J. & HITCHINS, A.D. *Listeria* isolation, revised
method of analysis. **Federal Register**, Washington,
53(211): 44148-53, Nov. 1988.
- LOVETT, J. & TWEDT, R.M. *Listeria*. **Food Technology**,
Champaign, 42(4): 188-91, Apr. 1988.

- LOVETT, J.; FRANCIS, D.W.; HUNT, J.M. *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence and pathogenicity. **Journal of Food Protection**, Ames, 50(3): 188-92, Mar. 1987.
- LOVETT, J.; WESLEY, I.V.; VANDERMAATEN, M.J. BRADSHAW, J.G.; FRANCIS, D.W.; CRAWFORD, R.G.; DONNELLY, C.W.; MESSER, J.W. High-temperature short-time pasteurization inactivates *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Ames, 53(9): 734-8, Sept. 1990.
- LUND, A.M.; ZOTTOLA, E.A.; PUCH, D.J. Comparison of methods for isolation of *Listeria* from raw milk. **Journal of Food Protection**, Ames, 54(8): 602-6, Aug. 1991.
- MARTH, E.H. Disease characteristics of *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, Champaign, 42(4): 165-8, Apr. 1988.
- MASSA, S.; CESARONI, D.; PODA, G.; TROVATELLI, L.D. The incidence of *Listeria* spp. in soft cheeses, butter and raw milk in the province of Bologna. **Journal of Applied Bacteriology**, Reading, 68(2): 153-6, Feb. 1990.

MATTINGLY, J.A.; BUTMAN, B.T.; PLANK, M.C.; DURHAM, R.J.
Rapid monoclonal antibody-based-enzyme-linked
immunosorbent assay for detection of *Listeria* in food
products. **Journal Association of Official Analytical
Chemists**, Arlington, 71(3): 679-81, May/June 1988.

McCLAIN, D. & LEE, W.H. Development of USDA - FSIS method
for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat
and poultry. **Journal Association of Official Analytical
Chemists**, Arlington, 71(3): 660-4, 1988.

McCLAIN, D. & LEE, W.H. FSIS method for the isolation and
identification of *Listeria monocytogenes* from processed
meat and poultry products. Beltsville, USDA/FSIS/
Microbiology Division, 1989. 12p. (Laboratory
Communication, 57).

MCLAUCHLIN, J. *Listeria monocytogenes*, recent advances in
the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans.
Journal of Applied Bacteriology, Reading, 63(1): 1-11,
July 1987.

MERCK, manual de médios de cultivo. Dormstadt, 1982.

MEYER, D.H. & DONNELLY, C.W. Effect of incubation temperature on repair of heat-injured *Listeria* in milk. *Journal of Food Protection*, Ames, 55(8): 579-82, Aug 1992.

MOURA, S.M. Incidência de *Listeria* spp em amostras de leite cru e pasteurizado, tipos C e B, obtidas em uma usina de beneficiamento da cidade de São Paulo. São Paulo, 1992. 104 p. (Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP).

MURRAY, E.G.D.; WEBB, R.A.; SWANN, M.B.R. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undiscrised bacillus *Bacterium monocytogenes*. *Journal of Pathology and Bacteriology*, Edinburgh, 29(4): 407-39, 1926.

NORTHOLD, M.D. Recovery of *Listeria monocytogenes* from dairy products using the TNCB-TNSA method and draft IDF methods. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, Meppel, 43(3): 299-310, 1989.

OLADEPO, D.K.; CANDLISH, A.A.G.; STIMSON, W.H. Detection of *Listeria monocytogenes* using polyclonal antibody. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, 14(2): 26-9, Feb. 1992.

ORTIZ de URBINA, E.; TAPIA de DAZA, M.S.; MIRANDA PÉREZ, L.D. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en productos lácteos de alto consumo en la región de Cojedes. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE LOS ALIMENTOS, 3., Montevideo, 1992. **Resumos.** Montevideo, Subcomite Latinoamericano de Especificaciones Microbiologicas para los Alimentos, 1992. p.90.

PALUMBO, S.A. & WILLIAMS, A.C. Effect of temperature, relative humidity and suspending menstrua on the resistance of *Listeria monocytogenes* to drying. **Journal of Food Protection**, Ames, 53(5): 377-81, May 1990.

PAPAGEORGIOU, D.K. & MARTH, E.H. Behavior of *Listeria monocytogenes* at 4 and 22°C in whey and skim milk containing 6 or 12% sodium chloride. **Journal of Food Protection**, Ames, 52(9): 625-30, Sept. 1989a.

