UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GIOVANA VERGINIA BARANCELLI

**Ocorrência e caracterização sorológica e genotípica de
Listeria monocytogenes em indústrias de queijo do Estado de São Paulo**

Pirassununga
2010

GIOVANA VERGINIA BARANCELLI

**Ocorrência e caracterização sorológica e genotípica de
Listeria monocytogenes em indústrias de queijo do Estado de São Paulo**

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Zootecnia

Área de concentração: Qualidade e produtividade animal

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Ernani Porto

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

B225o Barancelli, Giovana Verginia
Ocorrência e caracterização sorológica e genotípica
de *Listeria monocytogenes* em indústrias de queijo do
Estado de São Paulo / Giovana Verginia Barancelli. --
Pirassununga, 2010.
115 f.
Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Engenharia de Alimentos.
Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal.
Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de
Oliveira

1. *Listeria monocytogenes* 2. PFGE 3. Laticínio
4. Queijo 5. Sorotipo. I. Título.

*Aos meus pais Renato (in memoriam) e Matilde, exemplos para a
minha vida.*

*Ao Luís pelo carinho e compreensão.
Ao meu filho João, pelos momentos que deixamos de ficar perto.*

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira pela orientação, confiança e ensinamentos.

Ao Dr. Ernani Porto pelo incentivo, idéias compartilhadas e apoio demonstrados na co-orientação deste trabalho.

Ao Dr. Ernesto Hofer pela atenção e apoio ao longo do trabalho. À equipe do laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz-RJ, especialmente à Cristhiane Falavina dos Reis.

À Dra. Juliana Pfrimer Falcão e a sua equipe de laboratório, especialmente ao Roberto, pelo suporte com o BioNumerics e importantes contribuições no início das análises com PFGE.

À Tarsila pelo auxílio nas coletas, amizade e companheirismo no decorrer da pesquisa.

Ao pessoal da UFRGS: Dr. Marcos José Pereira Gomes, pela concessão de microrganismos para testes preliminares. À Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso e equipe de laboratório, especialmente à Vanessa e Andreia, pela oportunidade de compartilharmos experiências na padronização de técnicas de análise.

Ao Dr. Luiz Carlos Basso e ao Dr. Cláudio Rosa Gallo, por disponibilizarem equipamentos.

À Dra. Monica Labate e à Dra. Cláudia Vitorello, pela atenção e esclarecimentos prestados.

À Denise, Roice e Rose, técnicas dos laboratórios, pela amizade e disponibilidade em ajudar.

Às estagiárias Laura e Natalia, pelas diversas ajudas e dedicação durante o experimento. À Livia, Maira e Alessandra, pela ajuda no período das coletas.

À Lucy, Sarah e Ademir, pelo apoio e companheirismo. Aos colegas Guilherme, Stela, Carol, Keliene, Cris, Milla, Bruna, Nicolle e Ligia pelo agradável convívio no laboratório.

Aos avós Iaro e Conceição pelos cuidados com o meu filho João.

Aos proprietários dos laticínios e suas equipes de colaboradores, por possibilitarem a realização dessa pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento da pesquisa e pela bolsa de estudo.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos e à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela oportunidade de realização deste trabalho.

A todos que, embora não nomeados individualmente, me apoiaram e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada

RESUMO

BARANCELLI, G.V. **Ocorrência e caracterização sorológica e genotípica de *Listeria monocytogenes* em indústrias de queijo do Estado de São Paulo**. 2010. 115 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

Pesquisas sobre *Listeria monocytogenes* em indústrias de produtos lácteos no Brasil são escassas. Três laticínios (A, B e C) produtores de queijos do Estado de São Paulo foram monitorados para a presença de *L. monocytogenes* no período de outubro/2008 a setembro/2009. Foram realizadas 12 coletas, correspondentes a 12 lotes de queijo produzidos, sendo quatro de cada laticínio. Em cada laticínio, as visitas foram realizadas com intervalos de aproximadamente 2 meses entre cada uma. Foram analisadas 393 amostras, sendo 201 de superfícies com e sem contato com alimentos e 192 de alimentos (leite cru e pasteurizado e queijo) água e salmoura, para pesquisa de *L. monocytogenes*. As análises foram realizadas de acordo com o método do Food and Drug Administration (FDA). Os resultados confirmam a presença de *Listeria* spp nas instalações dos três laticínios. *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri* foram as espécies isoladas neste estudo. Especificamente a espécie *L. monocytogenes* não foi encontrada no laticínio A, entretanto, o microrganismo foi isolado de 12,5% das amostras do laticínio B e de 9,1% do laticínio C. *L. monocytogenes* não foi isolada do leite cru dos silos, do leite pasteurizado, da água e dos queijos Minas frescal, nos 3 laticínios. Porém, no laticínio C, *L. monocytogenes* foi isolada de amostras de queijo Prato que foram incluídas apenas na 4ª coleta deste laticínio, além de ter sido isolada de amostras de salmoura. As maiores prevalências de contaminação por *L. monocytogenes* ocorreram em superfícies sem contato com alimentos, sendo positivas 51,6% das amostras do laticínio B e 21,7% do laticínio C. Em ambos os laticínios a bactéria também foi isolada de superfícies com contato com alimentos. Os resultados fornecem informações detalhadas dos pontos prioritários para o desenvolvimento de estratégias de controle de *L. monocytogenes* em laticínios e mostram a importância de programas de monitoramento ambiental do patógeno, mesmo em pequenas indústrias. Os 85 isolados identificados como *L. monocytogenes* revelaram-se de quatro sorotipos: 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b, com predomínio do 4b, em ambos os laticínios, o que é preocupante para a saúde pública. Com base nos resultados de PFGE (perfis combinados *Apal* e *Ascl*), 40 perfis (pulsotipos) foram obtidos. Pulsotipos foram isolados repetidamente entre coletas nos laticínios B e C, sugerindo persistência de linhagens nos laticínios. Apesar dos laticínios serem distantes e independentes, um pulsotipo foi compartilhado entre ambos. O laticínio A apresentou contaminação por mais de um pulsotipo de *L. seeligeri* e houve isolamento repetido de um pulsotipo dessa espécie, entre as coletas, sugerindo adaptação da bactéria e necessidade de controle do gênero *Listeria* nessa indústria. A ocorrência de um mesmo pulsotipo de *L. monocytogenes* com sorotipos diferentes (1/2b e 4b) mostra que a sorotipagem deve acompanhar análises mais refinadas como as de natureza genotípica.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, PFGE, laticínio, queijo, sorotipo.

ABSTRACT

BARANCELLI, G.V. **Occurrence, serological and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* in cheese manufacturing plants in São Paulo State.** 2010. 115 f. Thesis (PhD) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

Listeria monocytogenes surveys in cheese manufacturing plants in Brazil are rare. Three cheese manufacturing plants (A, B and C) in São Paulo state were monitored for the presence of *Listeria monocytogenes* during the period of October/2008 – September/2009. Twelve samples surveys were taken corresponding to 12 cheese lots produced, four in each plant. In each cheese plant, the samples were taken at intervals of approximately 2 months. There were 393 samples analyzed, 201 from surfaces with and without contact with food and 192 of food (raw and pasteurized milk and cheese), water and brine, with the objective of searching for *L. monocytogenes*. The analyses were performed in accordance with Food and Drug Administration (FDA) method. The results confirmed the presence of *Listeria* spp in the facilities of three plants. *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri* and *L. wesheimeri* were the species isolated in this study. Specifically the *L. monocytogenes* specie was not isolated from plant A. However, the microorganism was isolated in 12.5% of the samples from plant B and 9.1% from plant C. *Listeria monocytogenes* was not isolated from raw milk in storage tanks, pasteurized milk, water or Minas frescal cheese samples from the three plants. Nevertheless, in plant C, *L. monocytogenes* was isolated in Prato cheese that was included only in the 4th sampling survey and also from the brine samples. The major prevalence of contamination by *L. monocytogenes* occurred on surfaces without contact with food, with 51.6% of the samples positive from plant B and 21.7% from plant C. In both plants, the microorganism was also isolated from food contact surfaces. The results provide detailed information about the critical points for the development of *L. monocytogenes* control strategies in cheese processing plants and, moreover, show the relevance of sampling programs of the pathogen, even in small cheese processing plants. The 85 isolates identified as *L. monocytogenes* were classified in four serotypes: 1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b, with 4b dominating in both cheese plants, which is of concern to human health. On the basis of PFGE results (combined profiles *Apal* and *Ascl*), 40 profiles (pulsotypes) were found. Pulsotypes were isolated repeatedly among sampling surveys in plants B and C, suggesting persistence of lineages in the plants. Despite these plants being distant and independent, one pulsotype was shared between them. Plant A presented contamination by more than one pulsotype of *L. seeligeri* and there was a repetitive isolation of one pulsotype of this specie among samplings, suggesting adaptation of the bacterium and the need for control of the *Listeria* genus in this plant. The occurrence of one single pulsotype of *L. monocytogenes* with different serotypes (1/2b and 4b) show that serotyping should follow more refined analyses as the ones of genotypic nature.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, PFGE, cheese manufacturing plant, cheese, serotype.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do fluxograma básico do processamento do queijo Minas frescal nos 3 laticínios e do queijo Prato (Cobocó) no laticínio C.....	37
Figura 2 - (A) Exemplo de amostra que precisou de reisolamento: colônias típicas de <i>Listeria</i> no meio ALOA apresentando halo característico de <i>L. monocytogenes</i> com colônias contaminantes. (B) Colônias típicas de <i>Listeria</i> spp. no meio ALOA e (C) típicas de <i>Listeria</i> spp no meio Oxford, que não necessitaram reisolamento.....	53
Figura 3 – Reação de hemólise característica da espécie <i>L. monocytogenes</i> pelo Teste de CAMP	54
Figura 4 – Número e percentual de amostras positivas para <i>L. monocytogenes</i> , de acordo com a classificação das áreas de maior (Zona 1) e menor (Zona 4) risco de contaminação para produtos alimentícios conforme ILSI (2005)	59
Figura 5 – Formas de queijos e caixas plásticas (vazadas) sobre o piso no laticínio B	60
Figura 6 – Queijos do laticínio C armazenados em caixas plásticas vazadas	61
Figura 7 – Perfis de PFGE obtidos com a enzima <i>Apal</i> . L: Lambda Ladder PFGE Marker; 1b, 2b, 3b, 4b, 5b, 6b, 7b, 8b, 9b, 10b, 11b, 12b: isolados de <i>L. monocytogenes</i> digeridos com <i>Apal</i>	73
Figura 8 – Perfis de PFGE obtidos com a enzima <i>Ascl</i> . L: Lambda Ladder PFGE Marker; 29B, 30B, 31B, 32B, 33B, 34B, 35B, 36B, 37B, 38B, 39B, 40B: isolados de <i>L. monocytogenes</i> digeridos com <i>Ascl</i>	74
Figura 9 – Dendrograma representando relações genéticas (perfis de PFGE <i>Apal</i> e <i>Ascl</i>) entre isolados de <i>L. monocytogenes</i> dos laticínios e isolados incluídos na análise: <i>L. monocytogenes</i> ATCC® 7644, <i>L. monocytogenes</i> EP97, <i>L. monocytogenes</i> EP10 e <i>L. seeligeri</i> . Os códigos de isolados, sorotipos, pontos de isolamento (fonte), ordem de coleta e pulsotipos estão apresentados à direita. Os sorotipos estão representados por cores: 4b; 1/2a; 1/2c. / representam isolados de <i>L. seeligeri</i>	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Diferenciação bioquímica das espécies do gênero <i>Listeria</i>	16
Quadro 2 – Pontos de isolamento de <i>Listeria</i> spp. no laticínio A nas 4 coletas.....	50
Quadro 3 – Pontos de isolamento de <i>Listeria</i> spp. no laticínio B nas 4 coletas.....	51
Quadro 4 – Pontos de isolamento de <i>Listeria</i> spp. no laticínio C nas 4 coletas.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> em leite cru no Brasil.....	26
Tabela 2 – Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> em queijos no Brasil.....	29
Tabela 3 – Características de 25 das propriedades fornecedoras de leite cru para cada um dos laticínios.....	36
Tabela 4 – Bases de composição dos sanitizantes utilizados nos 3 laticínios.....	41
Tabela 5 – Características das instalações e de processamento dos 3 laticínios.....	48
Tabela 6 – Ocorrência de espécies de <i>Listeria</i> em amostras coletadas em 3 laticínios do Estado de São Paulo	49
Tabela 7 – Número de amostras analisadas e positivas para <i>L. monocytogenes</i> em cada ponto de coleta dos 3 laticínios.....	55
Tabela 8 – Ocorrência de <i>Listeria</i> spp e/ou <i>L. monocytogenes</i> em amostras ambientais, em superfícies com e sem contato com alimentos nos 3 laticínios	58
Tabela 9 – Ocorrência de <i>Listeria</i> spp e/ou <i>L. monocytogenes</i> em queijos nos 3 laticínios..	64
Tabela 10 – Resultados da enumeração de <i>Listeria</i> spp nas amostras de produtos positivas do laticínio C, obtidas pelas técnicas de NMP (NMP/g ou mL) e de plaqueamento em superfície de Agar ALOA (UFC/g ou mL)	67
Tabela 11 – Ocorrência de sorotipos de <i>L. monocytogenes</i> isolados dos laticínios B e C ...	69
Tabela 12 – Distribuição de sorotipos de <i>L. monocytogenes</i> nos laticínios B e C	70
Tabela 13 – Pulsotipos presentes nos laticínios, nos respectivos pontos de isolamento.....	81

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Breve histórico, classificação taxonômica de <i>Listeria</i> spp, caracterização, metabolismo e habitat de <i>Listeria monocytogenes</i>	14
2.2 Listeriose	19
2.3 Surtos e casos de listeriose associados a produtos lácteos	24
2.4 <i>Listeria monocytogenes</i> em leite cru	25
2.5 <i>L. monocytogenes</i> em indústrias processadoras de produtos lácteos	26
2.6 <i>Listeria monocytogenes</i> em produtos lácteos.....	28
2.7 Isolamento e detecção de <i>Listeria monocytogenes</i>	30
2.8 Tipagem de <i>Listeria monocytogenes</i>	31
2.9 Características da produção de queijos no Brasil.....	33
3 OBJETIVOS	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Área de estudo.....	36
4.2 Descrição dos laticínios estudados e da produção dos queijos	36
4.3 Amostragem.....	39
4.4 Análises laboratoriais	42
4.4.1 Preparo das amostras	42
4.4.2 Isolamento de <i>Listeria monocytogenes</i>	43
4.4.3 Confirmação das colônias típicas	43
4.4.3.1 Confirmação bioquímica	43
4.4.4 Enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i>	44
4.4.5 Caracterização antigênica	45
4.4.6 Tipagem dos isolados por PFGE	45
4.4.6.1 Isolamento do DNA	45
4.4.6.2 Análises de macrorestrição por PFGE.....	46
4.4.6.3 Análise de dados (PFGE).....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 Características dos laticínios amostrados	48
5.2 Ocorrência de bactérias do gênero <i>Listeria</i>	48

5.2.1 Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> nas amostras de leite cru e pasteurizado	55
5.2.2 Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> no ambiente dos laticínios	57
5.2.3 Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> nos queijos, água e salmoura.....	64
5.3 Diversidade e distribuição de sorotipos de <i>L. monocytogenes</i>	69
5.4 Diversidade de genótipos de <i>Listeria monocytogenes</i> por PFGE	72
6 CONCLUSÕES	88
7 RECOMENDAÇÕES	90
8 REFERÊNCIAS	91
9 APÊNDICE	111

1 INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é um patógeno importante pela gravidade da doença que provoca em humanos, com altas taxas de mortalidade para grupos de risco como recém-nascidos, idosos, pacientes imunocomprometidos, podendo atingir gestantes e causar aborto e infecções no feto.

A listeriose resulta principalmente da ingestão de alimentos contaminados (MEAD et al., 1999; HITCHINS; WHITING, 2001) geralmente processados, armazenados sob refrigeração por longos períodos e consumidos sem aquecimento (McLAUCHLIN, 1996), tal como ocorre com os produtos de laticínios, principalmente queijos. Contaminação de produtos lácteos com *L. monocytogenes* é uma preocupação, devido aos casos de listeriose humana ligados ao consumo desses produtos contaminados, especialmente queijos. Produtos lácteos têm sido relacionados a surtos de listeriose invasiva e não invasiva e apontados como responsáveis por aproximadamente metade dos surtos de listeriose relatados na Europa (LUNDÉN; TOLVANEN; KORKEALA, 2004). Surtos de listeriose têm sido associados a produtos lácteos elaborados com leite cru (GOULET et al., 1995) e pasteurizado (LYYTIKÄINEN et al., 2000; MAIJALA et al., 2001; CDC, 2008).

No Brasil, a listeriose humana é subdiagnosticada e subnotificada (SILVA et al., 2010) e não há registros de casos transmitidos por alimentos (DESTRO, 2006), embora *L. monocytogenes* esteja comprovadamente presente em diversos produtos (PORTO; EIROA, 2001; SAKATE et al., 2003) sobretudo em derivados lácteos (ZAFFARI et al., 2007; CARVALHO; VIOTTO, KUAYE; 2007; BRITO et al., 2008; ABRAHÃO et al., 2008; DE NES et al., 2010). É provável que a maioria dos casos esporádicos de listeriose humana tenha o alimento como veículo de transmissão da *L. monocytogenes* (HOFER; REIS; HOFER, 2006), o que reforça a necessidade de identificar as fontes de infecção e os possíveis alimentos envolvidos, principalmente o leite e derivados.

A cadeia produtiva do leite pode favorecer contaminações por *L. monocytogenes*. As poucas pesquisas sobre ocorrência de *L. monocytogenes* em leite cru conduzidas no Brasil mostram resultados divergentes, mas a detecção da bactéria em queijos (CARVALHO; VIOTTO, KUAYE, 2007; BRITO et al., 2008) é freqüente, principalmente em queijo Minas frescal. O queijo Minas frescal, também conhecido como queijo branco ou frescal, é um dos mais populares no Brasil, com produção disseminada pelo país (ABIC, 2010) principalmente em laticínios de pequeno porte. É um queijo de muito alta umidade a ser consumido fresco (BRASIL, 1997a). Outro queijo amplamente consumido no país é o Prato, um queijo de consistência macia, de cor amarelo clara e sabor suave. No Brasil não há pesquisas sobre contaminações por *L. monocytogenes* especificamente nesse tipo de queijo.

Está emergindo um consenso de que o ambiente de processamento de alimentos representa a fonte mais comum de contaminação por *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo (FENLON; WILSON; DONACHIE, 1996; KATHARIOU, 2002; HOFFMAN et al., 2003) e as indústrias de laticínios são particularmente suscetíveis à contaminação por essa bactéria (KABUKI et al., 2004). Atualmente as grandes indústrias de alimentos vêm tentando minimizar o risco de veiculação de *L. monocytogenes* em produtos prontos para o consumo, porém esse risco ainda existe e não se sabe como as pequenas empresas estão tratando o problema (DESTRO, 2006). Considerando-se que a pasteurização elimina a *L. monocytogenes* no leite cru, o controle dessa bactéria no ambiente industrial pós tratamento térmico é importante. Pesquisas em laticínios mostram que a contaminação cruzada após a pasteurização do leite seria a fonte de contaminação dos queijos. No Brasil, informações sobre contaminações por *L. monocytogenes* em laticínios são escassas. O conhecimento dos padrões de contaminação por essa bactéria ao longo do processo de produção de queijos é importante para prevenir contaminações nos produtos. Além disso, não há estudos comparando perfis genéticos de *L. monocytogenes* isoladas de diferentes laticínios no país.

Este trabalho foi proposto com o objetivo de contribuir para uma melhor compreensão das fontes, da distribuição e da diversidade de *L. monocytogenes* no ambiente de produção de queijos, particularmente o Minas frescal, sendo as técnicas de caracterização antigênica e de Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) ferramentas essenciais para o estudo. Os resultados serão úteis para melhorar as estratégias de controle desse perigo microbiológico nas indústrias de queijos em geral.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Breve histórico, classificação taxonômica de *Listeria* spp, caracterização, metabolismo e habitat de *Listeria monocytogenes*

A história sobre listeriose e *L. monocytogenes* iniciou oficialmente em 1924. O primeiro diagnóstico da doença em humanos ocorreu em um soldado acometido de meningite, no final da primeira Guerra Mundial (ROCOURT; BUCHRIESER; 2007), sendo a identificação da bactéria retrospectiva (COTONI, 1942). Anterior a este caso, não há observações validadas (ROCOURT; BUCHRIESER, 2007), sendo a primeira publicação sobre a descrição de *L. monocytogenes* de Murray; Webb; Swann (1926), relativa ao isolamento da bactéria proveniente de coelhos que apresentaram morte súbita. Segundo Rocourt; Buchrieser (2007), há descrições de isolamento da bactéria anteriores a de Murray e colaboradores (1926), entretanto, outros pesquisadores não teriam depositado seus isolados em coleções permanentes. De acordo com Cotoni (1942), Hülphers teria isolado a bactéria de fígado de coelho em 1911.

A listeriose inicialmente era tratada como uma doença de animais e, embora a associação entre a alimentação com silagem e a infecção pela bactéria em animais fosse conhecida há décadas, *L. monocytogenes* só foi reconhecida como patógeno de origem alimentar para humanos na década de 1980 (LOW; DONACHIE, 1997), quando foram iniciadas pesquisas em decorrência de surtos de listeriose humana ocorridos naquela década, ligados ao consumo de diversos alimentos contaminados com a bactéria. Anterior à década de 1980, a listeriose era considerada uma doença rara e esporádica em humanos (SAUDERS; WIEDMANN, 2007). *L. monocytogenes* só foi incluída na lista de patógenos alimentares quando ocorreu um surto de listeriose no Canadá, em 1981, devido ao consumo de salada de repolho contaminada (WARRINER; NAMVAR, 2009).

Diversos trabalhos têm sido publicados com foco na epidemiologia e patogênese (HOF, 2003a; KATHARIOU, 2002), identificação (GASANOV; HUGUES; HANSBRO, 2005), tipagem de *L. monocytogenes* (WIEDMANN, 2002), evolução (BUCHRIESER, 2007; RAGON et al., 2008), características genéticas (BUCHRIESER, 2007), sobrevivência em condições adversas e mecanismos de adaptação (PAN; BREIDT JR; KATHARIOU, 2006; GANDHI; CHIKINDAS, 2007), além de resistência a antimicrobianos (CONTER et al., 2009) e controle da bactéria em indústrias de alimentos (TOMPKIN, 2002). As diversas pesquisas sobre a bactéria nos últimos anos mostram que *L. monocytogenes* não é mais um “patógeno emergente”.

A taxonomia atual de *Listeria* é resultado de mais de 25 anos de estudos de laboratórios em diferentes países (ROCOURT; BUCHRIESER, 2007). O gênero *Listeria* pertence à família *Listeriaceae*, à ordem *Bacillales*, à classe *Bacilli* e ao filo *Firmicute* (NCBI, 2010) e compreende seis espécies - *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri* e *Listeria grayi*, como evidenciado por valores de homologia de DNA, seqüenciamento de DNA e 16S rRNA, propriedades de quimiotaxonomia e análises de enzima multilocus (ROCOURT; BUCHRIESER, 2007). Recentemente foi proposta a classificação de uma nova espécie dentro do gênero *Listeria*, a *Listeria marthii*, após a obtenção de 4 isolados não produtores de hemólise em ágar sangue, provenientes de amostras de solo e água nos Estados Unidos (GRAVES et al., 2010).

Dentre as espécies de *Listeria*, somente *L. monocytogenes* é considerada consistentemente patogênica para humanos (ALLERBERGER, 2002; GILOT; CONTENT, 2002; CHAMBEL et al., 2007) embora infecções ocasionais por *L. seeligeri* (GILOT; CONTENT, 2002), *L. ivanovii* (CUMMINS; FIELDINGT; McLAUCHLIN, 1994; LOW & DONACHIE, 1997; RAMAGE et al., 1999; GILOT; CONTENT, 2002; SNAPIR; VAISBEIN; NASSAR, 2006), *L. grayi* (TODESCHINI et al., 1998) e *L. innocua* (PERRIN; BEMER; DELAMARE, 2003) já tenham sido relatadas.