PAPAGEORGIOU, D.K. & MARTH, E.H. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Blue cheese. **Journal of Food Protection**, Ames, 52(7): 459-65, July 1989b.

- PAYNE, K.D.; DAVIDSON, P.M.; OLIVER, S.P.; CHRISTEN, G.L.
Influence of bovine lactoferrin on the growth of
Listeria monocytogenes. *Journal of Food Protection*,
Ames, 53(6): 468-72, June 1990.
- PAYNE, K.D.; RICO-MUNOZ, E.; DAVIDSON, R.M. The
antimicrobial activity of phenolic compounds against
Listeria monocytogenes and their effectiveness in a
model milk system. *Journal of Food Protection*, Ames,
52(3): 151-3, Mar. 1989.
- PEARSON, L.J. & MARTH, E.H. Behavior of *Listeria*
monocytogenes in the presence of cocoa, carrageenan, and
sugar in a milk medium incubated with and without
agitation. *Journal of Food Protection*, Ames, 53(1): 30-
7, Jan. 1990.
- PIRIE, J.H.H. *Listeria*: change of name for a genus of
bacteria. *Nature*, London, 145: 264, 1940.
- RORVIK, L.M. & YNDESTAD, M. *Listeria monocytogenes* in
foods in Norway. *International Journal of Food*
Microbiology, Amsterdam, 13(2): 97-104, June 1991.

ROSENOW, E.M. & MARTH, E.H. Addition of cocoa powder, cane sugar, and carrageenan to milk enhances growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, Ames, 50(9): 726-9, Sept. 1987a.

RYSER, E.T. & MARTH, E.H. Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. *Journal of Food Protection*, Ames, 50(1): 7-13, Jan. 1987a.

RYSER, E.T. & MARTH, E.H. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Camembert cheese. *Journal of Food Protection*, Ames, 50(5): 372-8, May 1987b.

RYSER, E.T.; MARTH, E.H.; DOYLE, M.P. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture and storage of Cottage cheese. *Journal of Food Protection*, Ames, 48(9): 746-50, Sept. 1985.

SCHAACK, M.M. & MARTH, E.H. Behavior of *Listeria monocytogenes* in skim milk and in yogurt mix during fermentation by thermophilic lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, Ames, 51(8): 607-14, Aug. 1988a.

SCHAACK, M.M. & MARTH, E.H. Behavior of *Listeria monocytogenes* in skim milk during fermentation with mesophilic lactic starter cultures. *Journal of Food Protection*, Ames, 51(8): 600-6, Aug. 1988b.

SCHAACK, M.M. & MARTH, E.H. Survival of *Listeria monocytogenes* in refrigerated cultured milks and yogurt. *Journal of Food Protection*, Ames, 51(11): 848-52, Nov. 1988c.

SCHLECH, W.F. Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes*. *Food Technology*, Champaign, 42(4): 176-8, Apr. 1988.

SCHLECH, W.F.; LEVIGNE, P.M.; BORTOLUSSI, R.A.; ALLEN, A.C.; HALDANE, E.V.; WORT, A.J.; HIGHTOWER, A.W.; JOHNSON, S.E.; KING, S.H.; NICHOLLS, E.S.; BROOME, C.V. Epidemic listeriosis evidence for transmission by food. *The New England Journal of Medicine*, Waltham, 308: 203, 1983.

SEELIGER, H.P.R. & WELSHIMER, H.J. Genus *Listeria*. In: BUCHANAN, R.E. & GIBBSON, N.E., ed. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 8 ed.. Baltimore, Williams & Wilkins, 1976. p. 593-6.

- SEELIGER, H.P.R. & JONES, D. Genus *Listeria*. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E., ed. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9 ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1986. v.2, p. 1235-45.
- SILLIKER, J.H. New bacteria in the news: a special symposium *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, Champaign, **40**(8): 24, Aug. 1986.
- SKOVGAARD, N. & MORGEN, C.A. Detection of *Listeria* spp. in faeces from animals, in feeds and in raw food of animal origin. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, **6**(3): 229-42, 1988.
- SKOVGAARD, N. & NORRUNG, B. The incidence of *Listeria* spp. in faeces of Danish pigs and minced pork meat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, **8**(1): 59-63, Feb. 1989.
- SLADE, P.J. Monitoring *Listeria* in the food production environment. III. Typing methodology. **Food Research International**, Ottawa, **25**(3):215-25, 1992.

SORRELLS, K.M.; ENIGL, D.C.; HATFIELD, J.R. Effect of pH, acidulant, time, and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, Ames, 52(8): 571-3, Aug. 1989.