Todas as espécies de *Listeria* têm sido isoladas do solo, vegetais em decomposição, silagem, esgoto, água, carnes, leite cru, queijos e resíduos de abatedouros (GILOT; CONTENT, 2002). Além desses ambientes, a espécie *L. monocytogenes* tem sido encontrada em hortaliças e material fecal de várias espécies de mamíferos, aves e peixes, em geral portadores assintomáticos, que liberam a bactéria nas fezes. O solo e os vegetais em decomposição são os principais reservatórios da bactéria (RYSER; DONNELLY, 2001). Isso explica o fato de *L. monocytogenes* ser facilmente encontrada em alimentos de origem animal e vegetal, “*in natura*” ou processados, incluindo leite e derivados. Apesar da ampla distribuição na natureza, *L. monocytogenes* e outras *Listeria* spp. ocorrem em baixa população na maioria dos *habitat* naturais. Ambientes naturais e de indústrias de alimentos podem ser fontes de linhagens patogênicas de *L. monocytogenes*, mas é improvável que sejam fontes diretas de infecção humana (SAUDERS; WIEDMANN, 2007).

Os principais testes bioquímicos para diferenciar as espécies de *Listeria* estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 – Diferenciação bioquímica das espécies do gênero *Listeria*

Espécie	Manitol	Ramnose	Xilose	Virulência ^a	β-Hemólise ^b	Camp-test ^f	
						<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	-	+	-	+	+	+ ^g	-
<i>L. ivanovi</i> ^h	-	-	+	+	+	-	+
<i>L. innocua</i>	-	V ^d	-	-	-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V ^d	+	-	-	-	-
<i>L. seeligeri</i>	-	-	+	-	+	+	-
<i>L. grayi</i> ^e	+	V ^d	-	-	-	-	-

^aTestes com camundongos. ^bÁgar sangue de carneiro. ^cLinhagens que fermentam ribose são classificadas como *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* e as não fermentadoras de ribose como *L. ivanovii* subsp. *londiniensis*. ^dV: biotipos variáveis. ^eInclui duas subespécies: *L. grayi* subsp. *murrayi* reduz nitrato / *L. grayi* subsp. *grayi* não reduz nitrato. ^fAdaptado de PAGOTTO et al. (2001). ^gDe 30 cepas, a ATCC 15313 não produziu reação positiva. Fonte: adaptado de PAGOTTO et al. (2001) e HITCHINS (2003).

Listeria é um bastonete Gram-positivo pequeno (0,5 µm de diâmetro e 1 a 2 µm de comprimento) com extremidades arredondadas. As células são encontradas isoladas ou em cadeias curtas, podendo aparecer em arranjos em formas de “V”, “Y” ou paliçada e não produzem esporos ou cápsulas. A bactéria é móvel por poucos flagelos peritríquios quando cultivada entre 20 e 25 °C, porém é imóvel ou apresenta fraca motilidade a 37 °C. O seu cultivo em meio semi sólido resulta em crescimento com forma característica de “guarda-chuva” a aproximadamente 0,5 cm abaixo da superfície do meio, devido à natureza microaerófila do organismo (ROCOURT; BUCHRIESER, 2007).

A publicação do sequenciamento do genoma de *Listeria* ocorreu em 2001, sendo o primeiro sequenciamento das espécies *L. monocytogenes* linhagem EGD do sorotipo 1/2a com 2.944,528 pares de base (pb) e de *L. innocua* linhagem CLIP 11262 sorotipo 6a com 3.011,209 pb (GLASER et al., 2001). Dois anos após, o sequenciamento de outras 3 linhagens de *L. monocytogenes* (NELSON et al., 2004) associadas a doença de origem alimentar foi publicado e, posteriormente, o sequenciamento de *L. welshimeri* (HAIN et al., 2006). O sequenciamento completo do genoma dessas bactérias tem contribuído para o entendimento da virulência e da evolução de *L. monocytogenes*, além de fornecer evidências sobre o processo de evolução do gênero (BUCHRIESER, 2007).

L. monocytogenes se diferencia de outros patógenos causadores de doenças de origem alimentar pela capacidade de se multiplicar em altas concentrações (10%) de NaCl e de sobreviver em concentrações ainda maiores, além de crescer num limite de atividade de água (aw) de 0,93 (ROCOURT; BUCHRIESER, 2007). A bactéria é capaz de se multiplicar em ampla faixa de temperatura (1 – 45 °C) e de se adaptar e sobreviver em condições de

estresse por ácidos. Sua habilidade para colonizar, se multiplicar e persistir em ambientes de indústrias de alimentos provavelmente reflete sua capacidade de sobreviver em ambientes naturais por longos períodos (SAUDERS; WIEDMANN, 2007). Para uma bactéria que não forma esporos, ela resiste bem aos efeitos deletérios do congelamento, dessecação e aquecimento (UHITIL et al. 2004). Psicotrófica, o controle dessa bactéria na cadeia de produção de alimentos é um desafio, especialmente para indústrias de laticínios (KOZAK et al., 1996).

A diferença para um alimento ser considerado de alto ou baixo risco para a listeriose está nas características do mesmo em possibilitar que *L. monocytogenes* se multiplique e atinja altos números. Em alimentos que oferecem condições para a multiplicação do patógeno, uma população inicial baixa poderá atingir contagens consideráveis durante o armazenamento sob refrigeração prolongado (ILSI, 2005). Alimentos assim devem ser mantidos em temperaturas de 4,4°C ou inferiores, para retardar o crescimento da bactéria, em caso de contaminação (HHS/USDA, 2003), que é acentuado em temperaturas de abuso (ILSI, 2005). Fatores de risco associados a alimentos envolvidos em surtos de listeriose incluem ausência de tratamento térmico que destrua a bactéria, composição do alimento que favoreça sua multiplicação e o consumo desses alimentos por indivíduos imunodeprimidos e mulheres grávidas (FSAI, 2005).

Linhagens de *L. monocytogenes* se diferenciam com base em determinantes antigênicos expressos na superfície da bactéria. Variações antigênicas são produzidas por diferentes estruturas de superfície, incluindo ácido lipoteicóico, proteínas de membrana e organelas extracelulares, como flagelos e fímbrias. Essas diferenças podem ser identificadas por tipagem sorológica (sorotipagem) (GRAVES; SWAMINATHAN; HUNTER, 2007). Linhagens de *L. monocytogenes* são divididas em sorotipos baseados em antígenos somáticos (O) e flagelares (H) (SEELIGER; HÖHNE, 1979) e a sorotipagem é baseada em reações de aglutinação com anti-soros específicos para diferenciar os antígenos na superfície celular (SJÖMAN, 2010).

Treze sorotipos de *L. monocytogenes* foram identificados (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e e 7) (FARBER; PETERKIN, 1991; OKWUMABUA et al., 2005), sendo a maioria dos casos de listeriose humana associada a 1/2a, 1/2b e 4b (GRAVES; SWAMINATHAN, HUNTER 2007; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007) e a maior parte dos surtos relacionada a linhagens do sorotipo 4b (LUNDÉN; TOLVANEN; KORKEALA, 2004; SWAMINATHAN; GERNER-SMITH, 2007), inclusive na Europa, onde este é o sorotipo mais comum em casos de listeriose humana (LUNDÉN; TOLVANEN; KORKEALA, 2004). Entretanto, há uma aparente escassez do sorotipo 4b entre isolados provenientes de alimentos (KATHARIOU, 2002). É possível que outros sorotipos sejam melhor adaptados a

alimentos e a ambientes de processamento, como 1/2c, que apresentou maior eficiência de aderência em superfícies de aço inoxidável do que o 4b (NORWOOD; GILMOUR, 1999).

Os sorotipos 1/2a e 1/2b também são responsáveis por um número significativo de casos esporádicos da doença humana. Hipóteses poderiam explicar o aparente predomínio do sorotipo 4b em casos epidêmicos de listeriose humana e dos sorotipos 4b, 1/2a e 1/2b em casos esporádicos: humanos seriam mais expostos a esses sorotipos do que a outros e/ou esses sorotipos possuem potencial patogênico único para humanos (WIEDMANN, 2002). O predomínio do sorotipo 4b em listeriose humana sustenta a hipótese que cepas desse sorotipo possuem maior potencial patogênico do que outros (1/2a e 1/2b) (LOPEZ et al., 2007). Ainda, atributos relativos à ecologia e fisiologia do organismo - como sobrevivência e crescimento em alimentos - tornam linhagens desses sorotipos mais prováveis de colonizar ambientes de processamento e contaminar alimentos prontos para consumo armazenados sob refrigeração e atingir níveis infectantes (KATHARIOU, 2002). O predomínio desses poucos sorotipos envolvidos em listeriose humana pode explicar o baixo número de casos de listeriose, em situações de exposição freqüente a alimentos contaminados com *L. monocytogenes* (TOMPKIN, 2002).

Uma característica marcante da estrutura da população de *L. monocytogenes* é a sua distinção em 3 linhagens filogenéticas. Inicialmente, duas principais *Linhagens* foram diferenciadas, por análises principalmente baseadas em eletroforese de enzima multilocus e Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), sendo uma terceira linhagem subsequentemente reconhecida, com base em variações de genes de virulência, ribotipagem e arranjos de DNA (RAGON et al., 2008). A *Linhagem I* inclui os sorotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e e a *Linhagem II* corresponde aos sorotipos 1/2a, 3a, 1/2c e 3c (ILSI, 2005; RAGON et al., 2008). Históricos clínicos sugerem que há diferença no potencial patogênico entre as 3 Linhagens, uma vez que a *Linhagem I* contém a maioria dos isolados relacionados à listeriose humana (JEFFERS et al., 2001), enquanto cepas da *Linhagem II* são mais frequentemente isoladas de alimentos (GRAY et al., 2004). Já as cepas da *Linhagem III* raramente causam doença humana e são mais envolvidas em surtos de listeriose animal. Dados sugerem que possa existir uma linhagem de *L. monocytogenes* (*Linhagem I*) com maior probabilidade de causar doença em humanos quando presente nos alimentos (ILSI, 2005). Alguns autores, como Brosch; Chen, Luchansky (1994) apresentam essa classificação de forma diferente, considerando pertencentes à *Linhagem I*, os sorotipos 1/2a, 1/2c e 3b e, à *Linhagem II*, os sorotipos 1/2b, 4b, 4d e 4e.

Embora pareça haver diferença de virulência entre linhagens de *L. monocytogenes*, com base nos conhecimentos atuais, qualquer linhagem (cepa) da bactéria deve ser considerada potencialmente patogênica para humanos (TOMPKIN, 2002; HAMDÍ et al., 2007).

2.2 Listeriose

A listeriose tem sido considerada uma doença de origem alimentar atípica, de grande preocupação para a saúde pública devido à gravidade da enfermidade, às altas taxas de mortalidade (30%) (ROCOURT et al., 2003), mesmo em casos de tratamentos com antimicrobianos adequados (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007), ao longo período de incubação e à predileção por indivíduos que apresentam alguma limitação na imunidade mediada por células T (FARBER; PETERKIN, 1991; ALLERBERGER, 2002).

Existem duas formas de listeriose associadas com *L. monocytogenes*: não invasiva e invasiva. A forma invasiva ocorre principalmente em pessoas do grupo de risco para a doença (LUNDÉN; TOLVANEN; KORKEALA, 2004). Ao contrário de outras infecções alimentares, a listeriose invasiva não provoca sintomas gastrointestinais em humanos. Depois de ingeridas, as células colonizam o intestino, são fagocitadas por macrófagos, onde se multiplicam no citoplasma e espalham-se pelo organismo (KATHARIOU, 2002) ficando protegidas dos mecanismos de defesa do hospedeiro, o que limita a eficácia de terapia com drogas (HOF, 2003b). As manifestações clínicas da listeriose em adultos são decorrentes principalmente de infecções no sistema nervoso central (SNC) e bacteremia, mas podem incluir diversas outras infecções como endocardite, peritonite, pneumonia e osteomielite. A infecção do SNC por *L. monocytogenes* se manifesta tipicamente como meningite ou encefalite e geralmente apresenta sintomas prodrômicos que incluem dor de cabeça, febre e indisposição (FARBER; PETERKIN, 1991).

A maioria dos casos de listeriose humana ocorre em idosos, gestantes e indivíduos imunocomprometidos, sendo que aproximadamente 1/3 dos casos ocorre em gestantes (ILSI, 2005). A bactéria é capaz de atravessar a barreira placentária, causando infecções no feto, provocando aborto ou infecções em recém nascidos incluindo meningite, encefalite, septicemia neonatal, além de nascimento prematuro e morte fetal (PARIDA et al., 1998). Gestantes que contraem a doença, e seus fetos com frequência são congenitamente infectados, podem não apresentar qualquer sintoma e, quando estes ocorrem, são típicos de uma gripe leve (JAY, 2000).

Trata-se de um patógeno oportunista (FAO/WHO, 2004; RANGON et al., 2008), embora registrem-se casos em humanos imunocompetentes (HOFER; NASCIMENTO; OLIVEIRA, 1998). A principal defesa do organismo contra a listeriose é a imunidade mediada por células e pessoas com disfunções das células T parecem ser particularmente passíveis de contrair a doença (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007). Dentre os animais, os ruminantes domésticos são os mais afetados pela listeriose (HO; LAPPI,

WIEDMANN, 2007) com sinais clínicos da doença semelhantes aos que ocorrem em humanos (BORUCKI et al., 2004).

A listeriose é relativamente rara em crianças e adultos imunocompetentes, razão pela qual apresenta discreta incidência na maior parte do mundo (HOFER; REIS, HOFER, 2006). Dentro da população susceptível, é possível identificar sub-grupos mais prováveis do que outros de adoecer gravemente e morrer devido à listeriose. Assim, foi estimado que indivíduos transplantados, portadores de câncer no sangue e com AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome) apresentam 2584, 1364 e 865 maior susceptibilidade relativa para a doença, respectivamente, do que indivíduos com menos de 65 anos sem comprometimento imunológico (FAO/WHO, 2004; ILSI, 2005). Atualmente existem fatores que colaboram para a expansão da população altamente susceptível à *L. monocytogenes*, entre eles a epidemia de AIDS, o uso de medicamentos imunossupressivos em transplantados, as terapias para câncer e o aumento da população idosa.

Existem relatos de surtos de gastroenterite febril causados por *L. monocytogenes* (DALTON et al., 1997; AURELI et al., 2000; CARRIQUE-MAS et al, 2003), uma forma mais branda da listeriose em humanos, não invasiva, com sintomas não específicos e, por isso sub-diagnosticada (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007), que parece não afetar grupos populacionais específicos (DESTRO, 2006). Há descrições de casos de gastroenterite por *L. monocytogenes* sem evolução para formas graves de listeriose (OOI; LORBER, 2005).

Ressalte-se que existem outras vias de infecção por *L. monocytogenes*, além da oral, como a via respiratória, através de aerossóis (MARTH, 1988). Em 1994 Radostits; Blood; Gay (1994) relataram que pessoas do meio rural apresentavam maior possibilidade de contaminação por *L. monocytogenes*, devido ao contato com a bactéria em situações específicas, como o manejo de animais de produção infectados, com casos de dermatite na pele de veterinários após o auxílio a parto distócitos, além de casos de conjuntivite. Entretanto, atualmente se sabe que populações do meio urbano são frequentemente expostas ao microrganismo através de alimentos contaminados, e as indústrias de alimentos podem ser pontos importantes da contaminação, especialmente de alimentos prontos para o consumo.

Vários fatores de virulência envolvidos no ciclo de vida intracelular da *L. monocytogenes* têm sido identificados, além de outros produtos da bactéria, que contribuem para a sua sobrevivência no hospedeiro (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001). Um grupo de genes, localizados em um “cluster”, codifica fatores de virulência como fosfolipases (*plcA* e *plcB*), listeriolisina O (*hly*), metaloprotease (*mpl*) e proteína *actA* e dependem da proteína regulatória *prfA* (KATHARIOU, 2002). Há outros genes que codificam fatores de virulência fora desse grupo, como os das internalinas (RAGON et al., 2008).

Embora a listeriose represente apenas 0,02% das ocorrências de doenças de origem alimentar, ela está entre as causas mais frequentes de mortes provocadas por esse tipo de doença. Na União Européia tem sido relatada uma incidência de listeriose humana entre 2 e 10 casos/milhão (JEMMI; STEPHAN, 2006). Nos EUA, Em 1999, o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) estimou uma ocorrência de 2500 casos de listeriose por ano nos EUA, com aproximadamente 500 mortes (MEAD et al., 1999). Dados mais recentes relatam incidência de 0,27 casos/100.000 habitantes/ano (CDC, 2007). Dados do CDC indicam que a incidência de listeriose humana tem diminuído nos últimos anos nos EUA (UNIVERSITY OF MINNESOTA, 2007) e a provável razão da queda é a intensificação de esforços para reduzir a contaminação dos alimentos. Já na Alemanha, Hof; Szabo; Becker (2007) relataram que o número de casos registrados de listeriose havia dobrado nos últimos dois anos. Na França, de 1999 a 2005 a incidência de listeriose diminuiu de 4,5 para 3,5 casos/milhão de pessoas, mas, em 2006, aumentou para 4,7 casos/milhão de pessoas. Em outros 8 países da Europa, a incidência de listeriose tem aumentado ou permanecido relativamente alta desde 2000 (GOULET et al., 2008).

No Brasil, pesquisas mostram a circulação de *L. monocytogenes* na espécie humana provocando graves infecções e revelando portadores assintomáticos (HOFER; REIS; HOFER, 2006). Até o momento, a notificação de casos de listeriose em humanos não é compulsória no país, o que resulta na falta de dados que ilustrem a magnitude do problema (FERRONATTO, 2010). No Brasil há registros de casos de listeriose humana antes mesmo da sua associação com transmissão alimentar, ocorrida na década de 1980. SUASSUNA et al. (1969) isolaram *L. monocytogenes* de líquido, sendo provavelmente o primeiro caso descrito no antigo Estado da Guanabara. HOFER; MENEZES (1969) isolaram o microrganismo de secreção vaginal de mulheres com histórico de abortos crônicos, havendo duas amostras positivas em 42 casos estudados. ESPER et al. (1978) diagnosticaram 12 casos de meningite causados por *L. monocytogenes*, entre 1975 e 1977. Registros mais recentes de listeriose no Brasil incluem 3 casos de meningite no Distrito Federal (HOFER; NASCIMENTO; OLIVEIRA, 1998) 5 casos de bebês com meningite em São Paulo (LANDGRAF et al., 1999); listeriose em pacientes transplantados renais (HOFER; MELLE; HOFER, 1999); em caso de pneumonia (DE SÁ et al., 2004) e casos de peritonite bacteriana espontânea em idosos portadores de cirrose (TOYOSHIMA et al., 2006). Em Porto Alegre, *L. monocytogenes* foi detectada em 33,7% (50/148) das placentas humanas relacionadas a abortos e partos prematuros (SCHWAB; EDELWEISS, 2003).

No Brasil, dentre os isolados provenientes de humanos, o sorotipo 4b tem predominado, seguido de 1/2a. A caracterização sorológica de 71 amostras de *L. monocytogenes* isoladas de processos patológicos e de portadores humanos entre 1969 e 1983, revelou predomínio do sorotipo 4b (50,70%) (HOFER; PESSÔA, MELLES, 1984).

HOFER; RIBEIRO; FEITOSA (2000) avaliaram a distribuição e a frequência de espécies e sorovares em isolados com diagnóstico presuntivo de *Listeria* (n=3.112), provenientes de diferentes fontes, colecionados entre 1971 e 1999. Dentre os isolados de humanos, predominou *L. monocytogenes*, com 3 tipos antigênicos predominantes: 4b (45,4%), 1,2a (20,9%) e 1/2b (19,1%). Hofer; Reis; Hofer (2006) caracterizaram a distribuição de sorovares de *L. monocytogenes* entre 255 amostras do gênero *Listeria* isoladas de diferentes materiais clínicos de origem humana de várias regiões do Brasil, coletados no período de 1969 a 2000, e observaram que o sorotipo 4b foi o mais incidente seguido por 1/2a. Em 13 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de casos de listeriose humana ocorridos entre 1995 e 2005, no Estado de São Paulo, Lemes-Marques; Cruz; Destro (2007) também encontraram predomínio do sorotipo 4b, seguido por 1/2a. Ressalte-se que 1/2a tem sido o sorotipo mais freqüentemente isolado de produtos lácteos no Brasil (HOFER; REIS; HOFER, 2006, BRITO et al., 2008; ABRAHÃO et al., 2008; DE NES et al., 2010).

A dose infectante (DI) de *L. monocytogenes* para humanos não está estabelecida, devido à impossibilidade de se realizar pesquisas com voluntários saudáveis, à variação da suscetibilidade e condição imunitária do hospedeiro e à variabilidade na virulência do patógeno. Outra dificuldade de se estabelecer a DI é que os dados coletados de surtos de listeriose podem não representar a real contaminação do alimento incriminado. Devido ao tempo entre a exposição e o início dos sintomas, pode haver multiplicação, morte ou injúria da bactéria no alimento, ou mesmo não haver mais o alimento disponível. A listeriose apresenta um período de incubação longo, que varia de 3 a 70 dias (CVE, 2003), mas geralmente excede a 30 dias (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007), o que dificulta identificar o agente causador e rastrear o alimento contaminado. A maioria dos casos de listeriose humana ocorre de forma esporádica, ao invés de surtos alimentares (ROCOURT et al., 2003).

Devido à natureza ubíqua, *L. monocytogenes* frequentemente contamina produtos crus e, por contaminação cruzada, outros alimentos. Assim, pessoas são frequentemente expostas à bactéria embora a listeriose seja relativamente rara em humanos (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007). CHEN et al. (2003) explicam que consumidores parecem ser expostos frequentemente a baixas populações de *L. monocytogenes*, mas essa exposição raramente resulta em doença. Em pesquisa com camundongos, SCHLECH III (1988) relatou uma DI oral $<10^2$ células, mas GOLNAZARIAN et al. (1989) estimaram DI entre 10^3 e 10^9 células e STEPHENS et al. (1991) o valor de 10^{10} células. Dados coletados em surtos de listeriose sugerem que os alimentos incriminados continham contagens elevadas de *L. monocytogenes*, cerca de 10^6 UFC/g (FDA/FSIS, 2003), o que realça a necessidade de minimizar a exposição humana a altas populações da bactéria. Dados mais recentes (FAO/WHO, 2004) sugerem que contagens inferiores a 10^2 UFC/g em alimentos

não são infectantes, mas não excluem essa possibilidade. Assume-se que menos do que 1000 células possam causar a doença em populações susceptíveis (FDA, 2007). Como alertaram Golnazarian et al. (1989) e Swaminathan; Gerner-Smidt (2007), na estimativa de risco, deve-se considerar que pessoas saudáveis podem resistir à ingestão de um número de células de *L. monocytogenes* que pode causar doença em indivíduos imunodeprimidos.

Apesar da controvérsia sobre os valores de DI para *L. monocytogenes*, considera-se o critério de “ausência em 25 ou 50g” adequado como limite de tolerância para o microrganismo em alimentos (FAO/WHO, 2004). Entretanto, contagens inferiores a 10^2 /g em alimentos sólidos e <10 /mL em alimentos líquidos podem não ser detectadas por plaqueamento direto nos meios usuais de isolamento (HEISICK; ROSAS-MARTY; TATINI, 1995). A alternativa mais eficiente seria a contagem em tubos através da técnica do Numero Mais Provável (NMP) (TRANT; HITCHINS, 1996).

Existem políticas sanitárias relacionadas com a presença de *L. monocytogenes* em alimentos em muitos países. Os EUA estabeleceram tolerância zero para a bactéria, em alimentos prontos para o consumo, incluindo produtos lácteos, com base na possibilidade de que a dose mínima infectante possa ser baixa (RYSER; MARTH, 1991). No Canadá, os alimentos são classificados em categorias, de acordo com as condições que oferecem para o crescimento da bactéria, vida de prateleira e armazenamento refrigerado ou não. Assim, os critérios microbiológicos para *L. monocytogenes* naquele país variam de ausência em 50g até < 100 UFC/g no alimento e, para cada situação, são recomendadas diferentes ações (LAKE et al., 2005). Com base na legislação europeia, os processadores de alimentos devem garantir a ausência do patógeno, no caso de alimentos prontos para consumo destinados a grupos de risco, ou então o alimento deve apresentar uma população máxima de 100 UFC/g ou mL, até a data de validade, quando o alimento permite a multiplicação da bactéria, ou no momento em que estes passam pelo controle de qualidade indústria, no caso de não oferecerem condições para multiplicação do patógeno, conforme estabelece o EU Reg. 2073/ 2005 (COMMISSION REGULATION, 2005). No Brasil, a única categoria de alimentos com padrão para *L. monocytogenes* são queijos de média, alta e muito alta umidade, para os quais a legislação estabelece ausência da bactéria em 25g, em 5 amostras do produto de um mesmo lote (BRASIL, 1996; ANVISA, 2001).

2.3 Surtos e casos de listeriose associados a produtos lácteos

No que concerne às listerioses transmitidas por produtos lácteos, há surtos de grande repercussão. Entre 1949 a 1957 houve uma ocorrência massiva de listeriose em Halle-Alemanha, a qual acredita-se ter sido ligada ao consumo de leite cru contaminado (SEELIGER, 1961¹ apud LUNDÉN; TOLVANEN; KORKEALA, 2004). Em 1983, em Massachusetts, um surto de listeriose associado a leite pasteurizado contaminado acometeu 49 pessoas e causou 14 mortes (FLEMMING et al., 1985). Este surto e outro ocorrido na Califórnia, em 1985, com 142 casos e 48 mortes, atribuído ao consumo de queijo estilo mexicano contaminado (LINNAN et al., 1988), foram importantes para esclarecer o papel do alimento na disseminação da listeriose. Na década de 1980, ocorreram diversos surtos relacionados a queijos contaminados (HOF, 2003a) e, desde então, há relatos de surtos de listeriose de origem alimentar ligados a várias categorias de alimentos (LIANOU; SOFOS, 2007). Em 1994, o consumo de leite pasteurizado achocolatado contaminado resultou em surto de gastroenterite nos EUA (DALTON et al., 1997). Em Massachusetts (EUA), em 2007, ocorreu um surto atribuído ao consumo de leite pasteurizado contaminado que acometeu 5 pessoas resultando em 3 mortes (CDC, 2008). Na Finlândia, o consumo de manteiga causou um surto envolvendo 25 pessoas, com 6 mortes LYYTIKÄINEN et al. (2000). Outros surtos associados ao consumo de queijos contaminados ocorreram na França (GOULET et al., 1995; JACQUET et al., 1995), Canadá (GAULIN, 2003), Suécia (CARRIQUE-MAS, et al., 2003) Japão (MAKINO et al., 2005), EUA (MacDONALD et al., 2005) e Suíça (BÜLA; BILLE; GLAUSER, 1995; BILLE et al., 2006). Surto recentes na Europa, atribuídos ao consumo de queijo tipo “Quargel” resultaram em 4 mortes (FRETZ et al., 2010).

Numa avaliação quantitativa de risco realizada nos EUA, foi estimado que produtos lácteos apresentam alto risco relativo para listeriose humana (FDA/USDA, 2003), tendo sido incriminados em 9 dos 26 surtos relatados. Outra avaliação estimou o risco de ocorrência de listeriose humana a partir da ingestão de quatro alimentos prontos para o consumo: leite pasteurizado, sorvete, peixe defumado e carnes fermentadas. O leite pasteurizado foi apontado como o de maior risco de causar listeriose na população, sendo a estimativa de ocorrência de 9,1 casos/10 milhões de pessoas/ano. Apesar de dados epidemiológicos evidenciarem baixa ocorrência da bactéria em leite pasteurizado, o produto oferece condições para a multiplicação do microrganismo durante o armazenamento e é amplamente consumido pela população. O sorvete, além da baixa ocorrência de *L.*

¹ Seeliger, H.P.R. 1961. Listeriosis. Hafner, New York.

monocytogenes no produto, não oferece condições de crescimento para a bactéria (FAO/WHO, 2004) nas condições em que é armazenado.

2.4 *Listeria monocytogenes* em leite cru

Produtos de laticínios são freqüentemente envolvidos na transmissão de *L. monocytogenes* pois, além de ricos em nutrientes, a cadeia de produção do leite oferece diversas possibilidades para a contaminação dos mesmos. A contaminação do leite cru por *L. monocytogenes* pode ser proveniente de fontes ambientais, durante a ordenha e, neste caso, frequentemente a bactéria é encontrada em baixos números (KOZAK et al., 1996; MEYER-BROSETA et al., 2004).

Fatores como baixa qualidade de silagem ($\text{pH} > 4,0$), desinfecção inadequada de toalhas de secagem de tetos, tubulações de ordenha sujas e iluminação insuficiente da sala de ordenha são associados à contaminação de leite cru por *L. monocytogenes* (SANAA et al., 1993). Operações de produção de leite têm importância particular pois a *L. monocytogenes* é um patógeno animal que pode ser compartilhado entre animais de produção com ou sem sintomas clínicos da doença (HO; LAPPI; WIEDMANN, 2007). Silagem contaminada é uma fonte clássica de infecção por *L. monocytogenes* para animais, que podem adoecer ou tornar-se portadores assintomáticos ao consumi-la, eliminando a bactéria nas fezes e no leite. Embora a mastite causada por *L. monocytogenes* seja rara, vacas infectadas eliminam números altos da bactéria no leite (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 1994). Assim, ruminantes podem perpetuar os ciclos de transmissão da *L. monocytogenes* e altas cargas da bactéria oriundas do meio rural podem representar uma fonte de introdução do patógeno na cadeia de produção de laticínios (IVANEK; GRÖHN; WIEDMANN, 2006).

Após a ordenha, durante a estocagem do leite na fazenda, o transporte em caminhões-tanque e o armazenamento nos silos das indústrias, sob refrigeração, a *L. monocytogenes* pode se multiplicar (BEMRAH et al., 1998). A presença de *L. monocytogenes* em leite cru é preocupante, pois ainda existe o hábito de consumi-lo diretamente ou utilizá-lo na produção de derivados sem qualquer tratamento térmico prévio.

Em leite cru, a ocorrência de *L. monocytogenes* é variável, dependendo do local, do ponto de coleta na cadeia de produção, da amostragem e do método utilizado para sua detecção. Compilação de dados de pesquisas nos EUA indicaram que aproximadamente 3,1% do leite cru processado poderia estar contaminado com *L. monocytogenes* (RYSER; MARTH, 1991). Estudos mais recentes com leite cru de tanques de fazendas nos EUA, encontraram prevalências de 5,9% ($n=948$) (MURAOKA et al., 2003) e 6,5% ($n=861$) (VAN

KESSEL et al., 2004). Taxas de contaminação semelhantes foram encontradas no Canadá (2,7%) e Europa (4,1%) (RYSER; MARTH, 1991) e mais elevadas (13%) no México (VAZQUEZ-SALINAS; OSCAR; IRMA, 2001). Na Suécia, *L. monocytogenes* foi isolada em 1% de 294 amostras de leite cru de tanques de fazendas e em 19,6% das amostras coletadas nos silos de recepção de uma indústria (WAAK; THAM; DANIELSSON-THAM, 2002). MASSA et al. (1990), na Itália, não isolaram a bactéria em leite cru (N=40). No Brasil, a ocorrência de *L. monocytogenes* em leite cru varia de 0 a 37,8% (Tabela 1).

Tabela 1 – Ocorrência de *L. monocytogenes* em leite cru no Brasil

Estado	Nº de amostras analisadas	Amostras positivas (%)	Referência
São Paulo	20	0,0	DESTRO et al. (1991)
São Paulo	220	9,5	MOURA et al. (1993)
São Paulo	20	0,0	CASAROTTI et al. (1994)
Paraíba	60	15,0	FIGUEIREDO (2000)
Ceará	45	37,8	CATÃO; CEBALOS (2001)
Bahia	6	16,7	SILVA et al. (2003)
Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo	210	0,0	NERO (2005)
Minas Gerais e Rio de Janeiro	42	0,0	ARCURI et al. (2006)

2.5 *L. monocytogenes* em indústrias processadoras de produtos lácteos

L. monocytogenes pode ser introduzida em diversos pontos da cadeia de produção de alimentos (TOMPKIN, 2002). A fonte primária de *L. monocytogenes* em alimentos industrializados é o ambiente de processamento, no qual, através da matéria-prima, a bactéria é introduzida e, segundo Fenlon; Wilson; Donachie (1996) e Kathariou (2002), certas linhagens tornar-se adaptadas.

O leite cru pode ser uma fonte de introdução de *L. monocytogenes* na indústria (KOZAK et al., 1996; WAAK; THAM; DANIELSSON-THAM, 2002) mas há outras possibilidades como solas de calçados (KOZAK et al., 1996), vestuário e, possivelmente, portadores humanos saudáveis (ROCOURT; COSSART, 1997; WAGNER et al., 2006). A presença de *Listeria* no solo e em instalações de laticínios é provavelmente a causa mais freqüente da contaminação de queijos (MENENDEZ et al., 1997).

L. monocytogenes é capaz de formar biofilmes que servem de fontes contínuas de contaminação de produtos. Em biofilme a bactéria é mais resistente a condições de estresse e a sanitizantes do que na forma plantônica (PAN; BREIDT JR; KATHARIOU, 2006). Segundo Tompkin (2002), a formação de biofilmes não é importante e sim a sobrevivência da bactéria em nichos difíceis de higienizar, com acúmulo de umidade e resíduos de alimentos.

Embora uma diversidade de *L. monocytogenes* possa habitar e persistir em ambientes de processamento de alimentos, informações sobre como tais linhagens colonizam esses ambientes ainda são limitadas (SAUDERS; WIEDMANN, 2007). A introdução de linhagens causadoras de doença humana nos ambientes de processamento de alimentos pode ter origem ambiental, de fontes ainda não conhecidas (KATHARIOU, 2002).

No caso de laticínios, um dos poucos estudos que conseguiram comprovar a ligação entre *L. monocytogenes* e *Listeria* no seu ambiente natural, demonstrou, por ribotipagem, relação entre contaminações por *Listeria* provenientes de fazendas (vacas de leite, leite cru e silagem) e o ambiente de processamento de leite (ARIMI et al., 1997). Waak; Tham; Danielsson-Tham (2002) na Suécia, também observaram tipos clonais compartilhados entre o leite de silos de uma indústria e o coletado de fazendas.

A pasteurização do leite cru destrói *L. monocytogenes* porém não elimina o risco posterior de contaminação de produtos lácteos (ROSSI et al., 2008). Há um interesse crescente na detecção de *L. monocytogenes* em indústrias de alimentos. Estudos têm mostrado que linhagens de *L. monocytogenes* se estabelecem em indústrias de alimentos, onde permanecem residentes por meses ou anos (MIETTINEN; BJÖRKROTH; KORKEALA, 1999) servindo de fontes de contaminação.

Em abril de 2009 foi publicada no Brasil a Instrução Normativa número 9 (BRASIL, 2009) que apresenta Procedimentos de Controle de *L. monocytogenes* em Produtos de Origem Animal Prontos para o Consumo e determina o monitoramento de *L. monocytogenes* em alimentos com pH > 4,4 ou atividade de água > 0,92 ou concentração de cloreto de sódio <10 %. O queijo Minas frescal é enquadrado nessa categoria de alimentos. De acordo com o Art. 5º dessa portaria, amostras de produtos de origem animal prontos para o consumo devem ser coletadas nos estabelecimentos fabricantes de produtos de origem animal, pelo Serviço de Inspeção de Federal (SIF) e encaminhadas aos laboratórios pertencentes à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, para a pesquisa de *L. monocytogenes*. Resultados positivos para *L. monocytogenes* desencadearão procedimentos de inspeção do processo de produção e revisão dos registros dos produtos de origem animal prontos para o consumo.

No Brasil, pesquisas (FIGUEIREDO, 2000; SILVA et al., 2003; BRITO et al., 2008) mostram variação de ocorrência de *L. monocytogenes* em ambientes de laticínios e há relatos de não isolamento da bactéria nesses ambientes (ROCHA, 2004; BORGES, 2006). Em outros países são relatadas amplas faixas de taxas de contaminação (0,0 a 90,5%) por *L. monocytogenes* em ambiente de laticínios (WAGNER et al., 2006; D'AMICO; DONNELLY, 2009).

2.6 *Listeria monocytogenes* em produtos lácteos

O binômio tempo-temperatura (75° C/15 s) da pasteurização do leite é suficiente para destruir populações de *L. monocytogenes* de 10^5 a 10^6 /mL (JAY, 2000). Portanto, quando a bactéria é detectada em leite pasteurizado, as causas mais prováveis são pasteurização inadequada ou contaminação pós processamento (RYSER; MARTH, 1991).

Em produtos lácteos fermentados, a viabilidade de *Listeria* depende das interações entre os fatores que afetam sua sobrevivência como atividade de água; quantidade, tipo e atividade das culturas lácticas; pH; quantidade de sal e temperatura durante o processamento e o armazenamento. Em iogurte, *Listeria* pode sobreviver ao processo de fermentação e ser encontrada após 30 dias de fabricação, em pH em torno de 4,0. Em manteiga, foi demonstrada a sobrevivência de *L. monocytogenes* durante o armazenamento do produto congelado (-18°C) por 70 dias (RYSER; MARTH, 1991).

Os queijos são os produtos lácteos mais comumente contaminados por *L. monocytogenes*, principalmente os de alta e média umidade. A presença de *L. monocytogenes* em queijos é preocupante pois geralmente são produtos armazenados por longos períodos sob refrigeração, o que pode permitir a multiplicação da bactéria, além do fato de serem consumidos sem aquecimento prévio.

Os queijos macios são veículos conhecidos de surtos de listeriose. Os chamados "queso blanco" ou "Latin-style fresh cheese" representam um grupo heterogêneo de queijos macios brancos e não maturados produzidos e consumidos em diferentes países da América Latina. O queijo Minas Frescal é o representante brasileiro deste grupo e pode ser produzido utilizando-se diferentes tecnologias (ARAGON-ALEGRO, 2007). Queijos macios maturados por fungos oferecem condições para o desenvolvimento de *L. monocytogenes*, possivelmente em função de flutuações de pH durante a maturação (LOMONACO et al., 2009). Já queijos duros, como o parmesão, apresentam pH ácido e baixa atividade de água e não permitem o crescimento de *L. monocytogenes* (RYSER; MARTH, 1991).

Queijos comerciais, geralmente fabricados com leite pasteurizado, têm sido considerados produtos nutritivos e seguros. Entretanto, podem servir de veículo para a transmissão de bactérias patogênicas (MULLAN, 2009). *L. monocytogenes* tem sido isolada de diversos tipos tradicionais de queijos em vários países, em frequências variáveis (PINTADO et al., 2005; LOMONACO et al., 2009). A bactéria foi isolada em 6,4% (21/329) das amostras de queijos macios oriundas de países da Europa e, como detalhe de importância, foi verificada maior ocorrência em queijos elaborados com leite pasteurizado do que em queijos fabricados com leite cru (RUDOLF; SCHERER, 2001), indicando que a contaminação ocorre durante o processamento na indústria. No Brasil, uma ampla variação de ocorrência (zero a 41%) de *L. monocytogenes* em queijos tem sido observada (Tabela 2).

Tabela 2 – Ocorrência de *L. monocytogenes* em queijos no Brasil

Cidade (Estado)	Tipo de queijo	<i>Listeria monocytogenes</i>		Referência
		N*	n (%)	
Campinas-SP	Minas frescal	20	2 (10,0)	DESTRO et al. (1991)
Piracicaba-SP	Minas frescal	20	0 (0,0)	CASAROTTI et al. (1994)
São Paulo-SP	Minas frescal	30	1 (3,3)	FURLANETTO et al. (1996)
R. de Janeiro-RJ	Minas frescal ^X	17	7 (41,2)	SILVA et al. (1998)
	Minas frescal e ricota ^Y	33	1 (3,0)	
	Maturados com fungo	53	3 (5,7)	
São Paulo-SP	Minas frescal	20	5 (25,0)	VIEIRA; MASSAGUER (1999)
S.J. Rio Preto-SP	Minas frescal ^X	30	0 (0,0)	PERESI et al. (2001)
	Minas frescal ^Y	30	0 (0,0)	
Manaus-AM	De coalho	58	1 (1,72)	RAMOS; COSTA (2003)
Fortaleza-CE	De coalho	84	16 (19,0)	BRANCO et al. (2003)
Campinas-SP	Minas frescal	25	0 (0,0)	ROCHA (2004)
Pernambuco ^Z	De coalho	12	7 (5,5)	DUARTE et al. (2006)
		7		
Fortaleza-CE	De coalho	70	2 (2,9)	SOUZA et al. (2006)
Campinas-SP	Ricota	45	3 (6,7)	ESPER (2006)
R. G. do Sul ^Z	Diversos	80	3 (3,8)	ZAFFARI et al. (2007)
Campinas-SP	Minas frescal ^{CL}	31	3 (9,7)	CARVALHO et al. (2007)
	Minas frescal ^{AD}	31	0 (0,0)	
	Minas frescal ^{UF}	31	0 (0,0)	
Serro-MG	Queijo-de-minas	40	0 (0,0)	BRANT et al., (2007)
Juiz de Fora-MG	Minas Frescal	55	6 (11,0)	BRITO et al. (2008)
Paraná ^Z	Diversos	90	6 (6,7)	ABRAÃO et al. (2008)
Minas Gerais	Serra da Canastra	27	0 (0,0)	ANDRADE (2009)

N* = número de amostras analisadas.

n (%) = número e respectiva porcentagem de amostras positivas para *L. monocytogenes*.

^X = artesanal ^Y = industrializado ^Z = diversos municípios do Estado.

^{CL} = cultura láctica ^{AD} = acidificação direta ^{UF} = ultra-filtração

Além de queijos, no Brasil há relato de isolamento de *L. monocytogenes* em amostra de creme de leite pasteurizado (1 de 19 amostras) (MARTINS; KABUKI; KUAYE, 2009, 2009) enquanto a bactéria não tem sido isolada de sorvetes (ABRAHÃO et al., 2008; MARTINS; KABUKI; KUAYE, 2009).

2.7 Isolamento e detecção de *Listeria monocytogenes*

Os métodos convencionais do *Bacteriological and Analytical Method* (BAM) do Food and Drug Administration (FDA) (HITCHINS, 2003) e do *International Organization of Standards* (ISO) 11290 são largamente empregados para a detecção de *Listeria* em todos os tipos de alimento, além dos métodos do USDA e da *Association of Analytical Chemists* (AOAC/IDF) *Method* 993.12, para determinados alimentos e amostras ambientais (GASANOV, HUGHES; HANSBRO, 2005).

Os métodos de isolamento de *L. monocytogenes* em alimentos envolvem etapas de enriquecimento, semeadura em meios sólidos seletivos e isolamento para posterior identificação. Os meios mais utilizados são os ágaros Oxford e o Palcam, recomendados pelos métodos oficiais, os quais, contudo, não diferenciam *L. monocytogenes* das demais espécies de *Listeria*.

Ágaros seletivos que permitem a diferenciação da *L. monocytogenes* das outras espécies, em uso paralelo com os convencionais, são recomendados em protocolos oficiais como o do FDA, pois permitem diferenciar colônias de *L. monocytogenes*/*L. ivanovii* daquelas de outras espécies de *Listeria*, quando presentes. Dentre esses meios, está o Ágar *Listeria* segundo Ottaviani e Agosti (ALOA), no qual colônias de *Listeria* spp apresentam bordas regulares e cor azul esverdeada, devido à produção de β -D-glucosidase, evidenciada pela hidrólise de um substrato cromogênico específico (5-bromo-4-cloro-3-indoxil-beta-D-glucopiranosídeo). O meio contém um substrato para a fosfolipase C, presente somente nas espécies de *L. monocytogenes* e em algumas linhagens de *L. ivanovii*, que proporciona o aparecimento de um halo opaco ao redor da colônia (STESSL et al., 2009).

Para a identificação de *L. monocytogenes*, testes bioquímicos comerciais (kits) são empregados como alternativa aos testes convencionais. O API *Listeria* (bioMérieux) é um desses kits e possui aprovação pela AOAC. Para a detecção rápida de *Listeria*, existem várias técnicas, como os testes imunológicos baseados em anticorpos específicos para *Listeria*, que têm sido aplicados em análises de alimentos e são amplamente divulgados pela sua simplicidade, sensibilidade, acurácia e possibilidade de serem realizados a partir do

meio de enriquecimento, dispensando etapas de preparo de amostras. Diversos desses testes comerciais têm aprovação por agências regulatórias e GASANOV; HUGHES; HANSBRO (2005) compilam informações sobre testes imunológicos e baseados em imunocaptura. Existe ainda alternativa do uso de métodos moleculares, como hibridização do DNA e testes baseados em Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Para a identificação de *L. monocytogenes* por PCR, têm sido empregados iniciadores para genes que codificam fatores de virulência como a listeriolisina (NORTON et al., 2000; PIATTI et al. 2004), além de sistemas de PCR automatizada, como o BAXTM (ZHANG et al., 2004). Esses métodos identificam a espécie mas não diferenciam linhagens de *L. monocytogenes*, o que é necessário no caso de investigações epidemiológicas.

2.8 Tipagem de *Listeria monocytogenes*

Para diferenciar linhagens de *L. monocytogenes* podem ser empregados métodos fenotípicos, que detectam características expressas pelos microrganismos, incluindo a sorotipagem (WIEDMANN, 2002). Embora apresente limitações em estudos epidemiológicos (LUKINMAA, 2004), a sorotipagem permite verificar prevalências de sorotipos e rastrear contaminações (WIEDMANN, 2002) e é geralmente utilizada como método de “triagem” em estudos de tipagem de *L. monocytogenes* (DOUMITH et al., 2004).

Métodos baseados em DNA podem ser utilizados para tipagem de *L. monocytogenes* e permitem avaliar relações genéticas de linhagens de diferentes fontes, servindo de orientação para o controle da bactéria. As técnicas moleculares, baseadas em hibridização ou sequenciamento do DNA, PCR, análises com enzimas de restrição, oferecem vantagem em relação aos métodos fenotípicos, pois são baseadas em diferenças no genoma e não dependem da expressão gênica (GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005).

Embora o sequenciamento do DNA seja o método mais preciso para avaliar relações genéticas entre microrganismos, é uma técnica limitada a laboratórios especializados e, portanto, inviável de ser aplicado em análises de rotina (GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005). *Multilocus sequence typing* (MLST) é um exemplo de método que utiliza o sequenciamento do DNA de múltiplos genes ou fragmentos de genes para diferenciar subtipos bacterianos (WIEDMANN, 2002).

Como alternativa ao sequenciamento, existem métodos que fornecem uma precisão relativa da variabilidade genética, em uma amostragem elevada, em curto tempo. Dentre eles estão a ribotipagem, a PFGE, a análise dos fragmentos de restrição de tamanhos polimórficos de DNA (RFLP) e a análise do polimorfismo do DNA amplificado ao acaso

(RAPD), todos já bem estabelecidos e usados rotineiramente (GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005). Várias técnicas moleculares têm sido usadas para diferenciar linhagens de *L. monocytogenes* (GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005) sendo as mais empregadas a ribotipagem e a PFGE (WIEDMANN, 2002).

Um ou mais métodos de genotipagem podem ser combinados com métodos fenotípicos. PFGE tem sido empregada com sorotipagem (CHASSEIGNAUX *et al.* 2001; SJÖMAN, 2010), ribotipagem (LUKINMAA *et al.* 2004) eletroforese de enzima multilocus (HARVEY; GILMOUR 2001) e métodos baseados em PCR (AUTIO *et al.* 2003).

Para tipagem de *L. monocytogenes*, PFGE tem sido bastante empregada pela sua acurácia e reprodutibilidade (GRAVES; SWAMINATHAN, 2001; CHASSEIGNAUX *et al.*, 2001; LUKINMAA *et al.*, 2003). PFGE é uma das técnicas de melhor reprodutibilidade e apresenta alto nível de sensibilidade e discriminação (BROSCH; CHEN; LUCHANSKY, 1994) e é considerada o “Padrão Ouro” para subtipagem da bactéria pelo CDC, que utiliza subtipos caracterizados por essa técnica (WIEDMANN, 2002) numa rede internacional de tipagem de patógenos causadores de doenças de origem alimentar, o PulseNet International (PULSENET, 2009).

PFGE é um técnica de fracionamento de DNA de alto peso molecular (10 kb a 10Mb), por eletroforese em gel de agarose, com o uso de campo elétrico alternado em duas direções (NASSONOVA, 2008). A técnica, desenvolvida por Schwartz; Cantor (1984), facilita análises estruturais e funcionais do genoma de vários organismos. A variante mais empregada da técnica é “*contour-clamped homogeneous electric field*” (CHEF). A mobilidade da molécula de DNA e separação da mesma em campo pulsado dependem do número de parâmetros inter relacionados, sendo o mais significativo o tempo de pulso que, dependendo da programação, facilita o fracionamento das moléculas de DNA de diferentes tamanhos (NASSONOVA, 2008).

Para análises por PFGE, O DNA é obtido geralmente a partir de células em suspensão, com a digestão da parede celular e proteínas. Para evitar quebras mecânicas da molécula em solução, as células são embebidas em agarose, antes da lise. Os blocos de agarose, contendo o DNA, são submetidos à digestão por enzimas de restrição que reconhecem 6 a 8 pares de base e cortam o DNA no local de restrição (SJÖMAN, 2010).