STONE, D.L. A survey of raw whole milk for *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, Hamilton, 22: 257-64, 1987.

SUAREZ-FERNANDEZ, G.; SUAREZ-RODRIGUEZ, M. FERNANDEZ-GARAYZABAL, F.; DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, L. Thermorresistencia de *Listeria monocytogenes*. *Alimentaria*, Madrid, (200): 51-3, 1989.

SWAMINATHAN, B.; HAYES, P.S.; PRZYBYSZEWSKI, V.A.; PLIKAYTIS, B.D. Evaluation of enrichment and plating media for isolating *Listeria monocytogenes*. *Journal Association of Official Analytical Chemists*, Arlington, 71(3): 664-8, 1988.

TIWARI, N.P. & ALDENRATH, S.G. Isolation of *Listeria monocytogenes* from food products on four selective plating media. *Journal of Food Protection*, Ames, 53(5): 382-5, May 1990a.

TIWARI, N.P. & ALDENRATH, S.G. Occurrence of *Listeria* species in food and environmental samples in Alberta. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, Ottawa, 23(2/3): 109-113, June 1990b.

TRAN, T.T.; STEPHENSON, P.; HITCHINS, A.D. The effect of aerobic mesophilic microfloral levels on the isolations of inoculated *Listeria monocytogenes* strain LM82 of selected foods. **Journal of Food Safety**, Westport, 10: 267-75, 1990.

VAN DENVER, A.G.F. *Listeria monocytogenes*: um problema em leite e produtos lácteos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, 13(155): 19-23, 1988.

VAN NETTEN, P.; PERALES, I.; MOSSEL, D.A.A. An improved selective and diagnostic medium for isolation and counting of *Listeria* spp. in heavily contaminated foods. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, 7(1): 17-21, July 1988.

VAN NETTEN, P.; VAN DE VEN, A.; PERALES, I.; MOSSEL, D.A.A. A selective and diagnostic medium for use in the enumeration of *Listeria* spp in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, 6: 187-8, 1988b.

WAKABAYASHI, H.; BELLAMY, W.; TAKASE, M.; TOMITA, M.

Inactivation of *Listeria monocytogenes* by lactoferrin, a potent antimicrobial peptide derived from cow's milk. *Journal of Food Protection*, Ames, 55(4): 238-40, Apr. 1992.

WALKER, S.J.; ARCHER, P.; APPLEYARD, J. Comparison of the *Listeria*-Tek ELISA kit with cultural procedures for the detection of *Listeria* species in foods. *Food Microbiology*, London, 7(4): 335-42, Dec. 1990.

WARBURTON, D.W.; FARBER, J.M.; ARMSTRONG, A.; CALDEIRA, R.; HUNT, T.; MESSIER, S.; PLANTE, R.; TIWARI, N.P.; VINET, J. A comparative study of the "FDA" and "USDA" methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, 13: 105-18, 1991.

WARBURTON, D.W.; FARBER, J.M.; POWELL, C.; TIWARI, N.P.; READ, S.; PLANTE, R.; BABIUK, T.; LAFFEY, P.; KAURI, T.; MAYERS, P.; CHAMPAGNE, M.J.; HUNT, T.; LA CASSE, P.; VIET, K.; SMANDO, R.; COATES, F. Comparison of methods for optimum detection of stressed and low levels of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, London, 9(2): 127-45, June 1992.

WATKINS, J. & SLEATH, K.P. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage sludge and river water. *Journal of Applied Bacteriology*, Reading, 50(1): 1-9, Feb. 1981.

WEHR, H.M. *Listeria monocytogenes*: a current dilemma. *Journal of Official Analytical Chemists*, Arlington, 70(5): 769-72, 1987.

WELSHIMER, H.J. & DONKER-VOET, J. *Listeria monocytogenes* in nature. *Applied Microbiology*, Baltimore, 21(3): 516-9, Mar. 1971.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Foodborne listeriosis. *Bulletin of the World Health Organization*, New York, 66(4): 421-8, 1988.

YOUSEF, A.E. & MARTH, E.H. Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and storage of Colby cheese. *Journal of Food Protection*, Ames, 51(1): 12-5, Jan. 1988a.

YOUSEF, A.E. & MARTH, E.H. Inactivation of *Listeria monocytogenes* by ultraviolet energy. *Journal of Food Science*, Chicago, 53(2): 571-3, Mar./Apr. 1988b.

YOUSEF, A.E.; RYSER, E.T.; MARTH, E.H. Methods for improved recovery of *Listeria monocytogenes* from cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 54(11): 2643-9, Nov. 1988.