L. monocytogenes é caracterizada pelo baixo conteúdo de G+C no DNA (39%) e essa característica é utilizada na escolha das enzimas que reconhecem sequências que contêm somente G e C, com o objetivo de obter enzimas de restrição de baixa frequência de corte (GLASER *et al.* 2001). Diferentes enzimas têm sido utilizadas para *L. monocytogenes* como *Apal* (GGGCC/C), *Ascl* (GG/CGCGCC), *NotI* (GC/GGCCGC) and *Smal* (CCC/GGG), onde “/” indica o local de restrição. O número e o tamanho dos fragmentos do DNA, separados e visualizados em gel de eletroforese são comparados, permitindo estabelecer

uma relação genética entre linhagens. A PFGE é considerada a técnica mais eficaz de tipagem, pela sua simplicidade, eficiência de custo e tempo e alto poder discriminatório (GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005), que depende das enzimas de restrição empregadas, sendo as mais recomendadas a *Ascl* (LUKINMAA et al., 2004) e a *Apal* (GRAVES; SWAMINATHAN, 2001), inclusive pelo PulseNet (2009).

PFGE tem sido utilizada por pesquisadores tanto da área de microbiologia clínica quanto de alimentos (DESTRO; LEITÃO; FARBER, 1996; LEITE et al., 2006; GRAVENSEN et al., 2000; FUGETT et al., 2007). FUGETT et al. (2007) verificaram poder discriminatório significativamente maior com PFGE do que com ribotipagem, ao caracterizar linhagens de *L. monocytogenes*. A ribotipagem é simples e altamente padronizada, porém menos discriminatória do que a PFGE, além do custo alto do equipamento. PFGE é um método demorado comparado à ribotipagem, mas a descrição de um protocolo padronizado de análise de *L. monocytogenes* em 30 h tornou esse método competitivo com a ribotipagem automatizada (LUKINMAA et al., 2004).

2.9 Características da produção de queijos no Brasil

A elaboração de queijos constitui uma das mais importantes atividades das indústrias de laticínios no Brasil. Dentre os produtos de laticínio, os queijos representam 34% da produção industrial sob inspeção federal (EMBRAPA, 2007). Os queijos Minas frescal e Prato representam cerca de 30% do montante comercializado sob inspeção federal no país, (EMBRAPA, 2000). A produção dos queijos Minas frescal e Prato concentra-se, principalmente, em indústrias de pequeno e médio porte.

O queijo Minas frescal é obtido por coagulação enzimática do leite, com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas (BRASIL, 1997a). O Minas frescal caracteriza-se por apresentar valores de pH em torno de 4,9–5,3, alta atividade de água, níveis de umidade entre 55 a 58% (SILVA et al. 2003) e concentrações de sal entre 1,4 a 1,6% (CARVALHO; VIOTTO; KUAYE, 2007). Desta forma, o queijo Minas frescal oferece condições para a multiplicação de *L. monocytogenes*, conforme demonstraram Naldini; Viotto; Kuaye (2009).

Já o queijo Prato é definido como um queijo maturado que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas. É um queijo gordo de média umidade, obtido de massa de coágulo semi cozida e maturado por pelo menos 25 dias (BRASIL, 1997b). Normalmente é um queijo fechado, podendo, entretanto, apresentar olhaduras.

Apresenta, em média 42% a 44% de umidade; 26% a 29% de gordura, concentrações de sal variando entre 1,6% e 1,9% e pH entre 5,2 e 5,4 (SILVA, 2005). Em geral, o queijo Prato é produzido em formas retangulares de 500 g, 2 ou 3 kg ou em formas esféricas (ABIC, 2010). O queijo Prato pode, opcionalmente, ter as seguintes denominações: Queijo Prato (Lanche ou Sandwich), Queijo Prato (Cobocó) ou Queijo Prato (Esférico ou Bola) (BRASIL, 1997b).

Há uma escassez de pesquisas sobre *L. monocytogenes* em laticínios no Brasil, especialmente em produtores de Minas frescal. Ressalte-se que não há referências de estudos sobre a ocorrência de *L. monocytogenes* em queijo Prato no país. Assim, torna-se relevante avaliar a presença e a disseminação de *L. monocytogenes* em linhas de processamento de queijos, a fim de gerar informações que auxiliem no controle desse perigo microbiológico na linha de produção e previnam a contaminação do produto. A diversidade de sorotipos de *L. monocytogenes* isolados de indústrias de produtos lácteos foi pouco explorada e não há pesquisas comparando perfis genéticos (PFGE) desse patógeno isolado de mais de um laticínio no Brasil. Com base nisso, propôs-se este estudo.

3 OBJETIVOS

Geral

Avaliar a ocorrência, a distribuição e a caracterização sorológica e genotípica de *Listeria monocytogenes* em laticínios produtores de queijos durante 12 meses.

Específicos

- Investigar a ocorrência de *L. monocytogenes* no sistema de produção de queijo Minas frescal, do leite cru recebido nos laticínios até o final da produção.
- Fazer um diagnóstico dos pontos de contaminação por *L. monocytogenes* no ambiente de fabricação do queijo Minas Frescal e Prato nos laticínios.
- Quantificar *Listeria monocytogenes* nas amostras positivas de leite e queijo.
- Caracterizar os isolados identificados como *L. monocytogenes* por sorotipagem e pelo perfil genotípico, por PFGE, e verificar a prevalência de linhagens em cada ponto do processo de produção.
- Relacionar os perfis dos isolados, traçar sua disseminação no leite cru, na linha de processamento e nos queijos e propor estratégias para a prevenção de contaminações do produto.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

A pesquisa foi conduzida em 3 laticínios produtores de queijo tipo Minas frescal localizados no Estado de São Paulo, nas regiões de São Carlos, Pirassununga e Piracicaba.

4.2 Descrição dos laticínios estudados e da produção dos queijos

Os laticínios, doravante denominados “A”, “B” e “C”, foram avaliados com base na Lista de Verificação de Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos da RDC N° 275 (ANVISA, 2002), cuja resolução dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos.

Recebimento de leite cru refrigerado, registros em serviços de inspeção oficiais e rotina de fabricação de queijo Minas frescal foram critérios utilizados na seleção dos laticínios para a pesquisa. A Tabela 3 apresenta um resumo das características de produção e armazenamento de leite cru de 25 das propriedades fornecedoras de leite para cada laticínio. Para os laticínios A e B, essas propriedades correspondem a 42% dos fornecedores e, para o laticínio C, representam 46% das propriedades fornecedoras.

Tabela 3 – Características de 25 das propriedades fornecedoras de leite cru para cada um dos laticínios

Características	Região de estudo		
	Número de fazendas		
	Laticínio A	Laticínio B	LaticínioC
Ordenha mecânica	13	17	15
Ordenha manual	12	8	10
Resfriamento do leite em tanque de expansão	13	22	22
Resfriamento do leite em latão de imersão	12	3	3

Nenhum dos laticínios tinha qualquer rotina de monitoramento ambiental de *L. monocytogenes*. Apenas o laticínio A realizava análise de uma amostra de um dos produtos da indústria (leite pasteurizado ou iogurte), semestralmente, para pesquisa de *L. monocytogenes*.

Nos três laticínios o queijo Minas fresco era produzido basicamente de acordo com o fluxograma da Figura 1 sem a utilização de bactérias lácticas específicas. Na Figura 1 consta também o fluxograma de produção do queijo Prato do laticínio C, pois na última coleta, esse laticínio estava por encerrar as atividades de produção para reforma nas instalações e não foi possível realizar a coleta do lote de queijo Minas, durante o processamento. Assim, na 4ª coleta desse laticínio foram incluídas amostras de queijo Prato (variedade Cobocó) na fase final de processamento, a etapa de embalagem.

Figura 1 – Representação esquemática do fluxograma básico do processamento do queijo Minas fresco nos 3 laticínios e do queijo Prato (Cobocó) no laticínio C

De uma indústria para outra havia pequenas modificações no fluxograma de produção do queijo Minas, conforme detalhado a seguir: o leite, após pasteurizado e resfriado, era transferido por sistema canalizado de aço inoxidável até o tanque de coagulação previamente higienizado. Em seguida eram adicionados cloreto de sódio (nos laticínios A e B), cloreto de cálcio e ácido láctico com aquecimento do leite, a 40 °C (laticínio A), a 38 °C (laticínio B) e a 42 °C (laticínio C), coalho no leite e manutenção nas respectivas temperaturas por 30 a 40 min para formação do coágulo. O coágulo era cortado com liras de metal e, após, era feita a mexedura do mesmo com pás de agitação.

No laticínio A, a massa do coágulo era retirada manualmente do tanque com as formas plásticas e colocada sobre uma mesa de aço inoxidável, onde era feita a enformagem e posteriormente a viragem do queijo. No laticínio B não era utilizada mesa de

enformagem. Os manipuladores retiravam a massa do coágulo do tanque com a própria forma, onde a massa era imediatamente acondicionada. As formas com os queijos eram empilhadas em caixas plásticas e a viragem do queijo era realizada nas caixas plásticas, sem utilização de mesa. No laticínio C o soro era escoado pelo dreno do tanque e a massa diretamente enformada e colocada sobre uma mesa de enformagem e viragem de queijo (a mesa era de madeira nas duas primeiras coletas e foi substituída por outra de aço inoxidável, na 3ª e 4ª coletas).

Todos os laticínios utilizavam caixas plásticas para acondicionar os queijos e, no caso do Minas frescal, após a enformagem, os queijos permaneciam em câmara fria (4º C), para aumentar a firmeza dos mesmos. Apenas no laticínio A havia o cuidado de colocar as caixas sobre estrados, devidamente higienizados. Nos laticínios B e C, as caixas eram colocadas diretamente sobre o piso, durante o processamento do queijo. Nos três laticínios, as caixas eram empilhadas e os queijos armazenados em câmara fria (por aproximadamente 16 h), até o momento da embalagem. Dependendo da demanda, os queijos eram mantidos por menos tempo na câmara fria e eram embalados no mesmo dia da produção. Assim, na 1ª coleta de cada laticínio, os queijos permaneceram na câmara fria por apenas 4h antes da embalagem. Nas demais coletas, permaneceram por aproximadamente 16h.

No laticínio C, a salga dos queijos Minas frescal, após sua permanência na câmara fria, era realizada em tanque de salmoura localizado na mesma câmara. Os queijos permaneciam na salmoura por 15 a 20 min. Em seguida, eram retirados da salmoura, com caixas plásticas, onde permaneciam por alguns minutos, antes da embalagem. O queijo Prato, após a prensagem, era colocado no tanque de salmoura por aproximadamente 6 a 8 h. Em seguida, eram retirados da salmoura com caixas plásticas, onde permaneciam na câmara fria para secagem por 24 a 72 h, antes da embalagem. A salmoura do laticínio C, que também era utilizada para outros tipos de queijo, era preparada a cada 8 a 10 meses e pasteurizada em intervalos de 4 meses, aproximadamente, e sempre continha resíduos sólidos de queijo na superfície. O laticínio não possuía registros de controle das datas de pasteurização da salmoura. Os laticínios A e B, não utilizavam salmoura no processamento do Minas frescal, sendo o sal adicionado diretamente no leite, antes da coagulação.

Os queijos Minas dos três laticínios eram embalados em sacos plásticos que posteriormente eram selados com um grampo de metal e mantidos em câmara fria, dentro de caixas plásticas, até serem destinados à comercialização. O prazo de validade dos queijos era de 30 dias a contar da data da embalagem, sob refrigeração. Somente no rótulo dos queijos do laticínio A havia recomendação para armazenamento dos queijos em temperaturas de até 8°C, nos outros dois laticínios não constava esse tipo de recomendação

nas nas embalagens dos queijos. O queijo Prato do laticínio C era embalado a vácuo e o prazo de validade era de 60 dias.

4.3 Amostragem

Em um período de 12 meses - outubro de 2008 a setembro de 2009 - foram realizadas 4 visitas em cada laticínio, com intervalo de aproximadamente 2 meses, totalizando 12 visitas. No laticínio A, as coletas foram realizadas nos meses de outubro/2008, janeiro, abril e julho/2009; no laticínio B, em novembro/2008, fevereiro, maio e agosto/2009 e, no laticínio C, em dezembro/2008, março, junho e setembro/2009. Foram coletadas amostras de leite cru dos silos de recepção e armazenamento, leite pasteurizado, água utilizada na sala de processamento, salmoura de salga dos queijos, coágulo, queijos durante o processamento e embalados, e de diversos pontos do interior das indústrias. Os locais de amostragem foram escolhidos de forma que representassem os pontos com maior probabilidade de abrigar *L. monocytogenes*. As amostras foram coletadas durante o processo de produção dos queijos.

Leite fluido cru dos silos de recepção e armazenamento

Foram coletadas porções de aproximadamente 500 mL, diretamente das torneiras previamente higienizadas com álcool 70° GL e flambadas, em frascos esterilizados.

Leite fluido pasteurizado

Foram coletadas porções de aproximadamente 500 mL, em frascos esterilizados, diretamente da tubulação de saída de leite recém pasteurizado para o tanque de coagulação. O local foi previamente higienizado com álcool 70° GL e flambado.

Água da torneira da sala de processamento

Porções de mais de 1000 mL da água utilizada no processamento do queijo foram coletadas diretamente das torneiras ou mangueiras higienizadas com álcool 70° GL e flambadas, em frascos esterilizados, contendo 0,1 mL de uma solução de tiosulfato de sódio a 10% esterilizada, para cada 100 mL de água coletada, para neutralizar o cloro presente (SILVA et al., 2005).

Salmoura

Foram coletados aproximadamente 500 mL de salmoura do tanque, após homogeneização da mesma, com concha esterilizada, em frasco esterilizado.

Coágulo e queijos prontos

Imediatamente após o corte e mexedura da massa, foram coletados aproximadamente 500 g de coágulo, de diversos pontos do tanque de coagulação, com concha estéril, em frasco esterilizado.

Queijos enformados: foram coletadas 5 amostras de aproximadamente 500 g cada, aleatoriamente, cada amostra sendo composta por 5 queijos (na 1ª coleta de cada laticínio). A partir da 2ª coleta de cada laticínio, para aumentar a probabilidade de isolamento da bactéria, cada uma das 5 amostras era composta por 15 queijos.

Queijos embalados: imediatamente após a embalagem, 5 peças do mesmo lote eram retiradas aleatoriamente para análise.

Superfícies dos queijos: a partir da 3ª coleta de cada laticínio, foram coletadas amostras da superfície de 45 queijos, após a permanência dos mesmos na câmara fria, imediatamente antes da embalagem. Das 45 amostras eram coletadas 3 amostras, compostas por 15 queijos cada, com luvas estéreis e esponja esterilizada, umedecida em solução salina (0,85%) peptonada (0,1%). Após a coleta, as esponjas eram imediatamente colocadas em embalagens plásticas estéreis contendo 100 mL de Caldo de Enriquecimento de *Listeria* Tamponado (BLEB).

Na época da 4ª coleta do laticínio C, o laticínio estava encerrando as atividades, para uma reforma nas instalações. Por esse motivo, não foi possível realizar a coleta de amostras de queijo em fase de processamento do 4º lote de queijo Minas frescal. Assim, na 4ª coleta deste laticínio foram colhidas amostras de leite cru e pasteurizado, salmoura, mãos de manipuladores, utensílios, ambiente e queijos Minas frescal (embalados no dia anterior ao da coleta), além da superfície de queijos tipo Prato, imediatamente antes da embalagem.

Amostras ambientais

Preliminarmente as áreas de processamento de cada laticínio foram inspecionadas para verificação dos detalhes das instalações (ex.: número e distribuição dos compartimentos do laticínio, instalações hidráulicas) e dos equipamentos (tipos, número e distribuição), com vistas à elaboração da planta baixa com indicação do “lay-out” de cada indústria (dados não apresentados). Foram amostrados os seguintes pontos: pisos (salas de pasteurização, processamento e câmaras frias); ralos (sala de processamento e câmara fria); paredes, estrados da câmara fria e superfícies de contato com o queijo (paredes do tanque de coagulação, pás de agitação, liras de corte, formas, caixas plásticas, mãos

enluvas dos manipuladores do queijo, mesas de enformagem e embalagem e embaladeira).

As coletas dos pisos, paredes, tanque de coagulação e mesas foram feitas com esponjas (Sponge Bag Esteril – Inlab) umedecidas em solução salina (0,85%) com peptona (0,1%), adicionada de neutralizantes de sanitizantes: 0,01% de tiosulfato de sódio (Nuclear) (SILVA et al., 2005) para compostos clorados; 0,5% de polisorbato (Synth) para sanitizantes à base de compostos fenólicos e 0,07% de lecitina de soja (Purex) para resíduos de quaternário de amônio (EVANCHO et al., 2002), em área delimitada por moldes de papel esterilizado de 0,125 m², em um conjunto de 8 pontos, somando 1,00 m², analisados em conjunto. As superfícies foram amostradas com esponja, nas quatro linhas paralelas do molde e no sentido perpendicular. Os ralos foram amostrados no seu interior e na parte interna do tampo, com esponja umedecida na mesma solução, sem área delimitada, pela dificuldade da operação. As caixas foram amostradas com esponja, no seu interior e parte externa. As pás de agitação, liras, formas, estrados, embaladeira de queijo e mãos de manipuladores (foram amostrados 1 a 3 indivíduos) foram amostradas com zaragatoas umedecidas na mesma solução neutralizante descrita acima. Imediatamente após a coleta, as esponjas foram colocadas em bolsas contendo 60 mL de Caldo de Enriquecimento para *Listeria* Tamponado (BLEB; Difco) e as zaragatoas em tubos contendo 15 mL do mesmo caldo de enriquecimento.

As coletas das superfícies com contato com alimentos, com exceção do filtro de leite cru, eram sempre realizadas após a higienização das mesmas, imediatamente antes do processamento dos queijos. Já as coletas das superfícies sem contato com alimentos eram feitas durante a produção dos queijos, ou seja, esses locais não eram higienizados imediatamente antes das coletas. A Tabela 4 apresenta as bases de composição dos sanitizantes empregados nos processos de higienização das indústrias.

Tabela 4 – Bases de composição dos sanitizantes utilizados nos 3 laticínios

Local de aplicação	Base dos sanitizantes		
	Laticínio A	Laticínio B	Laticínio C
Pisos e outras superfícies sem contato com alimentos	Hipoclorito de sódio	Hipoclorito de sódio	Hipoclorito de sódio
Equipamentos ^a	Hipoclorito de sódio Ácido peracético ^b	Hipoclorito de sódio Amônia quaternária ^c	Hipoclorito de sódio
Utensílios ^a	Hipoclorito de sódio	Hipoclorito de sódio Amônia quaternária ^c	Hipoclorito de sódio

^asuperfícies com contato com alimentos; ^bsanitização de tubulações de leite e pasteurizador;

^csanitização da superfície do tanque de coagulação, formas de queijos e mesa de embalagem.

Imediatamente após a coleta, as amostras eram refrigeradas. Para o transporte até o laboratório de Higiene e Laticínios (ESALQ/USP), foram utilizadas caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, sendo que o início das análises se deu imediatamente após a chegada das amostras ao laboratório.

4.4 Análises laboratoriais

As amostras foram analisadas pelo método preconizado pelo FDA descrito no *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) (HITCHINS, 2003). Como meios seletivos, foram utilizados o ágar Oxford com suplemento (Oxoid) e o ágar *Listeria* segundo Ottaviani and Agosti (ALOA) com suplementos (AES Chemunex). A linhagem de *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644 foi utilizada como controle positivo nas análises.

4.4.1 Preparo das amostras

Leite e salmoura: após homogeneização, 25 mL da amostra foram inoculados em 225 mL de BLEB e incubados (48 h / 30 °C). A partir da 2ª coleta de cada laticínio, para aumentar as chances de isolamento da bactéria, a unidade analítica de leite e salmoura passou de 25 para 50 mL, que foram inoculados em 450 mL de BLEB.

Coágulo: a amostra de coágulo foi homogeneizada com uma espátula estéril e 25 g retirados e homogeneizados em stomacher com 225 mL de BLEB e incubados (48 h /30 °C). Queijos: foram cortados com auxílio de faca estéril, homogeneizados e, 25g foram homogeneizados em stomacher em 225 mL de caldo BLEB e incubados por 48 h / 30 °C. A partir da 2ª coleta de cada laticínio, a unidade analítica de coágulo e dos queijos passou para 50 g, e foi inoculada em 450 mL de BLEB.

Água: foi utilizado o método de filtração em membrana (SILVA et al., 2005): um volume de 1000 mL era medido em proveta estéril e, posteriormente, filtrado em membrana estéril com porosidade de 0,22 µm (Millipore). Após, a membrana utilizada para a filtração era colocada em 100 mL de BLEB, seguido de incubação por 48 h a 30 °C.

Zaragatoas e esponjas: amostras coletadas com zaragatoas e esponjas foram homogeneizadas em vórtex e stomacher, respectivamente, antes da incubação no próprio meio utilizado na coleta (BLEB), por 48 h /30 °C.

Após 4 horas do início do período de incubação, era feita a adição dos antimicrobianos (todos da marca Sigma) acriflavina (10 mg/L); ácido nalidíxico (40 mg/L); cicloheximida (50 mg/L) no caldo de enriquecimento (BLEB) contendo as amostras.

4.4.2 Isolamento de *Listeria monocytogenes*

A partir de cada recipiente de BLEB incubado, foi feito estriamento com alça microbiológica nos ágar Oxford e ALOA, que foram incubados a 35 °C / 24-48 h e 37 °C / 24 h, respectivamente. As placas de ALOA inoculadas foram incubadas por 24h adicionais, para visualização de eventual desenvolvimento de halo tardio em colônias de *L. monocytogenes*. Após a incubação, foi verificada a presença de colônias típicas de *Listeria* (esféricas, pretas, rodeadas por halo preto de hidrólise de esculina no meio Oxford) e colônias típicas de *L. monocytogenes* (azuis esverdeadas com halo opaco no meio ALOA) e também de *Listeria* spp. Assim, 3 colônias típicas de *Listeria* spp de cada meio foram selecionadas e purificadas em placas com Ágar Soja Trypticase adicionado de 0,6% de Extrato de Levedura (TSA-YE; Difco).

4.4.3 Confirmação das colônias típicas

Obtidas as colônias isoladas nos meios seletivos, essas eram estriadas em placas com TSA-YE que eram incubadas a 35 °C / 24 h. As colônias eram submetidas à coloração de Gram, teste de catalase (reação com H₂O₂ a 3% de concentração) e motilidade. A motilidade característica em “guarda-chuva” era observada, diariamente, pela inoculação em picada em meio Sulfeto Indol Motilidade (SIM; Difco) incubado a 25 °C por até 7 dias.

4.4.3.1 Confirmação bioquímica

Colônias que apresentaram-se como bastonetes Gram positivos, catalase positivos e com motilidade característica a 25 °C foram analisadas pelo sistema comercial de identificação API *Listeria* (BioMérieux) para identificação da espécie de *Listeria*, conforme o procedimento recomendado pelo fabricante. As colônias também foram submetidas ao teste

de Christie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP). O ensaio foi realizado em placas preparadas com Ágar Sangue (Merck) adicionado de 8% de sangue de carneiro desfibrinado (Newprov), conforme Ryser; Donnelly (2001). Uma cultura hemolítica de *Staphylococcus aureus* ATCC® 49444 e outra de *Rodococcus equi* ATCC® 6939 foram inoculadas, separadamente, em uma única estria, uma paralela a outra. No espaço entre as estrias, as culturas suspeitas foram inoculadas, perpendiculares às duas estrias previamente inoculadas, porém sem tocá-las. As placas foram incubadas a 35 °C / 24-48 h e foi observada a ocorrência de halo transparente de hemólise ao redor das estrias inoculadas, com aumento na zona influenciada pelo crescimento de *S. aureus*. Os isolados confirmados como *Listeria* spp foram mantidos em Caldo Trypticase de Soja com 0,6% de Extrato de Levedura (TSB-YE; Difco) adicionado de 20% (vol /vol) de glicerol (Nuclear), a – 80 °C.

4.4.4 Enumeração de *Listeria monocytogenes*

A etapa de enumeração de *Listeria* spp foi realizada quando contaminação era detectada no leite, queijos ou salmoura. Uma porção de amostra foi reservada para essa finalidade. Assim, as amostras reserva de leite e queijo foram mantidas congeladas e as de salmoura refrigeradas até a confirmação da espécie dos isolados. Para a enumeração de *L. monocytogenes* nas amostras dos produtos foi utilizada a metodologia descrita por Hitchins (2003). No caso de positivas, inclusive para *Listeria* spp, as amostras sólidas (de queijo) eram descongeladas em banho maria a 35 °C. Diluições da amostra, correspondentes a alíquotas de 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001g, eram inoculadas em séries de 3 tubos com BLEB contendo os agentes seletivos seguido de incubação a 30 °C / 48 h e estriamento em ágar ALOA e Oxford. No caso de amostras líquidas, como a salmoura, alíquotas de 1 mL das mesmas e de diluições correspondentes a 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 mL eram inoculadas em séries de 3 tubos com BLEB, da mesma forma descrita para os queijos. Colônias típicas foram selecionadas do meio seletivo e a confirmação foi de acordo com os itens 4.4.3 e 4.4.3.1 A determinação do número mais provável (NMP) foi de acordo com a tabela apropriada (BLODGETT, 2003) e o resultado foi expresso em NMP por grama ou microlitro de produto.

Simultaneamente, a análise para enumerar *Listeria* spp foi conduzida pela técnica de plaqueamento em superfície: alíquotas de cada diluição decimal, e também da salmoura pura, foram distribuídas na superfície de placas contendo ágar ALOA com alça de Drigalsky. Colônias típicas foram selecionadas do meio seletivo e a confirmação foi de acordo com os

itens 4.4.3 e 4.4.3.1. As contagens foram calculadas de acordo com as diluições efetuadas e expressas em unidades formadoras de colônia (UFC) por grama ou microlitro de alimento.

4.4.5 Caracterização antigênica

Os isolados identificados como *L. monocytogenes* foram encaminhados para o Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, RJ, onde foi realizada a caracterização antigênica dos mesmos, de acordo com Seeliger; Höhne (1979), com antissoros somáticos e flagelares polivalentes e monovalentes.

4.4.6 Tipagem dos isolados por PFGE

Os isolados confirmados como *L. monocytogenes* foram analisados pela técnica de PFGE, no Laboratório de Microbiologia e Micotoxilogia de Alimentos (LMMA) do Departamento de Engenharia de Alimentos da FZEA/USP, de acordo com o protocolo preconizado pelo CDC, descrito no Pulsenet (2009). Além das *L. monocytogenes* isoladas dos laticínios (N=85), foram incluídas na análise outras linhagens não relacionadas: 4 isolados da espécie *L. seeligeri* obtidos no laticínio A e, da espécie *L. monocytogenes* foram incluídos os isolados EP97 (isolado de alface em 1997); EP10 (isolado de carne suína em 2010) e a linhagem de referência *L. monocytogenes* ATCC® 7644.

4.4.6.1 Isolamento do DNA

Todos os isolados de *L. monocytogenes* e isolados da espécie *L. seeligeri* mantidos congelados foram reativados em (TSB-YE) seguido de incubação a 35 °C / 24 h. A partir do caldo foram feitas estrias em placas com TSA+YE e estas foram incubadas a 35 °C / 24 h. Colônias foram adicionadas em tampão TE (10 mM Tris:1 mM EDTA, pH 8.0) de modo que a suspensão bacteriana atingisse um padrão de turbidimetria correspondente a valores entre 6 e 7 da escala McFarland. Essas suspensões foram usadas para determinar a absorbância a 610 nm (Espectrofotômetro 700S – Femto Ind e Com Instrumentos Ltda) e a densidade ótica (DO) foi corrigida para o valor 1,0. Aliquotas de 285 µL da suspensão bacteriana com DOs padronizadas foram transferidas para microtubos onde foram adicionados 15 µL de uma solução de Lisozima (20 mg/mL) (Sigma). Os microtubos foram incubados a 55 °C por

20 min. Aos microtubos com a suspensão bacteriana, foram adicionados 300 µL de uma solução denominada SSP, composta de: 1% de agarose (SeaKem Gold Agarose, Cambrex) + 1% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (USB) em tampão TE e 15 µL de Proteinase K (20 mg/mL) (New England, Biolabs). A mistura foi homogeneizada e distribuída em moldes (Bio-Rad) apropriados para confecção dos blocos de agarose. Após a solidificação, os blocos foram colocados em tubos Falcon contendo 5 mL de solução de lise (50 mM Tris:50 mM EDTA, pH 8.0) + 1% Sarcosyl (Sigma) e 25 µL de Proteinase K (20 mg/mL) e foram incubados a 54 °C por 2 h. Em seguida, a solução de lise foi descartada e os blocos submetidos a 5 lavagens com água ultrapura (54 °C), com intervalos de 10 min cada, e a 4 lavagens com tampão TE (54 °C), com intervalos de 15 min cada. Após, os blocos foram armazenados em 1000 µL de tampão TE e mantidos sob refrigeração a 4 °C, até a etapa de restrição com enzimas.

4.4.6.2 Análises de macrorestrição por PFGE

Duas enzimas de restrição – *Apa* I e *Ascl* (New England, Biolabs) - foram utilizadas para essa etapa. Fatias de aproximadamente 2 mm dos blocos foram digeridas com as enzimas de restrição. No caso da enzima *Apa* I, foram utilizados 177 uL de água ultrapura esterilizada, 20 µL de NEBuffer 4 10X (New England, Biolabs), 2 µL de soro albumina bovina (BSA 100 X) (New England, Biolabs) e 1µL da enzima *Apa* I (50 U/mL). Duas fatias do bloco imersas na solução com a enzima foram colocadas em banho-maria a 25 °C por 2,5 h. Para a restrição com a enzima *Ascl*, foram utilizadas 40 unidades da enzima/2 fatias de bloco, com incubação a 37 °C por 2,5 h.

Após a etapa de restrição, os blocos foram lavados em 500 uL de tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5X, durante 5 min. Em seguida, foram cuidadosamente colocados no gel de corrida, previamente preparado com 1% de agarose (Seakem Gold Agarose, Cambrex) em tampão TBE 0,5X (Tris-Borato-EDTA). Para a eletroforese foi utilizado o equipamento CHEF DR III (Bio-Rad) com a seguinte programação: tempo inicial 4,0 s; tempo final 40 s; tempo de corrida de 19 h em temperatura de 14 °C, 6 Volts/cm e ângulo de 120°. Após a eletroforese, o gel foi corado com solução com 50 µL de brometo de etídio (Sigma) (10 mg/mL) em 500 mL de água destilada, descorado em água destilada e a imagem capturada, sob luz UV, em equipamento modelo Gel Doc XR (Bio-Rad). O marcador de peso molecular Lambda Ladder PFG Marker (BioLabs – New England) foi utilizado nas análises.

4.4.6.3 Análise de dados (PFGE)

As imagens dos géis foram normalizadas com o marcador de peso molecular Lambda Ladder PFG Marker (Biolabs-New England) carregado em três pontos do gel, como posição de referência externa. Relações entre os perfis de PFGE foram analisadas com o pacote estatístico do BioNumerics 5.1 (AppliedMaths). Bandas representando fragmentos de 48,5 kb e superiores foram incluídas nas análises. Dendrogramas de similaridade foram construídos pelo método UPGMA (unweighted pair group method with averages) utilizando o coeficiente de correlação de Dice com posições de tolerância de 1,0% e 1,5% (MARTIN et al., 2006), para as enzimas *Ascl* e *Apal*, respectivamente. Para a análise de perfis combinados *Apal* e *Ascl*, foi contruído um dendrograma com base na avaliação simultânea dos dados de PFGE obtidos com ambas as enzimas, utilizando a média dos dois experimentos. A ferramenta utilizada foi Composite Data Set do BioNumerics, com o critério Average of Experiments. Os dados foram classificados pelo método UPGMA.

A capacidade discriminatória de PFGE foi calculada de acordo com o índice de diversidade de Simpson (HUNTER; GASTON, 1988), com a seguinte fórmula:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1)$$

Onde N é o número de isolados da população teste, s é o número total de tipos diferentes e n_j é o número de isolados representativos de cada tipo. O valor de D indica a probabilidade de dois isolados selecionados ao acaso em uma população teste serem alocados em diferentes grupos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características dos laticínios amostrados

Na tabela 5 são apresentadas características de instalações e de processamento de produtos dos laticínios bem como a classificação dos estabelecimentos, de acordo com a Anvisa (2002).

Tabela 5 – Características das instalações e de processamento dos 3 laticínios

Características	Laticínio		
	A	B	C
Tempo de funcionamento (anos)	20	13	17
Número de fazendas fornecedoras de leite	60	60	55
Volume de leite processado/dia (litros)	7.000	12.000	3.000
Produção mensal de queijo Minas frescal (kg)	5.000	800	3000
Número de funcionários	13	15	11
Tipo de serviço de inspeção	SIF*	SISP**	SIF*
Área externa do laticínio totalmente calçada	Sim	Não	Sim
Lavador de botas na entrada do laticínio	Sim	Não	Não
Utilização de pedilúvio na entrada do laticínio	Sim	Sim	Não
Classificação do estabelecimento***	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 2

*** de acordo com a lista de verificação de Boas Práticas de Fabricação em estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos (ANVISA, 2002); Grupo 1: 76 a 100% de atendimento dos itens / Grupo 2: 51 a 75% de atendimento dos itens / Grupo 3: 0 a 50% de atendimento dos itens

*SIF = Serviço de Inspeção Federal

**SISP = Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal do Estado de São Paulo

5.2 Ocorrência de bactérias do gênero *Listeria*

A pesquisa com 393 amostras coletadas em três laticínios do Estado de São Paulo, sendo 192 amostras de alimentos (leite cru e pasteurizado e queijos), água e salmoura e 201 ambientais, revelou uma prevalência de *Listeria* spp de 15,52% e de *L. monocytogenes* de 7,12%. *L. monocytogenes* não foi encontrada nas amostras do laticínio A, de onde só foi isolada *L. seeligeri*, enquanto no laticínio B 12,50% das amostras resultaram positivas para

L. monocytogenes e, no laticínio C, 9,09 %, conforme Tabela 6, que também apresenta a ocorrência de 4 das 6 espécies do gênero *Listeria* isoladas.

Tabela 6 – Ocorrência de espécies de *Listeria* em amostras coletadas em 3 laticínios do Estado de São Paulo

Espécie	Número (%)			
	Laticínio A (N=136)	Laticínio B (N=136)	Laticínio C (N=121)	TOTAL (N=393)
<i>Listeria</i> spp	4 (2,94)	27 (19,85)	30 (24,79)	61 (15,52)
<i>L. monocytogenes</i>	0 (0,00)	17 (12,50)	11 (9,09)	28 (7,12)
<i>L. innocua</i>	0 (0,00)	19 (13,97)	29 (23,96)	48 (12,21)
<i>L. seeligeri</i>	4 (2,94)	4 (2,94)	0 (0,00)	8 (2,04)
<i>L. welshimeri</i>	0 (0,00)	1 (0,74)	0 (0,00)	1 (0,25)

N = número de amostras analisadas.

Observa-se que nos três laticínios houve isolamento de *Listeria* spp. O isolamento de qualquer espécie do gênero deve ser considerado, pois acredita-se que *L. monocytogenes* habite os mesmos nichos (KELLS; GILMOUR, 2004). Embora não seja consenso (TOMPKIN, 2002), a presença de *Listeria* spp. pode servir de indicador para a possível presença de *L. monocytogenes* (D'AMICO; DONNELLY, 2009).

Independente de esforços, segundo Tompkin (2002), a entrada contínua de *Listeria* spp no ambiente de indústrias de alimentos é inevitável e medidas devem ser adotadas para evitar a formação de nichos de contaminação. De acordo com D'amico; Donnelly (2009), eliminar e monitorar *Listeria* spp em indústrias processadoras de queijo é importante para o sucesso de programas de controle de *Listeria* spp e é possível reduzir contaminações por este gênero a níveis não detectáveis nesse tipo de indústria.

Nos Quadros 2, 3 e 4 são apresentados os pontos de isolamento das espécies de *Listeria* encontradas em cada uma das coletas dos 3 laticínios. No laticínio A, em todas as coletas foi isolada *L. seeligeri* (Quadro 2), enquanto nos laticínios B (Quadro 3) e C (Quadro 4) em todas as coletas ocorreu isolamento de *L. monocytogenes*.

Quadro 2 – Pontos de isolamento de *Listeria* spp. no laticínio A nas 4 coletas

Local de coleta	Coleta out/08	Coleta jan/09	Coleta abr/09	Coleta jul/09	Total	Amostras Analisadas
Área de recepção de leite cru						11
Leite cru silo A	Aus 25mL	Aus 50mL	Aus 50mL	Aus 50mL	4	
Leite cru silo B	Aus 25mL	Aus 50mL	Aus 50mL	Aus 50mL	4	
Filtro de leite cru ^A	-		-	-	3	
Áreas de processamento / armazenamento de queijos						
Água (sala processamento)	(-)	(-)	(-)	(-)	4	4
Superfícies sem contato com alimentos						29
Piso sala pasteurização	-	-	-	-	4	
Piso sala processamento	-	-	-	-	4	
Ralo sala processamento	-	-	-	-	4	
Ralo da câmara fria	LS	-	-	-	4	
Estrado câmara fria	-	-	-	-	4	
Piso sala câmara fria 1		-	LS	LS	3	
Piso sala câmara fria 2		LS	-	-	3	
Parede câmara fria 1				-	1	
Parede câmara fria 2				-	1	
Parede sala processamento				-	1	
Superfícies com contato com os alimentos						38
Tanque coagulação	-	-	-	-	4	
Pás de agitação	-	-	-	-	4	
Liras	-	-	-	-	4	
Formas	-**	-**	-**	-**	4	
Mesa enformagem	-	-	-	-	4	
Mesa embalagem			-	-	2	
Manipuladores (enformagem)	-	-	-	-	4	
Manipuladores (embalagem)	-	-	-	-	4	
Caixas plásticas	-*	-*	-*	-*	4	
Embaladeira	-	-	-	-	4	
Produtos						54
Leite pasteurizado	Aus 25mL	Aus 50mL	Aus 50mL	Aus 50mL	4	
Coágulo (Minas frescal)	Aus 25g	Aus 50g	Aus 50g	Aus 50g	4	
Queijo enformado (n= 5)	Aus 25g*	Aus 50g**	Aus 50g**	Aus 50g**	20	
Queijo embalado (amostra 1)	Aus 25g	Aus 50g	Aus 50g	Aus 50g	4	
Queijo embalado (amostra 2)	Aus 25g	Aus 50g	Aus 50g	Aus 50g	4	
Queijo embalado (amostra 3)	Aus 25g	Aus 50g	Aus 50g	Aus 50g	4	
Queijo embalado (amostra 4)	Aus 25g	Aus 50g	Aus 50g	Aus 50g	4	
Queijo embalado (amostra 5)	Aus 25g	Aus 50g	Aus 50g	Aus 50g	4	
Superfície de queijos (amostra1)			-**	-**	2	
Superfície de queijos (amostra 2)			-**	-**	2	
Superfície de queijos (amostra 3)			-**	-**	2	
Total de amostras analisadas						136

^A = considerado superfície com contato com alimentos; - ausência de *Listeria* spp. na amostra; (-) ausência de *Listeria* spp. em 1000 mL; Aus = ausência de *Listeria* spp em; LS = *Listeria seeligeri*. * amostra composta de 5 unidades; ** amostra composta de 15 unidades ■ amostra não coletada.

Quadro 3 – Pontos de isolamento de *Listeria* spp. no laticínio B nas 4 coletas

Local de coleta	Coleta nov/08	Coleta fev/09	Coleta mai/09	Coleta ago/09	Total	Amostras Analisadas
Área de recepção de leite cru						12
Leite cru silo A	Aus 25mL	Aus 50mL	Aus 50mL	Aus 50mL	4	
Leite cru silo B	Aus 25mL	Aus 50mL	Aus 50mL	Aus 50mL	4	
Filtro de leite cru ^A	-	-	-	-	4	
Áreas de processamento / armazenamento de queijos						
Água (sala processamento)	(-)	(-)	(-)	(-)	4	4
Superfícies sem contato com alimentos						31
Piso sala pasteurização	LM - LI	LM - LI	LW	LM - LI	4	
Piso sala processamento	-	LI	LI	LI	4	
Ralo sala processamento	LI	-	LI	LI	4	
Ralo da câmara fria	LM - LI	LM	LM	LM - LI	4	
Estrado câmara fria	-	LI	LM-LS	LM-LS	4	
Piso sala câmara fria A	-	LM	LM - LI	LM-LS	4	
Piso sala câmara fria B	LM - LI	LM-LI	LM - LI	LM-LI-LS	4	
Parede sala processamento				-	1	
Parede câmara fria A				-	1	
Parede câmara fria B				-	1	
Superfícies com contato com alimentos						35
Tanque coagulação	-	-	-	-	4	
Pás de agitação		-	-	-	3	
Liras	-	-	-	-	4	
Formas	-**	-**	-**	-**	4	
Mesa de embalagem	-	-	-	-	4	
Manipuladores (enformagem)	-	-	-	-	4	
Manipuladores (embalagem)	-	-	-	-	4	
Caixas plásticas	LI*	-*	-*	LM*	4	
Embaladeira	-	-	-	-	4	
Produtos						54
Leite pasteurizado	Aus 25mL	Aus 50mL	Aus 50mL	Aus 50mL	4	
Coágulo (Minas frescal)	Aus 25g	Aus 50g	Aus 50g	Aus 50g	4	
Queijo enformado (5 amostras)	Aus 25g*	Aus 50g**	Aus 50g**	Aus 50g**	20	
Queijo embalado (amostra 1)	Aus 25g	Aus 50g	Aus 50g	Aus 50g	4	
Queijo embalado (amostra 2)	Aus 25g	Aus 50g	Aus 50g	Aus 50g	4	
Queijo embalado (amostra 3)	Aus 25g	Aus 50g	Aus 50g	Aus 50g	4	
Queijo embalado (amostra 4)	Aus 25g	Aus 50g	Aus 50g	Aus 50g	4	
Queijo embalado (amostra 5)	Aus 25g	Aus 50g	Aus 50g	Aus 50g	4	
Superfície de queijo (amostra 1)			LI**	-**	2	
Superfície de queijo (amostra 2)			-**	-**	2	
Superfície de queijo (amostra 3)			-**	-**	2	
Total de amostras analisadas						136

^A = considerado superfície com contato com alimentos; - ausência de *Listeria* spp. na amostra; (-) ausência de *Listeria* spp. em 1000 mL; Aus = ausência de *Listeria* spp em; LM = *L. monocytogenes*; LI = *L. innocua*; LS = *L. seeligeri*. LW = *L. welshimeri*; * amostra composta de 5 unidades; **amostra composta de 15 unidades; ■ amostra não coletada;

■ amostra perdida no laboratório

Quadro 4 – Pontos de isolamento de *Listeria* spp. no laticínio C nas 4 coletas

Local de coleta	Coleta dez/08	Coleta mar/09	Coleta jun/09	Coleta set/09	Total	Amostras Analisadas
Área de recepção de leite cru						8
Leite cru silo A	Aus 25mL	Aus 50mL	Aus 50mL	Aus 50mL	4	
Filtro de leite cru ^A	-	-	-	-	4	
Áreas de processamento / armazenamento de queijos						
Água (sala processamento)	(-)	(-)	(-)	(-)	4	4
Superfícies sem contato com alimentos						23
Piso sala pasteurização	-	-	LI	LI	4	
Piso sala processamento	LI	LI	LI	LI	4	
Ralo sala processamento	LI	LI	LI	LI	4	
Estrado câmara fria	LI	LM - LI	LI	LM - LI	4	
Piso sala câmara fria	LM - LI	LI	LM - LI	LM - LI	4	
Parede câmara fria				-	1	
Parede sala processamento				-	1	
Parede sala embalagem				-	1	
Superfícies com contato com os alimentos						34
Tanque coagulação	-	-	-		3	
Pás de agitação	-	-	-		3	
Liras	-	-	-		3	
Formas	-**	-**	-**		3	
Mesa embalagem	-	-	-		3	
Manipuladores (enformagem)	-	-	-	-	4	
Manipuladores (embalagem)	-	LM	-	-	4	
Caixas plásticas	-*	-*	LI*	LM - LI*	4	
Embaladeira	-	-	-	-	4	
Mesa enformagem	-	-	-		3	
Produtos						52
Leite pasteurizado	Aus 25mL	Aus 50mL	Aus 50mL	Aus 50mL	4	
Coágulo (Minas frescal)	Aus 25g	Aus 50g	Aus 50g		3	
Queijo enformado (5 amostras)	Aus 25g*	Aus 50g**	Aus 50g**		15	
Queijo embalado (amostra 1)	Aus 25g	Aus 50g	Aus 50g	Aus 50g	4	
Queijo embalado (amostra 2)	Aus 25g	Aus 50g	Aus 50g	LI 50 g	4	
Queijo embalado (amostra 3)	Aus 25g	Aus 50g	Aus 50g	LI 50g	4	
Queijo embalado (amostra 4)	Aus 25g	Aus 50g	Aus 50g	LI 50g	4	
Queijo embalado (amostra 5)	Aus 25g	Aus 50g	Aus 50g	Aus 50g	4	
Salmoura	Aus 25g	LI 50 mL	LM - LI 50 mL	LM - LI 50 mL	4	
Superfície de queijos (amostra 1)			-**	LM - LI** Qj Prt	2	
Superfície de queijos (amostra 2)			-**	LI** Qj Prt	2	
Superfície de queijos (amostra 3)			-**	LM - LI** Qj Prt	2	
Total de amostras analisadas						121

^A = considerado superfície com contato com alimentos; - ausência de *Listeria* spp. na amostra; (-) ausência de *Listeria* spp. em 1000 mL; Aus = ausência de *Listeria* spp em; LM = *L. monocytogenes*; LI = *L. innocua*; * amostra composta de 5 unidades; ** amostra composta de 15 unidades; Qj Prt = Queijo Prato; ■ amostra não coletada;

Nos Quadros 3 e 4 observa-se uma alta ocorrência de *L. innocua* nas amostras dos laticínios B e C, consistente com outras pesquisas em ambiente de laticínios (D'AMICO;

DONNELLY, 2009) e em outros tipos de amostra (DIAS, 2008; YÜCEL; CITAK; ÖNDER, 2005). Em ambos houve predomínio de *L. innocua* (Tabela 6), com destaque para o laticínio C, o que sugere que essa espécie esteja bem adaptada a esses laticínios. Outra hipótese é que *L. innocua* possa ter se multiplicado mais rapidamente, sobrepondo a taxa de crescimento de *L. monocytogenes* no meio seletivo, comportamento observado por BRUHN; VOGEL; GRAM BRUHN (2005). *L. innocua* e *L. monocytogenes* foram as espécies mais prevalentes (Tabela 6), concordando com outras investigações em laticínios (D'AMICO; DONNELLY, 2009).

Dentre as 61 amostras positivas para o gênero *Listeria*, 5 (8,2%) apresentaram contaminação apenas por *L. monocytogenes*, 28 (45,9%) apenas por *L. innocua*, 4 (6,6%) apenas por *L. seeligeri*, 1 (1,6%) apenas por *L. welshimeri* e 23 (39,3%) por duas ou mais espécies do gênero.

No laticínio B foi encontrada a maior diversidade de espécies (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri*) (Quadro 3), enquanto no laticínio C foram encontradas *L. innocua* e *L. monocytogenes* (Quadro 4). Embora menos comum, *L. seeligeri* foi recuperada dos estabelecimentos A e B deste estudo, tendo sido isolada sozinha no laticínio A (Quadro 2), associada a *L. monocytogenes*, e associada a *L. monocytogenes* e *L. innocua* no laticínio B (Quadro 3).

Em muitos casos houve necessidade de reisolamento de colônias suspeitas de *Listeria* spp. nos respectivos meios seletivos. Em outras amostras foi possível fazer a purificação dos isolados, sem necessidade de reisolamento (Figura 2).

Figura 2 - (A) Exemplo de amostra que precisou de reisolamento: colônias típicas de *Listeria* no meio ALOA apresentando halo característico de *L. monocytogenes* com colônias contaminantes. (B) Colônias típicas de *Listeria* spp. no meio ALOA e (C) típicas de *Listeria* spp no meio Oxford, que não necessitaram reisolamento

Em algumas amostras uma grande quantidade de contaminantes crescia nas placas (Figura 2), dificultando a visualização das colônias características, o que não era esperado, devido à seletividade dos meios. Isso ocorreu particularmente nas amostras coletadas de ralos e pisos. Dentre os isolados confirmados como *L. monocytogenes* (N=85), todos

apresentaram halo característico para a espécie no meio ALOA. Além disso, também apresentaram hemólise característica, pelo teste de CAMP, conforme ilustra a Figura 3.

Figura 3 – Reação de hemólise característica da espécie *L. monocytogenes* pelo Teste de CAMP

Em indústrias de laticínios de diversas regiões do mundo são verificadas prevalências variáveis de *Listeria* spp, significando que a contaminação desses ambientes por esse gênero é freqüente, porém, ele nem sempre é isolado desses ambientes. Nos EUA, Charlton; Kinde; Jensen (1990) isolaram *Listeria* spp de 29,5% e *L. monocytogenes* de 19,9% dos 156 laticínios pesquisados. Pesquisa recente de D'amico;Donnelly (2009) naquele país revelou baixa prevalência (10,6%) de *Listeria* spp, especialmente *L. monocytogenes*, no ambiente de pequenas indústrias produtoras de queijos artesanais à base de leite cru, com 6 de 8 indústrias positivas para o gênero *Listeria* enquanto *L. monocytogenes* só foi isolada do ambiente de 2 das 8 indústrias. Na Europa, Wagner et al. (2006) isolaram *L. monocytogenes* de 27,6% (50/181) das indústrias de pequeno porte processadoras de queijos na Áustria, e Chambel et al. (2007) encontraram *L. monocytogenes* em 62,5% (5/8) das indústrias processadoras de queijo pesquisadas, em Portugal. No Oriente Médio, El Shenawy et al. (1998) isolaram *Listeria* spp de todos os laticínios pesquisados (N=18). No Brasil as pesquisas sobre *L. monocytogenes* em laticínios são escassas e o único estudo conduzido simultaneamente com mais de uma indústria é o de Silva et al. (2003), que isolaram *Listeria* spp de dois laticínios pesquisados na Bahia, tendo encontrado *L. monocytogenes* em apenas um dos deles.

A Tabela 7 apresenta o número de amostras positivas apenas para *L. monocytogenes* em cada ponto de coleta dos 3 laticínios analisados.

Tabela 7 – Número de amostras analisadas e positivas para *L. monocytogenes* em cada ponto de coleta dos 3 laticínios

Ponto de Coleta	Número de amostras analisadas (número de amostras positivas)			Total
	Laticínio			
	A	B	C	
Leite cru (silos)	0 (8)	0 (8)	0 (4)	0 (20)
Leite pasteurizado	0 (4)	0 (4)	0 (4)	0 (12)
Coágulo (minas frescal)	0 (4)	0 (4)	0 (3)	0 (11)
Queijo Minas frescal	0 (46)	0 (46)	0 (38)	0 (130)
Queijo Prato	NC	NC	2 (3)	2 (3)
Salmoura ^a	NC	NC	2 (4)	2 (4)
Água	0 (4)	0 (4)	0 (4)	0 (12)
Pisos (câmara fria) ^a	0 (6)	7 (8)	3 (4)	10 (18)
Pisos (área não fria)	0 (8)	3 (8)	0 (8)	3 (24)
Ralos (câmara fria) ^{a b}	0 (4)	4 (4)	NU	4 (8)
Ralos (área não fria)	0 (4)	0 (4)	0 (4)	0 (12)
Estrado ^a	0 (4)	2 (4)	2 (4)	4 (12)
Paredes ^c	0 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (9)
Equipamentos e utensílios ^d	0 (33)	1 (31)	1 (30)	2 (94)
Luvas de manipuladores	0 (8)	0 (8)	1 (8)	1 (24)
Total	0 (136)	17/136	11/121	28 (393)

NC = amostra não coletada; NU = não utiliza; ^a amostras provenientes de áreas refrigeradas; ^b ralos localizados no interior da câmara fria ou que recebiam drenagem da câmara fria; ^c incluem paredes de áreas refrigeradas e não refrigeradas ^d equipamentos e utensílios incluem: pás de agitação, liras, formas, mesas de enformagem e/ou embalagem, caixas plásticas, embaladeira, filtro de leite cru e tanque de coagulação;

5.2.1 Ocorrência de *L. monocytogenes* nas amostras de leite cru e pasteurizado

L. monocytogenes não foi isolada das amostras de leite cru (N=20) coletadas dos silos de recepção e armazenamento dos 3 laticínios (Tabela 7). Convém salientar que o leite dos silos correspondia ao leite recebido de vários fornecedores. Uma pesquisa foi conduzida simultaneamente a esta, com amostras colhidas conjuntamente no mesmo dia da coleta dos laticínios sendo que, de cada laticínio, amostras individuais do leite cru de conjunto de 25 fazendas eram analisadas por Camargo (2010). No total, Camargo (2010) analisou 286 amostras de leite e não isolou *L. monocytogenes* ou outras espécies de *Listeria*. Isso confirma a baixa prevalência ou ausência do patógeno em leite cru em rebanhos no Brasil,

de acordo com estudos anteriores: DESTRO; DE MELO SERRANO; KABUKI (1991) (N=20); CASSAROTTI; GALLO; CAMARGO (1994) (N=20); ROCHA (2004) (N= 6); NERO (2005) (N=240) e ARCURI et al. (2006) (N=42). Contrastando com os achados deste trabalho, MOURA; DESTRO; FRANCO et al. (1993) isolaram a bactéria de 9,5% das amostras analisadas (N=220) no Estado de São Paulo. Em leite cru coletado no Nordeste do país, FIGUEIREDO (2000) isolou *L. monocytogenes* de 15% (N=60) e SILVA et al. (2003) de 16,7% (N=6) das amostras, enquanto prevalência contrastante [37,8% (N=45)] foi descrita por CATÃO; CEBALOS (2001) em amostras de leite cru de usina de processamento de leite.

Em leite cru, na América do Norte, há relatos de prevalência de *L. monocytogenes* variando de 2,7% no Canadá (RYSER; MARTH, 1991) e 3,1 a 6,5% nos EUA (RYSER; MARTH, 1991; MURAOKA et al., 2003; VAN KESSEL et al., 2004). No Irã são registradas prevalências de 1,7 a 3,3% (MAHAMOODI, 2010), na Índia 5,1% (KALOREY et al., 2008), enquanto na Europa as prevalências variam de 0 a 22% (MASSA et al., 1990; HARVEY; GILMOUR, 1992; WAAK; THAM; DANIELSSON-THAM, 2002; KELLIS; GILMOUR, 2004), com dados contrastantes de uma pesquisa antiga na Espanha, com 45% de amostras positivas (DOMINGUEZ-RODRIGUES et al., 1985). Critérios de amostragem podem influenciar resultados de ocorrência de *L. monocytogenes*. Por ocorrer em baixos números no ambiente, seu isolamento é difícil e, nesse aspecto, estudos de incidência são melhores indicadores do que estudos de prevalência (TOMA et al., 1999). A detecção de *L. monocytogenes* em leite cru pode ser difícil devido às baixas contagens da bactéria e à competição da microbiota bacteriana (MEYER-BROSETA, 2003). Além disso, distribuição irregular da bactéria em grandes volumes, como tanques de leite cru, também pode dificultar o isolamento da bactéria. Portanto, o não isolamento de *L. monocytogenes* das amostras de leite cru não significa que a bactéria não estava presente nos lotes de leite recebidos pelos laticínios.

Inicialmente o filtro de leite cru era considerado um suposto local de retenção de *L. monocytogenes*, uma vez que todo o leite cru recebido pelos laticínios era filtrado e as coletas realizadas imediatamente após a filtração, antes da higienização do mesmo. Nos três laticínios, as amostras dos filtros resultaram negativas para *Listeria* spp (Tabela 7), o que demonstra a dificuldade de isolamento de *L. monocytogenes* a partir do leite cru.

Sobre o leite pasteurizado, o não isolamento de *L. monocytogenes* nas amostras analisadas (N=12) (Tabela 7) confirma que o produto não é uma fonte comum da bactéria, conforme pesquisas prévias na região sudeste do Brasil (DESTRO; DE MELO SERRANO; KABUKI, 1991; CASAROTTI; GALLO; CAMARGO, 1994; ROCHA, 2004; BRITO et al., 2008), na Espanha (MENENDEZ et al., 1997) e de compilação de dados para avaliação de risco por contaminação do produto (FAO/WHO; 2004). Pesquisa de Frye; Donnelly (2005) nos EUA com 5.519 amostras e apenas 1 positiva confirmam a baixa prevalência de *L.*

monocytogenes nesse tipo de produto. Entretanto, pesquisas no nordeste do Brasil revelaram altas prevalências da bactéria em leite pasteurizado, como 30% (N=30) (CATÃO; CEBALOS, 2001) e 3,3% (N=120) (FIGUEIREDO, 2000).

5.2.2 Ocorrência de *L. monocytogenes* no ambiente dos laticínios

Enquanto nenhuma das amostras de matéria prima apresentou contaminação por *L. monocytogenes*, o patógeno foi isolado de diversos locais do interior dos laticínios B e C (Quadros 3 e 4). Isso sugere que o leite cru pode não ser um veículo importante de disseminação de *L. monocytogenes* para os laticínios em estudo, podendo haver outras fontes de contaminação. Charlton; Kinde; Jensen (1990) aventaram a hipótese de que fazendas leiteiras não são a fonte principal de introdução de *Listeria* spp no ambiente industrial, por terem encontrado baixa prevalência do gênero em áreas de recepção de leite cru de laticínios dos EUA. Na presente pesquisa, *L. monocytogenes* não foi isolada do piso da sala de pasteurização e processamento do laticínio C, locais onde vazava leite cru, porém nesses locais foi isolada *L. innocua* (Quadro 4). Entretanto, no piso da sala de pasteurização do laticínio B, onde também vazava leite cru, nas 4 coletas foi isolada *Listeria* spp, com isolamento de *L. monocytogenes* em 3 coletas. Na Tabela 8 são apresentados os resultados de ocorrência de *Listeria* spp e *L. monocytogenes* nas amostras ambientais dos laticínios.

Tabela 8 – Ocorrência de *Listeria* spp e/ou *L. monocytogenes* em amostras ambientais, em superfícies com e sem contato com alimentos nos 3 laticínios

superfícies com e sem contato com alimentos nos 6 laticínios			
	Amostras	Positivas N (%)	
	analisadas	<i>Listeria</i> spp	<i>L. monocytogenes</i>
Amostras ambientais (superfícies com e sem contato com alimentos)			
Laticínio			
A	70	4 (5,71)	0 (0,00)
B	70	26 (37,14)	17 (24,28)
C	61	21 (34,42)	7 (11,47)
Total	201	51 (25,37)	24 (11,94)
Amostras de superfícies sem contato com alimentos			
Laticínio			
A	29	4 (13,79)	0 (0,00)
B	31	24 (77,41)	16 (51,61)
C	23	18 (78,26)	5 (21,73)
Total	83	46 (55,42)	21 (25,30)
Amostras de superfícies com contato com alimentos			
Laticínio			
A	41	0 (0,00)	0 (0,00)
B	39	2 (5,12)	1 (2,56)
C	38	3 (7,89)	2 (5,26)
Total	118	5 (4,23)	3 (2,54)

Na Tabela 8 observa-se que contaminações por *L. monocytogenes* foram detectadas principalmente em superfícies sem contato com os alimentos, sendo contaminadas 51,61% dessas superfícies no laticínio B e 21,73% no laticínio C. Essas taxas de isolamento são bem superiores às encontradas nas superfícies que têm contato com alimentos: 2,56% no laticínio B e 5,26% no laticínio C. Esses resultados são contrastantes com os de Alessandria et al. (2010), que não isolaram *L. monocytogenes* de superfícies que têm contato com queijos utilizando método convencional de isolamento, apenas detectaram a bactéria nesses locais por métodos moleculares. Menendez et al. (1997) também isolaram *Listeria* spp apenas das superfícies sem contato com os alimentos em laticínio na Espanha.

Dependendo da localização de *L. monocytogenes* no ambiente, os locais são considerados de maior ou menor risco para a contaminação de produtos. Em geral, superfícies sem contato direto com alimentos obviamente são consideradas de menor risco para contaminação dos produtos do que superfícies com contato. Entretanto, mesmo se tratando de superfícies sem contato, algumas áreas são consideradas de maior risco para

contaminação de alimentos do que outras. Na Figura 4 estão classificadas as zonas, de acordo com o risco de contaminação de produtos alimentícios (ILSI, 2005) e são apresentados exemplos de locais, dentro de cada zona. Nessa mesma Figura estão apresentados o número de amostras ambientais analisadas e o número de amostras positivas (porcentagem), de cada laticínio, dentro de cada zona de classificação de risco.

Figura 4 – Número e percentual de amostras positivas para *L. monocytogenes*, de acordo com a classificação das áreas de maior (Zona 1) e menor (Zona 4) risco de contaminação para produtos alimentícios conforme ILSI (2005)

Observa-se que no laticínio B *L. monocytogenes* foi isolada nas Zonas 1, 2 e 3, enquanto no laticínio C *L. monocytogenes* foi isolada apenas nas Zonas consideradas de maior risco de contaminação de alimentos: 1 e 2. Mesmo em superfícies sem contato com alimentos a presença de *L. monocytogenes* é preocupante pois pode ocorrer disseminação da bactéria para superfícies que têm contato. Dentre as amostras ambientais, aquelas obtidas de pisos, principalmente das câmaras frias dos laticínios B e C, ralo da câmara fria do laticínio B, e estrados de ambos os laticínios apresentaram alta ocorrência de *L. monocytogenes*, conforme detalhado na Tabela 7, o que é coerente com pesquisas anteriores que descrevem pisos (KABUKI et al., 2004; KELLS; GILMOUR, 2004) e ralos (CHARLTON, KINDE, JENSEN, 1990; WALKER et al., 1991; EL SHENAWY, 1998; FIGUEIREDO, 2000; KABUKI, 2004) como os locais de maior prevalência de *L. monocytogenes* em indústrias de laticínios. Segundo D'amico; Donnelly (2009), pisos e ralos são os principais nichos de *Listeria* spp nesse tipo de indústria, devido à presença contínua de umidade e substratos orgânicos. A amostragem de ralos foi considerada por Charlton; Kinde; Jensen (1990) boa indicadora da presença de *L. monocytogenes* em indústrias de laticínios.

Entretanto, é interessante destacar que, dos ralos não relacionados à área refrigerada (câmara fria), *L. monocytogenes* não foi isolada em nenhum dos laticínios, porém, outras espécies de *Listeria* foram encontradas nesses ralos nos 3 laticínios (Quadros 2, 3 e 4). Um detalhe de importância é que o laticínio B passou por uma reforma entre a 3ª e 4ª coletas e o ralo do interior da câmara fria foi substituído por outro, localizado na parte externa, que recebia drenagem de líquidos da câmara fria. Deste novo ralo, situado na área externa da câmara fria, foi isolada *L. monocytogenes* na 4ª coleta, demonstrando a rápida capacidade de colonização da bactéria em novos nichos.

Considerando-se que, nos laticínios B e C, as caixas plásticas vazadas para armazenamento dos queijos eram colocadas diretamente sobre o piso, e armazenavam formas também vazadas, contendo queijos (Figura 5), o piso destes laticínios poderia ser considerado praticamente uma superfície de contato com os queijos.

Figura 5 – Formas de queijos e caixas plásticas (vazadas) sobre o piso no laticínio B

Essa prática certamente propicia contaminações do produto final nos laticínios B e C e, provavelmente, faria com que os pisos desses laticínios fossem considerados como áreas de maior risco (Zona 1) do que o apresentado anteriormente na Figura 4.

Das superfícies de contato com os queijos, *L. monocytogenes* foi isolada de caixas plásticas no laticínio B (Quadro 3) e de caixas plásticas e luvas de manipulador de laticínio C (Quadro 4). A presença da bactéria em luvas de manipulador da área de embalagem mostra que estes podem ser veículos importantes de contaminações cruzadas, mesmo utilizando luvas. No laticínio C, as caixas eram utilizadas para a retirada de queijos do tanque de salmoura e para o transporte e armazenamento de queijos desenformados no interior do laticínio, antes da embalagem (Figura 6).

Figura 6 – Queijos do laticínio C armazenados em caixas plásticas vazadas

De acordo com os resultados, caixas plásticas podem ser considerados locais importantes de contaminação por *L. monocytogenes* e veículos de disseminação da bactéria em laticínios, conforme verificado por Figueiredo (2000) e Kabuki et al. (2004). O isolamento de *L. monocytogenes*, mesmo esporádico, nesse tipo de superfície nos laticínios B e C, demonstra que o produto final teve contato com o microrganismo e pode estar contaminado com *L. monocytogenes*.

Os isolamentos de *L. monocytogenes* nos laticínios B e C em todas as coletas demonstram a exposição contínua dos lotes de alimentos desses laticínios à contaminação pela bactéria e torna provável a presença do patógeno no queijo fabricado. A ampla distribuição de *L. monocytogenes* nesses laticínios possibilita sua veiculação para humanos, através de produtos contaminados, principalmente queijos. A presença de *L. monocytogenes*, associada a práticas de higiene nem sempre adequadas nessas indústrias pode representar um perigo para os consumidores de seus produtos.

Foi observado que a maioria das amostras positivas para *L. monocytogenes* (76,5 %; 13/17) do laticínio B eram provenientes de pontos refrigerados ou relacionados a áreas refrigeradas, enquanto no laticínio C, 63,6 % (7/11) das amostras eram provenientes de áreas refrigeradas (Tabela 7), refletindo a natureza psicrófila da bactéria. Esses resultados são concordantes com os de Brito et al. (2008) e Cotton; White (1992) que

apontam áreas refrigeradas como locais importantes de contaminação pelo patógeno em laticínios processadores de leite fluido. Essa mesma observação foi feita por Chiarini et al. (2007) quando analisou abatedouro de aves no Brasil. Nos laticínios B e C havia acúmulo de matéria orgânica visível e de água no piso e estrados das câmaras frias, demonstrando falta ou falhas de higienização. O laticínio A, de onde não foi isolada *L. monocytogenes*, era o que apresentava as melhores condições de higiene, inclusive no piso da câmara fria, que não apresentava acúmulo de água e resíduos de matéria orgânica visíveis. Ficou evidente a maior preocupação com a higienização no laticínio A, o que pode ter refletido na menor frequência de isolamento de *Listeria* spp. e ausência de *L. monocytogenes* nas suas instalações. Ferronato (2010), em abatedouro de suínos, também relatou maior frequência de isolamento em condições de instalação e práticas de fabricação mais deficientes, enquanto Chiarini (2007) observou maior frequência de *L. monocytogenes* em zona limpa do que suja em ambiente de abatedouros de frangos no Brasil.

Como ocorreu no laticínio A, pesquisas em outros laticínios (ROCHA, 2004; BORGES, 2006) realizadas no Brasil, não isolaram *L. monocytogenes* nesses ambientes, em contraste com os resultados dos laticínios B e C. ROCHA (2004) avaliou laticínio processador de Minas frescal em Campinas e não isolou *L. monocytogenes* de 120 amostras coletadas do ambiente de produção, de queijos Minas frescal e de leite cru e pasteurizado do mesmo laticínio, porém isolou outras espécies do gênero de diversos pontos do ambiente da planta. BORGES (2006) não encontrou *L. monocytogenes* no leite, queijo e no ambiente de processamento de queijo de coalho em Fortaleza.

Outras pesquisas no Brasil relatam taxas variáveis de ocorrência de *Listeria* e *L. monocytogenes*. Figueiredo (2000) encontrou prevalência semelhante de *Listeria* spp (15%) e *L. monocytogenes* (7,3%) no total de amostras analisadas (N=260) em laticínio processador de leite fluido tipo C no Ceará, comparada ao total de amostras positivas para *Listeria* spp e *L. monocytogenes* nos 3 laticínios deste estudo (Tabela 6). Considerando somente as amostras ambientais, a prevalência de *L. monocytogenes* obtida por Figueiredo (2000) (12%) foi semelhante a do laticínio C (11,47%) e inferior a do laticínio B (24,28%) (Tabela 8).

Prevalência de *Listeria* spp. e de *L. monocytogenes* bem inferior à encontrada neste trabalho foi observada em 2 laticínios produtores de queijo Minas frescal na Bahia por SILVA et al. (2003) quando analisaram 218 amostras que incluíam leite cru, pasteurizado, ambiente e queijos, e isolaram *Listeria* spp de 5,96% das amostras e *L. monocytogenes* de 0,91%. *L. monocytogenes* foi encontrada em apenas um dos laticínios, em 1 amostra de leite cru e outra de piso da câmara fria, não tendo sido isolada do queijo.

Brito et al. (2008) pesquisaram *L. monocytogenes* em amostras de queijo Minas frescal, leite cru e pasteurizado e ambiente de um laticínio de Minas Gerais e constataram

que a fonte de contaminação dos queijos eram as unidades de refrigeração. Segundo os autores, após implantação de medidas para o controle da bactéria e reforma da indústria, amostras coletadas resultaram negativas, demonstrando que é possível atingir níveis não detectáveis de *L. monocytogenes* no ambiente industrial.

Kornacki; Gurtler (2007) apresentam dados de ocorrência de *Listeria* spp (11%) e *Listeria monocytogenes* (8%) em instalações de laticínios da Austrália semelhantes às encontradas no presente estudo: 15,52 e 7,12% (Tabela 6). Avaliando indústrias de produtos lácteos na Califórnia, Walker et al. (1991) relataram que 12% das amostras (n=922) obtidas de 39 diferentes indústrias estavam contaminadas com *Listeria* spp, semelhante ao encontrado neste trabalho (15,52%).

Taxas de contaminação por *L. monocytogenes* em laticínios inferiores às encontradas no presente trabalho foram registradas na Europa. Na Espanha, Menendez et al. (1997), analisaram amostras de leite cru e pasteurizado, água, queijo, luvas de manipuladores, e ambiente, ao longo de 10 meses, e encontraram 14,47% das amostras positivas para *Listeria* spp, sendo 2,57% positivas para *L. monocytogenes*, ocorrências inferiores às encontradas neste trabalho para *Listeria* spp e *L. monocytogenes*, nos laticínios B (19,85% e 12,50%) e C (24,79% e 9,09%), respectivamente (Tabela 6).

Contrastando com os resultados desta pesquisa, Waak; Tham; Danielsson-Tham (2002), não encontraram *Listeria* spp nas instalações de uma indústria processadora de leite na Suíça, porém isolaram *L. monocytogenes* em amostras de leite cru de fazendas fornecedoras e em amostras dos silos de recepção da referida indústria. Também na Suíça, em pesquisa conduzida ao longo de 10 anos (PAK et al., 2002) com 76.271 amostras coletadas de laticínios, 4,9% resultaram positivas para *L. monocytogenes*, ocorrência inferior à encontrada neste trabalho. Na Finlândia, a prevalência de *L. monocytogenes* em amostras de indústria de sorvete também foi inferior: 2,8% (SJÖMAN, 2010).

Muito similar aos resultados do presente estudo, Kabuki et al. (2004) examinaram o ambiente e amostras de queijo de três indústrias de queijo latino fresco em Nova York durante 4 visitas a cada indústria. Recuperaram *L. monocytogenes* de 27 das 246 amostras ambientais daquelas indústrias (11%), prevalência semelhante à encontrada nos 3 laticínios deste trabalho (24 de 201 [11,94%]) (Tabela 8). Entretanto, amostras do produto final de apenas uma indústria analisada por Kabuki et al. (2004) foram positivas (7 de 24 [29%]) para *L. monocytogenes*, também semelhante aos resultados desta pesquisa, na qual a bactéria foi isolada apenas em queijos do laticínio C. Nos EUA, Ho; Lappi; Wiedmann (2007) encontraram prevalência de 2,7% de *L. monocytogenes* em amostras coletadas de indústria de laticínios de leite de ovelha, inferior à encontrada neste trabalho (7,12% - Tabela 6).

As indústrias de alimentos têm encontrado dificuldades para erradicar a bactéria de ambientes de processamento (TOMPKIN, 2002; LOMONACO et al., 2009; WARRINER;

NAMVAR, 2009). É importante controlar as vias potenciais de entrada de *L. monocytogenes* no ambiente industrial e prevenir contaminações cruzadas. Condições que promovam a multiplicação de *Listeria monocytogenes* aumentam o risco de contaminação de produtos. Dentre os fatores que afetam a multiplicação de microrganismos no ambiente industrial como umidade, nutrientes, pH, potencial de oxi-redução, temperatura, presença ou ausência de inibidores, interações entre microrganismos, a umidade é o mais crítico e essencial para o crescimento microbiano e também o mais prontamente controlado (KORNACKI; GURTLE, 2007).

Uma vez que o ingresso de *L. monocytogenes* na indústria pode ser contínuo, seu controle deve ser feito com a aplicação de procedimentos de higienização e Boas Práticas de Fabricação (BPF) (TOMPKIN, 2002). É necessário que indústrias que processam alimentos de alto risco de contaminação por *L. monocytogenes* – como queijos de alta e média umidade - operem com programas de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e Procedimentos Padronizados de Higiene Operacional (PPHO), para reduzir a contaminação ambiental e minimizar o risco de contaminação dos produtos (ILSI, 2005). Em particular, para produtos de alto risco, é importante que as indústrias adotem programa de coleta de amostras do ambiente (ILSI, 2005) e, a cada amostra positiva, seja para o gênero *Listeria* ou *L. monocytogenes*, as providências devem ser rápidas e efetivas para evitar a contaminação de alimentos (TOMPKIN, 2002).

5.2.3 Ocorrência de *L. monocytogenes* nos queijos, água e salmoura

L. monocytogenes não foi isolada das amostras de água (n=12) (Tabela 7) e dos queijos Minas frescal (N=130), dos laticínios A, B e C, porém foi isolada de 2 das 3 amostras de queijo Prato do laticínio C (Tabela 9).

Tabela 9 – Ocorrência de *Listeria* spp e/ou *L. monocytogenes* em queijos nos 3 laticínios

Espécie	Número (%)			
	Laticínio A (N=46) ^a	Laticínio B (N=46) ^a	Laticínio C (N=41) ^b	Total (N=133)*
<i>L. monocytogenes</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (4,87)	2 (1,50)
<i>L. innocua</i>	0 (0,00)	1 (2,17)	6 (14,63)	7 (5,26)

N= número de amostras analisadas.

* 130 amostras de queijo Minas frescal e 3 de queijo prato;

^a 6 das amostras eram da superfície de queijo Minas frescal (cada amostra composta por 15 queijos)

^b 38 amostras eram de queijo Minas frescal, sendo 3 delas coletadas da superfície do Minas frescal (cada amostra coletada da superfície de 15 queijos). As outras 3 amostras eram de superfície de queijo Prato (cada amostra composta por 15 queijos).

A partir da 3ª coleta, de cada laticínio, a busca pelo isolamento de *L. monocytogenes* nos queijos foi intensificada: além da amostragem que vinha sendo feita no produto (coleta de alíquotas de 50 g dos queijos), foram coletadas amostras da superfície dos queijos, com esponja, após permanência do produto na câmara fria, imediatamente antes da embalagem. Assim, de um mesmo lote, eram amostradas alíquotas do produto e também superfície de queijos. A técnica do uso de esponja permitiu amostrar mais peças de queijo, sem prejuízo ao laticínio, pois não é uma técnica destrutiva. Essa estratégia possibilitou o isolamento de *L. innocua* do queijo Minas frescal no laticínio B e *L. innocua* e *L. monocytogenes* de queijo Prato, no laticínio C (Tabela 9). No Brasil não há relatos de outros isolamentos de *L. monocytogenes* especificamente de queijo Prato. Os resultados do presente trabalho confirmam que queijos, mesmo preparados com leite pasteurizado (RUDOLF; SCHERER, 2001; KABUKI et al., 2004; BRITO et al., 2008; LOMONACO et al., 2009) podem ser fonte de *L. monocytogenes* para consumidores.

A ocorrência de *L. monocytogenes* em queijos é importante do ponto de vista de saúde pública, pois esse é um alimento na maioria das vezes ingerido sem cocção, o que representa possibilidade de veiculação da bactéria para consumidores. O queijo Prato é geralmente consumido puro, em sanduíches, saladas ou aperitivo (ABIC, 2010). Outros fatores importantes que devem ser considerados sobre o isolamento de *L. monocytogenes* nesse produto é o seu prazo de validade (60 dias) e a forma de armazenamento, em refrigeradores cuja temperatura propicia a multiplicação da bactéria, podendo resultar em doses infectantes no produto e/ou causar contaminações cruzadas em cozinhas de residências, comércio ou até mesmo de hospitais.

Se forem consideradas somente as amostras de queijo do laticínio C (N=41), a porcentagem de positivas para *L. monocytogenes* foi de 4,87 %. Considerando o total de amostras de queijo coletadas nos três laticínios (N=133), a porcentagem de amostras positivas para *L. monocytogenes* (1,50%) (Tabela 9), foi inferior à relatada por Kabuki et al. (2004) que encontraram 6,3% (7/111) nos EUA. No Brasil, estudos de Destro; De Melo Serrano; Kabuki (1991), Vieira; Massaguer (1999); Carvalho; Viotto; Kuaye (2007) e Brito et al. (2008) encontraram, respectivamente, 10% (2 / 20), 25% (5 / 20) ; 3,2% (3 / 93) e 11% (6/55) de amostras de queijo Minas frescal positivas para *L. monocytogenes* enquanto Casarotti; Gallo; Camargo (1994), Peresi et al. (2001), Silva et al. (2003) e Rocha (2004) não isolaram a bactéria nesse tipo de queijo, concordando com os resultados desta pesquisa.

A variação de ocorrência de *L. monocytogenes* em queijos pode ser explicada pelo uso de diferentes métodos para a detecção da bactéria e diferenças de padrões de qualidade dos queijos. Diferenças na ocorrência também podem ser explicadas pela distribuição geográfica do gênero *Listeria* (VAN KESSEL et al., 2004). Além disso, os coliformes talvez exerçam influência na população de *L. monocytogenes*, em queijo Minas

frescal, impedindo sua proliferação, podendo inclusive dificultar sua detecção, segundo Aragon-Alegro (2007).

L. innocua foi encontrada em queijos Minas frescal dos laticínios B e C (Tabela 9), demonstrando que contaminações por *Listeria* spp vêm ocorrendo nos produtos desses laticínios. A presença de outras espécies de *Listeria* indica que as condições de produção permitem contaminações por *L. monocytogenes* e servem de alerta para revisões do processo, a fim de evitar contaminação em pontos críticos da linha de produção. Naldini;Viotto; Kuaye (2009) demonstraram que queijo Minas frescal manufaturado pelo processo de acidificação direta com ácido láctico é mais susceptível à proliferação de *L. monocytogenes* do que o produzido pelo processo tradicional e é importante destacar que os 3 laticínios desta pesquisa utilizavam o processo de acidificação direta na fabricação desses queijos.

A imersão de queijos em salmoura é uma prática comum na salga de diversos tipos de queijo, como os de massa filada, semi cozida (Prato) e também os frescos, como o Minas frescal, em algumas indústrias. Por ser usada repetidamente, proteínas e outros nutrientes dos queijos se acumulam na salmoura tornando-a um ambiente rico em nutrientes (DURMAZ; AYGYN; ARDIC, 2009). No laticínio C foram encontradas *L. monocytogenes* em 2 de 4 amostras de salmoura e *L. innocua* em 3 das amostras (Quadro 4).

Quanto à enumeração de *Listeria* spp nas amostras, com amostras diluídas (1:10; 1:100; 1:1000) de queijo Minas (previamente armazenadas a -18 °C), não apareceu contaminação indesejada nas placas de ALOA. O congelamento prévio das amostras pode, eventualmente, ter provocado injúria ou morte da microbiota competidora presente e/ou os agentes antimicrobianos seletivos do meio foram eficientes para inibi-la. Já nas amostras de salmoura inoculadas sem diluição ou diluídas (1:10), diretamente sobre ALOA, foi observado, em duas amostras, crescimento de contaminantes nas placas, o que demonstra a baixa qualidade microbiológica da salmoura. Ferronato (2010) também observou um excesso de contaminantes quando tentou isolar *Listeria* spp de amostras de carne por semeadura direta em ágar ALOA, sem ser precedida de etapa de enriquecimento que propiciasse a inibição de contaminantes. Entretanto, com a técnica do NMP para contagens de *Listeria* nas amostras de salmoura e queijo, não foi observado crescimento de contaminantes nas placas de ALOA e Oxford. É importante considerar que, no caso da técnica do NMP, as amostras eram inoculadas em BLEB contendo agentes seletivos.

As populações de *Listeria* spp nas 3 amostras positivas de salmoura do laticínio C foram inferiores a 0,3 NMP/mL (Tabela 10). Embora a população tenha sido baixa, o isolamento de *L. monocytogenes* da salmoura é preocupante pois indica a possibilidade de ocorrência da bactéria no queijo Minas frescal e em outros queijos deste laticínio.

Não foi possível determinar a população de *L. innocua* da amostra de queijo Minas frescal positiva para a bactéria no laticínio B, pois a amostra havia sido coletada da superfície de queijos, com esponja e, por isso, não existia amostra reserva. O mesmo aconteceu com os queijos Prato do laticínio C. Entretanto, nas 3 amostras de queijo Minas embalados positivas para *L. innocua* do laticínio C, duas delas apresentaram contagens inferiores a 0,3 NMP/g e 1 amostra apresentou população de 9,2 NMP/g (Tabela 10).

Tabela 10 – Resultados da enumeração de *Listeria* spp nas amostras de produtos positivas do laticínio C, obtidas pelas técnicas de NMP (NMP/g ou mL) e de plaqueamento em superfície de Agar ALOA (UFC/g ou mL)

Produto	Coleta / data	NMP/g ou mL	UFC/g ou mL
Salmoura ¹	2 ^a (mar/2009)	< 0,3	<1,0
Salmoura ²	3 ^a (jun/2009)	<0,3	<1,0
Salmoura ³	4 ^a (set/2009)	<0,3	<1,0
Queijo Minas frescal (amostra 2)	4 ^a (set/2009)	<0,3	<10
Queijo Minas frescal (amostra 3)	4 ^a (set/2009)	<0,3	<10
Queijo Minas frescal (amostra 4)	4 ^a (set/2009)	9,2*	<10

* Nas placas utilizadas para a contagem foi confirmada a presença de *L. innocua*.

¹Temperatura = 6° C; pH = 5,7

²Temperatura = 5° C; pH = 5,5

³Temperatura = 9° C; pH = 5,7

É importante destacar que a contagem de 9,2 NMP/g de *Listeria innocua* detectada na amostra 4 do queijo Minas frescal (Tabela 10) só foi possível pela técnica do NMP, uma vez que o limite de detecção por essa técnica é superior ao da semeadura direta em placas.

Assim como ocorreu com *L. innocua*, caso *L. monocytogenes* estivesse presente nos queijos Minas frescal, provavelmente a sua população seria baixa e com distribuição irregular no produto. A população baixa de *L. monocytogenes* e a injúria sub letal causada pelo processamento são fatores que dificultam sua recuperação no caldo de enriquecimento. Assim, um resultado negativo não garante a ausência do patógeno. No produto final, resultados negativos podem levar a uma falsa segurança, tendo em vista que somente pequenos volumes são amostrados e, em muitos casos, pode não se detectar a contaminação.

Esses isolamentos de *L. innocua* dos queijos Minas frescal devem ser interpretados com cautela pois a presença dessa espécie pode estar relacionada a uma possível presença de *L. monocytogenes* (BRUHN; VOGEL; GRAM, 2005; CORNU; KALMOKOFF; FLANDROIS, 2002; PINTADO et al., 2005), além de *L. innocua* já ter sido envolvida em caso de infecção humana (PERRIN; BEMER; DELAMARE, 2003).

No laticínio C, a mesma salmoura utilizada na salga do queijo Minas frescal era empregada na salga dos queijos Mussarela e Prato, o que ressalta o risco de contaminação por *L. monocytogenes* também nesses queijos. *L. monocytogenes* tolera concentrações

altas de NaCl como 23,8% em pH 4,9 (LARSON et al., 1999) e pode se multiplicar em concentrações próximas a 10% (ROCOURT; BUCHRIESER, 2007). Geralmente as concentrações empregadas em salmouras de laticínios são de 18 a 24% para a maioria dos queijos, mantidas entre 4 e 10° C (LARSON et al., 1999). Larson et al. (1999) verificaram que, em salmouras comerciais coletadas de indústrias de queijo, inoculadas com *L. monocytogenes*, a sobrevivência da bactéria variou entre menos de 7 a mais do que 259 dias. Também constataram que a sobrevivência da bactéria geralmente foi maior em salmoura mantida a 4°C do que a 12°C, porém, não observaram multiplicação da bactéria nas amostras testadas. Já Durmaz; Aygyn; Ardic (2009) recomendam que salmouras para queijos tenham concentração de NaCl de 19% ou superiores, com base na observação de que a bactéria pode sobreviver se as concentrações de sal não forem superiores a 19%.

Contrastando com os resultados desta pesquisa, Jacquet; Rocourt; Reynould (1993) isolaram somente *L. innocua* de salmoura de laticínio na França, resultado semelhante ao Menendez et al. (1997) que encontraram apenas de *L. innocua* em salmoura de laticínio na Espanha. Alessandria et al. (2010) também não isolaram *L. monocytogenes* de salmoura de laticínio utilizando técnicas convencionais de isolamento. Alessandria et al. (2010) empregaram métodos moleculares para analisar rotas de contaminação por *L. monocytogenes* em indústria de laticínio e verificaram que o método molecular foi mais sensível do que o convencional empregado. Por PCR quantitativa detectaram populações de 4 a 5 log UFC/cm² em equipamentos, enquanto o método tradicional resultou negativo. Consideraram falso-negativos os resultados pelo método convencional, principalmente em amostras coletadas de equipamentos e de salmoura e alertam que os métodos microbiológicos convencionais podem subestimar a presença de *L. monocytogenes* em indústrias de laticínios. Provavelmente a injúria da bactéria, causada pela alta pressão osmótica da salmoura e por sanitizantes utilizados nos equipamentos tenham dificultado o isolamento na pesquisa de Alessandria et al. (2010) e isso provavelmente venha ocorrendo em pesquisas que utilizam técnicas convencionais, inclusive essa.

Não foram encontradas descrições de isolamento de *L. monocytogenes* ou de qualquer outra espécie de *Listeria* em salmoura utilizada em laticínios, no Brasil, sendo os isolamentos desta pesquisa inéditos no país. No exterior, somente na pesquisa de Wagner et al. (2006), que investigaram 181 indústrias processadoras de queijo, há relato de isolamento de *L. monocytogenes* de salmoura, em 2 das indústrias.

O emprego de boas práticas de manipulação, higienização do ambiente e de uma rotina de pasteurização e filtração da salmoura podem ser a chave da prevenção da contaminação pelo microrganismo. Para redução da carga microbiana em salmoura, podem ser empregadas membranas ou filtros para remoção de material particulado e microrganismos ou pasteurização periódica da salmoura (LARSON et al., 1999).

Esta, assim como outras pesquisas (BRITO et al., 2008; MENENDEZ et al., 1997, MIETTINEN, BJÖRKROTH, KORKEALA, 1999; KABUKI et al., 2004) mostram a importância de se localizar nichos onde *L. monocytogenes* possa sobreviver no ambiente de processamento de produtos lácteos para que sejam direcionados esforços de higienização e, se necessário, reformas estruturais nestes locais.

5.3 Diversidade e distribuição de sorotipos de *L. monocytogenes*

A caracterização antigênica dos 85 isolados identificados como *L. monocytogenes* revelou 4 sorotipos: 4b, 1/2b, 1/2c e 1/2a (Tabela 11). Os sorotipos 1/2c e 4b foram isolados dos laticínios B e C, com predomínio do 4b em ambos (Tabela 11), o que é de extrema importância, pois este é o mais frequentemente envolvido em surtos e casos de listeriose humana (GRAVES; SWAMINATHAM; HUNTER, 2007; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007).

Tabela 11 – Ocorrência de sorotipos de *L. monocytogenes* isolados dos laticínios B e C

Sorotipo	Laticínio B N (%)	Laticínio C N (%)	Total N (%)
4b	43 (78,18)	26 (86,66)	69 (81,17)
1/2b	8 (14,54)	0 (0,00)	8 (9,41)
1/2c	4 (7,27)	2 (6,66)	6 (7,06)
1/2a	0 (0,00)	2 (6,66)	2 (2,35)
Total	55 (100)	30 (100)	85 (100)

Essa alta prevalência do sorotipo 4b nas instalações dos laticínios B e C, não ligados epidemiologicamente, não era esperada, uma vez que esse sorotipo não é dominante em alimentos (KATHARIOU, 2002). Os sorotipos 1/2a, 1/2b e 1/2c são os mais frequentemente isolados de alimentos e ambientes relacionados à produção de alimentos (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007). Além disso, no Brasil, o sorotipo 1/2a tem sido o mais freqüentemente isolado de produtos lácteos (HOFER; REIS; HOFER, 2006, BRITO et al., 2008; ABRAHÃO et al., 2008; DE NES et al., 2010). O predomínio do sorotipo 4b nos 2 laticínios desta pesquisa pode sugerir uma natureza endêmica desse sorotipo, associada a particularidades desses laticínios, que apresentam características similares como pequena escala de produção, deficiência nos processos de higienização e falta de treinamento dos

manipuladores de alimentos, constatadas pelas falhas observadas durante o processamento dos queijos, com relação ao emprego de BPF.

Higiene pessoal inadequada poderia explicar a maior prevalência do sorotipo 4b nessas indústrias, uma vez que este é o sorotipo mais prevalente entre isolados de humanos portadores assintomáticos da bactéria (HOFER; REIS; HOFER, 2006) e de amostras clínicas associadas à listeriose humana no Brasil (HOFER; PESSÔA; MELLES, 1984; HOFER; RIBEIRO, FEITOSA, 2000; LEMES-MARQUES; CRUZ; DESTRO, 2007).

A distribuição de sorotipos de *L. monocytogenes* nas respectivas fontes de isolamento nos laticínios B e C está descrita na Tabela 12. Observa-se, em alguns casos, isolamento simultâneo de mais de um sorotipo de *L. monocytogenes* em uma única amostra.

Tabela 12 – Distribuição de sorotipos de *L. monocytogenes* nos laticínios B e C

Ponto de Isolamento	Sorotipos (número de isolados em cada ponto)			
	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
Laticínio B	Nov/2008	Fev/2009	Mai/2009	Ago/2009
Piso (sala pasteurização)	4b(1) 1/2b(1)	4b(2)	-	1/2c(4)
Ralo câmara fria A	4b(1)	4b(6)	4b(5)	4b(3) 1/2b(1)
Estrado câmara fria A	-	-	4b(2)	4b (2)-1/2b(1)
Piso câmara fria A	-	4b(4)	4b(3) 1/2b(1)	4b(4)
Piso câmara fria B	4b(1)	4b(2) 1/2b(1)	1/2b(2)	4b(4)
Caixas plásticas	-	-	-	4b(3)– 1/2b(1)
Laticínio C	Dez/2008	Mar/2009	Jun/2009	Set/2009
Estrado da câmara fria	-	4b(1)	-	4b(1)
Piso da câmara fria	4b(2)	-	4b(2) 1/2a(1)	4b(5)
Manipulador (luvas)*	-	4b(3)	-	-
Caixas plásticas	-	-	-	4b(3) 1/2a(1)
Salmoura	-	-	1/2c(2)	4b(3)
Queijo prato	NC	NC	NC	4b(6)

* área de embalagem; - não isolada *L. monocytogenes*; NC=amostra não coletada

Pode-se observar na Tabela 12 que em ambos os laticínios as caixas plásticas abrigaram mais de um sorotipo de *L. monocytogenes*, o que mostra que são veículos importantes da bactéria no interior desses estabelecimentos. No laticínio B é interessante destacar a presença de mais de um sorotipo em todos os pontos positivos para a bactéria, indicando que esses locais são contaminados por mais de uma linhagem. Um dado

interessante é que o piso da área de recepção do leite cru, onde fica o pasteurizador desse laticínio, foi o local que apresentou a maior diversidade de sorotipos.

No laticínio C é importante destacar o isolamento de *L. monocytogenes* do sorotipo 4b em amostras de salmoura, queijo Prato e luvas de manipulador (Tabela 12). A presença do sorotipo 4b em produtos pode resultar em casos esporádicos ou surtos de listeriose, particularmente no caso de consumo por populações de risco para a doença (KATHARIOU, 2002).

A diversidade de sorotipos de *L. monocytogenes* isolados de indústrias de produtos lácteos foi pouco explorada em pesquisas no Brasil. Nos poucos estudos houve predomínio dos sorotipos 1/2a e 4b. Assim, Silva et al. (2003), a partir de dois isolados encontrados em laticínio na Bahia, constataram que um era do sorotipo 1/2a e o outro do 4b. Brito et al. (2008), de 344 isolados provenientes de um único laticínio em Minas Gerais, verificaram que todos pertenciam ao sorotipo 1/2a. Em contraste com as duas pesquisas citadas e muito semelhante aos resultados do presente trabalho, Figueiredo (2000) encontrou predomínio do sorotipo 4b (39,13%) além de 1/2b, 1/2a e 1/2c, em amostras provenientes de linha de processamento de leite pasteurizado tipo C, em Fortaleza.

Semelhante aos resultados do presente trabalho, pesquisas recentes em Portugal mostram predomínio do sorotipo 4b em amostras de laticínios e queijos daquele país: em uma pesquisa com *Listeria* spp. com queijos elaborados com cru leite de ovelha, dos 24 isolados de *L. monocytogenes* sorotipados a maioria era do sorotipo 4b (PINTADO et al., 2005). Chambel et al. (2007) encontraram predomínio do sorotipo 4b em ambiente de indústrias de laticínios em Portugal. Leite et al. (2006) pesquisaram *L. monocytogenes* em queijos de leite de ovelha produzidos em diferentes fazendas e ambientes relacionados à produção dos queijos e também verificaram maior prevalência do sorotipo 4b.

Na Áustria, de 181 indústrias de queijo de pequena escala analisadas, Wagner et al. (2006) encontraram *L. monocytogenes* em 50 delas, tendo isolado os mesmos sorotipos encontrados no presente trabalho (4b, 1/2b, 1/2a e 1/2c) com predomínio de 1/2b e alta prevalência de 4b, que foi atribuída à higiene pessoal inadequada dos manipuladores. Laticínios de pequena escala de produção podem não reconhecer contaminações por *L. monocytogenes* com a mesma eficiência de produtores de larga escala, além das práticas de higiene poderem ser aplicadas com menos rigor nas pequenas indústrias.

Pesquisas mais antigas de isolamento de *L. monocytogenes* de tanques de leite, silos de armazenamento, áreas de processamento de leite, mostram o sorotipo 4b geralmente detectado em baixos níveis ou não encontrado (JACQUET; ROCOURT; REYNAUD, 1993; WAAK; THAM; DANIELSSON-THAM, 2002).

Na França, uma indústria produtora de queijo foi amostrada e, das 344 amostras coletadas, foram obtidos 44 isolados de *L. monocytogenes*, de queijos e ambiente, tendo

sido isolados os sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c e 3a (JAQUET; ROCOURT; REYNAUD, 1993). Na Suíça foi encontrado predomínio dos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b em amostras coletadas de laticínios, durante 10 anos (PAK et al., 2002). Na Itália, pesquisa em 22 indústrias produtoras de queijo gorgonzola (queijos e ambiente), dos 95 isolados confirmados como *L. monocytogenes*, 88% pertenciam ao sorotipo 1/2a, e apenas um era do sorotipo 4b (LOMONACO et al., 2009). Na Finlândia, em indústria processadora de sorvete, SJÖMAN (2010) encontrou os sorotipos 1/2b e 4b.

Embora o benefício epidemiológico da sorotipagem seja limitado pelo fato do método ser pouco discriminatório, é importante o conhecimento da ocorrência e distribuição de sorotipos, além dessa ser uma forma de rastreamento de contaminações. Além disso, o sorotipo é uma característica que deve ser considerada no desenvolvimento de modelos de análises de risco com *L. monocytogenes* (PAK et al., 2002).

5.4 Diversidade de genótipos de *Listeria monocytogenes* por PFGE

Os 85 isolados confirmados como *L. monocytogenes* foram analisados por PFGE com as enzimas *Apal* e *Ascl*. Essas endonucleases permitiram a tipagem de todos os isolados. Em trabalhos anteriores a combinação dessas enzimas apresentou excelente poder discriminatório (LEITE et al., 2006; FUGGET, 2007; NEVES et al. 2008). Dados dos isolados tais como origem, ponto de isolamento, sorotipo, ordem de coleta das amostras e período de coleta estão apresentados no Apêndice A.

Quando se faz tipagem de um conjunto de isolados suspeitos, no caso de surtos, é recomendado incluir uma amostra epidemiologicamente não relacionada na análise de PFGE (TENOVER et al., 1995). Assim, neste estudo epidemiológico, foram incluídos na análise: *L. monocytogenes* EP97 isolada de alface em 1997; *L. monocytogenes* EP10 isolada de carne suína em 2010 e *L. monocytogenes* ATCC® 7644 isolada de líquido céfalo raquidiano humano, além de isolados da espécie *L. seeligeri*. Todos esses isolados foram tipáveis por *Apal* e *Ascl*.

Exemplos de perfis de PFGE de *L. monocytogenes* após a digestão do DNA com as enzimas *Apal* e *Ascl* estão apresentados nas Figuras 7 e 8, respectivamente. Uma avaliação visual das bandas desses géis mostra que a maioria dos isolados é aparentemente indistinguível, porém observa-se também que há isolados distintos, indicando que o padrão genético não é único. Entretanto, perfis de PFGE que visualmente são indistinguíveis podem ser diferenciados por análise em programas computacionais (HAMDI e tal., 2007; NEVES et al., 2008).

Figura 7 – Perfis de PFGE obtidos com a enzima *Apal*. L: Lambda Ladder PFGE Marker; 1b, 2b, 3b, 4b, 5b, 6b, 7b, 8b, 9b, 10b, 11b, 12b: DNA de isolados de *L. monocytogenes* digeridos com *Apal*

Figura 8 – Perfis de PFGE obtidos com a enzima *Ascl*. L: Lambda Ladder PFGE Marker; 29B, 30B, 31B, 32B, 33B, 34B, 35B, 36B, 37B, 38B, 39B, 40B: DNA de isolados de *L. monocytogenes* digeridos com *Ascl*

Neste trabalho foi utilizado o programa BioNumerics versão 5.1 para a construção de dendrogramas para determinar as relações genéticas entre os isolados. A análise de PFGE com *Apal* diferenciou um total de 92 isolados em 35 perfis (dendrograma no Apêndice B). Destes isolados, 85 eram de *L. monocytogenes* provenientes dos laticínios; 4 de *L. seeligeri* e 1 de cada linhagem: *L. monocytogenes* ATCC® 7644; *L. monocytogenes* EP97; *L. monocytogenes* EP10. Utilizando a enzima *Ascl* foram obtidos 27 perfis (dendrograma no Apêndice C). Essas análises permitiram observar um maior índice discriminatório com *Apal* (0,90) comparado à *Ascl* (0,81). Estudos de tipagem de *L. monocytogenes* por PFGE encontraram divergências em relação ao poder discriminatório das enzimas *Apal* e *Ascl*. Assim, Broch; Chen; Luchansky (1994) e Neves et al. (2008) relatam maior poder discriminatório com *Apal*, concordando com o resultado desta pesquisa enquanto Miettinen; Björkroth; Korkeala (1999) verificaram maior poder discriminatório com *Ascl*, porém Leite et al. (2006) e Fugett et al. (2007) não encontraram diferença entre ambas.

Autoridades sanitárias da França utilizam apenas *Apal* para estabelecer ligações epidemiológicas entre linhagens de *L. monocytogenes* (THÉVENOT et al., 2006). Para

vigilância epidemiológica de *L. monocytogenes* utilizando a técnica de PFGE, o uso de uma enzima é suficiente, mas, em estudos de contaminação ou suspeita de surtos, o uso de pelo menos duas enzimas é recomendado, a fim de aumentar o poder discriminatório da técnica (SJÖMAN, 2010). Fugget (2007); Neves et al. (2008) e Yde; Genicot (2004) relatam que a análise com duas enzimas (*Apal* e *Ascl*) mostrou maior poder discriminatório do que uma única, reforçando a importância da combinação de ambas na análise de *L. monocytogenes*.

Assim, uma análise dos perfis combinados de *Apal* e *Ascl* resultou em 43 perfis de PFGE (denominados pulsotipos) e estão representados pelos códigos P1 a P43, sendo que 3 deles (P41, P42 e P43) são de *L. seeligeri* (Figura 9). O índice de discriminação obtido com a combinação de perfis *Apal* e *Ascl* foi de 0,94. Nos dendrogramas, os códigos dos isolados de *L. monocytogenes* dos laticínios estão representados por números, sendo os do laticínio B acompanhados pela letra B e os do laticínio C, pela letra C.

No apêndice D está sumarizado o número de isolados de *L. monocytogenes* dentro de cada pulsotipo (perfis combinados *Apal* e *Ascl*). Observa-se que o pulsotipo 27 foi o que agrupou o maior número de isolados (n=21).

Figura 9 – Dendrograma representando relações genéticas (perfis de PFGE *Apal* e *Ascl*) entre isolados de *L. monocytogenes* dos laticínios e isolados incluídos na análise: *L. monocytogenes* ATCC® 7644, *L. monocytogenes* EP97, *L. monocytogenes* EP10 e *L. seeligeri*. Os códigos de isolados, sorotipos, pontos de isolamento (fonte), ordem de coleta e pulsotipos estão apresentados à direita. Os sorotipos estão representados por cores: ■ 4b; ■ 1/2b; ■ 1/2a; ■ 1/2c. ■ representam isolados de *L. seeligeri*.

Pela análise dos perfis combinados de PFGE (Figura 9), é possível observar uma nítida separação entre a espécie *L. seeligeri* e a população de *L. monocytogenes*, com apenas 56,2% de similaridade entre essas espécies. Isoladamente, *Ascl* também separou *L. seeligeri* de *L. monocytogenes* (Apêndice C). Entretanto, *Apal*, não separou 3 dos isolados de *L. seeligeri* da população de *L. monocytogenes* (Apêndice B), de acordo com a observação de Chiarini (2007) que relata que a enzima *Apal* não foi eficiente para separar *L. monocytogenes* de outras espécies de *Listeria*.

A análise de perfis de PFGE de uma população pode apresentar grande complexidade. Assim, os resultados precisam ser interpretados num contexto epidemiológico e a técnica, isoladamente, não pode estabelecer conexão epidemiológica entre dois isolados. Menos óbvio, mas igualmente verdadeiro, é que diferenças claras de padrões não provam que isolados não são epidemiologicamente relacionados (BARRET; GERNER-SMIDT; SWAMINATHAN, 2006). A PFGE é considerada uma técnica de alto poder discriminatório, no entanto a detecção de pequenas diferenças genéticas podem não ser epidemiologicamente significantes. Eventos genéticos ao acaso como ocorrência de pontos de mutação, inserções e deleções de DNA, durante um surto por exemplo, alteram os perfis de PFGE de microrganismos o que torna a interpretação dos resultados mais desafiadora (TENOVER et al., 1995). Segundo Nelson et al. (2004), existem poucas diferenças no genoma de 4 linhagens de *L. monocytogenes* sequenciadas que, apesar de pertencerem a diferentes eventos epidêmicos e sorotipos (1/2a e 4b), mostram que há poucas regiões únicas dentro da espécie a serem estudadas para entender epidemias, patogenicidade e virulência. A presença de elementos de transposição no genoma podem auxiliar na separação de linhagens, pois estes são muitas vezes instáveis, proporcionando recombinação dentro da molécula ou transposição de elementos. Se linhagens de uma bactéria se alteram rapidamente, até mesmo repiques de uma mesma linhagem podem mostrar diferentes subtipos em PFGE (BARRET; GERNER-SMIDT; SWAMINATHAN, 2006). Segundo Tenover et al. (1995), ao se comparar isolados analisados por PFGE, com um isolado causador de um surto, com base em diferenças no número e tamanho de bandas, pode-se classificar os mesmos como indistinguíveis, altamente relacionados, possivelmente relacionados ou não relacionados. Assim, com variações entre 1 a 3 bandas, os isolados podem ser considerados altamente relacionados; variações entre 4 a 6 bandas possivelmente relacionados e, com variações de 7 bandas ou mais os isolados provavelmente não são relacionados. Barret; Gerner-Smidt; Swaminathan (2006) consideram o critério de Tenover et al. (1995) uma estimativa até conservadora do número de eventos genéticos que representam alterações nos perfis de PFGE, e exemplificam com a situação de que dois eventos genéticos podem gerar até 6 bandas diferentes.

Linhagens persistentes em indústrias de alimentos, ou causadoras de surtos, podem apresentar alterações genéticas que resultem em padrões de PFGE com diferenças de até três bandas (GRAVES et al., 2005; SAUDERS et al., 2009). Assim, analisando diversidade e persistência de *L. monocytogenes* em estabelecimentos de venda de alimentos, Sauders et al. (2009) consideraram que isolados apresentando até 3 bandas de diferença nos perfis *Apal* + *Ascl*, pertenciam a um mesmo padrão de PFGE e foram considerados persistentes naqueles estabelecimentos.

Embora se saiba que um determinado valor de porcentagem de similaridade de análise de “clusters” de uma dada população de *L. monocytogenes* não possa ser “transferido” para outra, verifica-se uma tendência, na literatura, de apontar valores em torno de 90% para considerar dois isolados de *L. monocytogenes* altamente relacionados. Assim, Borucki et al. (2005) consideraram altamente relacionados isolados que apresentaram em torno de 95% de similaridade quando compararam linhagens causadoras de listeriose com linhagens isoladas de animais assintomáticos; Hamdi e al. (2007) consideraram altamente relacionadas linhagens isoladas de leite que apresentaram similaridades entre 85 e 90%; e Leite et al. (2006) se referiram a isolados que exibiram 89% de similaridade como tendo uma “origem clonal”, transmitindo a idéia de que seriam altamente relacionados. Já para a população de *L. monocytogenes* estudada por Gravensen et al. (2000), com 80% de similaridade, as diferenças entre bandas correspondiam a um evento genético e foram considerados altamente relacionados, com base no critério de Tenover et al. (1995). Dauphin; Ragimbeau; Malle (2001) consideraram genomicamente distantes as *L. monocytogenes* que apresentaram 60% de similaridade por PFGE.

Com base nos trabalhos de Gravensen et al. (2000); Borucki et al. (2005); Hamdi et al. (2007) e Leite et al. (2006), num primeiro momento, pode-se pensar que 90% seria um valor de similaridade no qual os isolados sempre seriam altamente relacionados. Entretanto, no presente trabalho isso nem sempre acontece, pois isolados com porcentagem de similaridade próxima a 90% apresentam diferença visual entre 4 a 6 bandas, e seriam considerados “possivelmente relacionados” pelo critério de Tenover et al. (1995). É o caso dos isolados 2B e 52B, com 90% de similaridade (Figura 9) e diferença visual de 4 bandas. A linha de orientação de Tenover et al. (1995) para interpretar dados de PFGE foi proposta para examinar conjuntos pequenos de isolados (≤ 30).

Para a população de *L. monocytogenes* obtida no presente estudo, foram feitas comparações visuais entre as bandas de alguns isolados, bem como de 3 isolados obtidos em estudos anteriores. Considerando o critério de Tenover et al. (1995) para avaliar as diferenças visuais entre bandas e as porcentagens de similaridade (perfis combinados) calculadas pelo BioNumerics, e o contexto epidemiológico, foi estabelecida uma linha de corte a partir da qual os isolados dessa população poderiam ser considerados altamente

relacionados. No dendrograma de similaridade com perfis combinados, essa linha de corte ficou estabelecida em 95%. Isolados que apresentaram 100% de similaridade após a digestão do DNA com *Apal* e *Ascl* (perfis combinados) foram considerados pertencentes a um mesmo perfil de PFGE (pulsotipo) (Figura 9). É importante destacar que, para Gravensen et al. (2000) isolados de *L. monocytogenes* altamente relacionados foram considerados pertencentes a um padrão único de PFGE.

A análise de perfis combinados de PFGE (Figura 9) da população de *L. monocytogenes* em estudo mostra inicialmente 3 grupos de isolados: Grupo 1 (G1) Grupo 2 (G2) e Grupo 3 (G3), com isolados principalmente agrupados por sorotipos e os pulsotipos representados pelos códigos P1 a P40 nessa figura.

Ainda na Figura 9 se observa que o G1 concentra isolados dos laticínios B e C, com uma diversidade de sorotipos. O subgrupo G1a é constituído principalmente por isolados do laticínio B formando agrupamentos menores, de acordo com o sorotipo. O subgrupo G1b inclui somente o sorotipo 4b (pertencente à *Linhagem I*) com isolados de ambos os laticínios. O G1c corresponde a um isolado que apresenta menor similaridade com os demais do G1. A maioria dos isolados do laticínio B e C estão agrupados no G2, além de 2 outros isolados incluídos na análise, o da carne suína e o da alface. No G2 ficaram apenas isolados dos sorotipos 4b e 1/2b, ambos pertencentes à chamada *Linhagem I* de *L. monocytogenes* (RAGON et al., 2008), o que é coerente com outras pesquisas (BROSCH; CHEN; LUCHANSKY, 1994; BERZINS et al., 2007; NEVES et al., 2008). Perfis geneticamente menos relacionados aos grupos G1 e G2, com apenas 61,7% de similaridade, formaram o G3, que inclui os isolados da salmoura do laticínio C e a linhagem ATCC® 7644, todos do sorotipo 1/2c (*Linhagem II* de *L. monocytogenes*). A base molecular para as relações entre sorotipos e subtipagem de *L. monocytogenes* baseada em DNA ainda não é clara. A presença de subconjuntos de fragmentos sorotipo específicos tem sido sugerida (OKWUMABUA et al. 2005).

É possível ter uma visão da heterogeneidade genética da população de *L. monocytogenes* comparando-se os Grupos 1, 2 e 3 (Figura 9). Observa-se que isolados os do laticínio C ficaram incluídos nos 3 grupos, o que demonstra uma ampla diversidade genética de *L. monocytogenes* presente no interior desse laticínio.

Com relação ao detalhamento das características dos subgrupos, no subgrupo G1a, isolados do sorotipo 1/2c (*Linhagem II*) ficaram mais próximos de isolados do sorotipo 1/2b (*Linhagem I*) do que outros da própria *Linhagem II* (sorotipo 1/2a). É possível que no presente trabalho não tenha ocorrido uma melhor separação entre esses isolados da *Linhagem I* e *II* porque não foram consideradas, na análise, bandas de peso molecular inferiores a 48,5 kb. Brosch; Chen; Luchansky (1994) verificaram separação entre as

Linhagens I e II quando compararam fragmentos de baixo peso molecular (23 a 60 kb) entre isolados.

No G2 (Figura 9) observa-se um pulsotipo (P27) compartilhado entre os laticínios B e C. Neste grupo, verifica-se que isolados do queijo Prato e de luvas de manipulador do laticínio C apresentaram 100% de similaridade com isolados provenientes do ralo, caixas plásticas, estrado, piso de câmara fria do laticínio A, todos pertencentes ao pulsotipo P27. A presença de isolados de um mesmo pulsotipo em ambos os laticínios sugere que este seja um subtipo de *L. monocytogenes* oriundo de uma fonte comum ou seja amplamente distribuído na natureza (AUTIO et al., 2002), o que pode ter facilitado a contaminação dos dois estabelecimentos.

A existência de uma fonte única de contaminação para os laticínios B e C parece pouco provável, uma vez que as indústrias são independentes, distantes entre si por mais de 100 km e não compartilham fornecedores de leite cru. A hipótese de uma ampla distribuição desse pulsotipo é mais plausível. Estudos na Áustria (WAGNER et al., 2006) e Portugal (LEITE et al., 2006) mostram a ocorrência de um mesmo perfil genético (PFGE) proveniente de diversos laticínios não relacionados epidemiologicamente, sugerindo que alguns subtipos de *L. monocytogenes* são amplamente distribuídos e tornam-se endêmicos, por adaptarem-se a nichos ecológicos específicos, como o ambiente de produção dos queijos.

No laticínio B foram isolados 21 pulsotipos e, no laticínio C, 17 pulsotipos. A distribuição de pulsotipos no interior de cada planta está sumarizada na Tabela 13. É possível observar o pulsotipo comum (P27) encontrado em ambos os laticínios e o isolamento repetido, em mais de uma coleta, de 3 pulsotipos (P21, P24 e P27) no laticínio B e de 1 pulsotipo no laticínio C (P27).

Tabela 13 – Pulsotipos presentes nos laticínios, nos respectivos pontos de isolamento

Ponto de isolamento	Código do pulsotipo			
	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
Laticínio B	Nov/2008	Fev/2009	Mai/2009	Ago/2009
Piso da câmara fria A		P19 P21	P3 P24 P25 P29	(P27)
Ralo da câmara fria A	(P27)	P18 P20 (P27)	P21 P28	P21 P22 P23
Estrado câmara fria A			P24	(P27)
Piso da câmara fria B	P24	P4 P21 P31	P1 P3	P8 P10
Piso (sala pasteurização)	P2 P13	P17		P5
Caixas plásticas				(P27)
Laticínio C	Dez/2008	Mar/2009	Jun/2009	Set/2009
Piso da câmara fria	P37 P38		P7 P9 P11	P30 P34 P35
Estrado câmara fria		P26		P36
Caixas plásticas				P6 P12 P14 P15
Luvas de manipulador		P26 (P27)		
Salmoura			P39	P33
Queijo Prato				(P27)

Códigos destacados de amarelo representam pulsotipos isolados repetidamente, em mais de uma coleta, dentro de cada laticínio.

Código entre parênteses e destacado de amarelo representa um pulsotipo comum aos dois laticínios.

O isolamento de um mesmo pulsotipo no interior de um laticínio em mais de uma coleta sugere sua persistência no ambiente. Na Tabela 13, observa-se que no laticínio B o pulsotipo P24 foi isolado de câmaras frias na 1ª e 3ª coletas e o P21 na câmara fria da 2ª, 3ª e 4ª coletas. O pulsotipo P27 foi isolado da câmara fria A na 1ª, 2ª e 4ª coletas além de ter sido encontrado das caixas da 4ª coleta. Isso demonstra que as câmaras frias do laticínio B abrigam subtipos da bactéria provavelmente persistentes. Interessante é que o pulsotipo P27, que demonstra ser persistente no laticínio B, também foi isolado em mais de uma coleta no laticínio C: das luvas de manipulador na 2ª coleta e do queijo Prato na 4ª coleta, sugerindo também sua persistência nesse laticínio.

É possível que os subtipos de *L. monocytogenes* isolados repetidamente no mesmo estabelecimento não sejam persistentes no ambiente, mas sejam constantemente reintroduzidos. Esse é um cenário provável, uma vez que nesses laticínios não havia medidas de prevenção de entrada de patógenos a partir do ambiente externo, por exemplo, pela falta de higienização de botas de funcionários e visitantes. Entretanto, pela evidente falta de higienização de pisos e ralos, é mais provável que os pulsotipos isolados repetidamente dos laticínios B e C sejam persistentes e, certamente eram contaminantes dessas indústrias antes mesmo do início das coletas. Diversas pesquisas (MIETTINEN;

BJÖRKROTH; KORKEALA, 1999; AUTIO et al., 2003; SAUDERS et al., 2009) mostram uma tendência de certas linhagens de *L. monocytogenes* persistirem em indústrias ou estabelecimentos que processam alimentos. Uma linhagem é considerada persistente quando é encontrada repetidamente em uma planta de processamento, porém, não se sabe se a persistência é resultado da adaptação de certos subtipos da bactéria, de limpeza e sanificação deficientes ou da habilidade do microrganismo desenvolver tolerância a alguns dos produtos utilizados no processo de higienização industrial (GRAM et al., 2007).

É importante destacar, dentro do subgrupo G2b, pulsotipos do sorotipo 4b (P17, P18, P19, P20, P21, P22, P24, P25, P26, P27, P28 e P29) com alta similaridade ($\geq 95,2\%$) encontrados em diversas ocasiões de coletas, o que sugere que são descendentes de um ancestral comum, e sua presença pode significar persistência de uma linhagem nos estabelecimentos. Essa baixa heterogeneidade genética entre esses isolados obtidos nos dois laticínios sugere que as condições dessas indústrias favorecem esses subtipos de *L. monocytogenes*.

Miettinen; Björkroth; Korkeala (1999) observaram uma tendência semelhante de perfis de PFGE à encontrada no presente trabalho quando pesquisaram *L. monocytogenes* em indústria de sorvete. Verificaram que grande parte dos isolados formou um grupo homogêneo, constituído por isolados altamente relacionados que, segundo os autores, pareciam ter um “ancestral clonal”, além de um pulsotipo persistente nas instalações por 7 anos. Os subtipos altamente relacionados foram considerados prováveis “mutantes” do tipo persistente, uma vez que se diferenciaram do mesmo por uma ou duas bandas.

É importante destacar no subgrupo G2b, que os isolados 44B e 45B, que pertencem ao sorotipo 1/2b, não foram diferenciados de isolados do sorotipo 4b que constituem o pulsotipo P27.

Na Tabela 13 também verifica-se uma diversidade considerável de perfis de PFGE nos laticínios B e C, em contraste com o único trabalho conduzido no Brasil, que analisou por PFGE *L. monocytogenes* de um laticínio e encontrou todos os 344 isolados pertencentes ao sorotipo 1/2a com perfis indistinguíveis (Apal e Ascl), demonstrando um padrão homogêneo de contaminação pela bactéria naquelas instalações (BRITO et al., 2008).

No presente estudo, a PFGE também mostrou perfis geneticamente distantes contaminando o interior dos laticínios B e C. Na Figura 9 observa-se, dentro do G1, que há isolados que apresentam menos de 80% de similaridade, os quais, para essa população, seriam considerados não relacionados pelo critério de TENOVER et al. (1995), o que ocorre quando se compara isolados dos subgrupos G1a, G1b e G1c. No Grupo 2, no subgrupo G2d, se concentram isolados da salmoura e ambiente, todos do laticínio C, do sorotipo 4b. Estes isolados apresentam similaridade no máximo de 77,2% com outros isolados do laticínio C alocados no G2b e são ainda menos similares (69,8%) com os isolados do G1.

Assim, é possível observar que no laticínio C há isolados do sorotipo 4b com baixa similaridade genética, mostrando que uma ampla variabilidade de perfis de PFGE desse sorotipo contamina esse laticínio. Da mesma forma, comparando-se os isolados do laticínio B do G2 com os do G1, também se observa que perfis com baixa similaridade, dos sorotipos 4b e 1/2b, contaminam esse laticínio.

A ocorrência de perfis com baixa similaridade sugere a existência de diversas fontes de contaminação como matéria prima contaminada e/ou persistência de diferentes linhagens (THÉVENOT et al., 2006). No presente trabalho, no entanto, *L. monocytogenes* não foi isolada do leite cru. Falhas de higienização do ambiente observadas nos laticínios B e C certamente favorecem a presença dessa diversidade de subtipos da bactéria.

Se, por um lado, a ocorrência de diversos perfis de PFGE numa indústria sugere que o controle da bactéria no ambiente é complexo, pois provavelmente envolve diversas fontes de contaminação e/ou persistência de diversos subtipos adaptados ao ambiente, por outro, a persistência de um determinado perfil também é problemática pois pode significar adaptação da bactéria a nichos e biofilmes e/ou resistência aos processos de higienização.

No G2 ficou alocado o isolado de carne suína (pulsotipo P32), que apresenta no máximo 81,5% de similaridade com os demais isolados dos laticínios (Figura 9). Comparando-se o isolado da carne com dois isolados de laticínios pertencentes aos pulsotipos P15 e P27, observa-se mais de 8 bandas de diferença entre eles, o que mostra que o isolado da carne não é relacionado a esses isolados do laticínio, pelo critério de Tenover et al. (1995). Também o isolado da alface (P16) ficou distante da maioria dos isolados dos laticínios (máximo de 82,6% de similaridade) e com diferença maior do que 7 bandas em relação ao pulsotipo P27, mostrando que não são relacionados. Porém o isolado da alface ficou um pouco mais próximo do isolado de caixas plásticas do laticínio C (P15) apresentando 91,1% de similaridade.

Além da provável persistência de linhagens, a PFGE apontou rotas importantes de contaminação cruzada por *L. monocytogenes* (Tabela 13). Assim, no laticínio B, na 4ª coleta, foi isolado o mesmo pulsotipo (P27) do piso e estrados da câmara fria A e de caixas plásticas. No laticínio C, a ocorrência de pulsotipos na salmoura (P33) e no piso da câmara fria (P34) com alta similaridade (97,1%), sugere uma rota de contaminação e mostra que práticas inadequadas de fabricação levam à contaminação da salmoura. Também no laticínio C, o mesmo pulsotipo (P26) foi encontrado em luvas de manipulador e no estrado da câmara fria. Esses dados indicam ocorrência de contaminação cruzada e a direção mais provável é que ela tenha origem no piso. Assim, medidas de controle de contaminação por *L. monocytogenes* em pisos, ralos e estrados são necessárias para reduzir contaminações cruzadas nesses laticínios.

Não foram encontrados pulsotipos comuns entre os isolados do queijo Prato do laticínio C (P27) em outros pontos deste estabelecimento (Tabela 13) na mesma coleta, mas somente em luvas de manipulador na 2ª coleta. A suspeita inicial era que os pulsotipos encontrados no queijo fossem os mesmos da salmoura e essa fosse a fonte de contaminação óbvia dos queijos, porém, os pulsotipos do queijo (P27) eram distintos dos encontrados na salmoura na 4ª coleta (P33) (77,2% de similaridade, com diferença visual de mais de 7 bandas) e também distantes (61,7% de similaridade) dos encontrados na salmoura da 3ª coleta (P39). Entretanto, o fato dos pulsotipos encontrados na salmoura não terem sido isolados na unidade analítica do queijo, não descarta a possibilidade de estarem presentes no lote dos queijos.

Em algumas ocasiões, dois ou mais perfis altamente similares ($\geq 95\%$ e $< 100\%$) foram isolados em uma única amostra. Na Figura 9 constam exemplos: P8 e P10; P21 e P22; P24 e P25; P26 e P27; P28 e P29. Isso pode significar contaminação de um único ponto por uma população mista da bactéria ou ocorrência de eventos genéticos dentro de uma única população. Uma interpretação similar foi apresentada por Tham et al. (2007) que, analisando o sangue de duas pessoas com listeriose, encontraram, em amostras únicas de sangue, dois perfis distintos de PFGE, e consideraram a possibilidade de instabilidade genética de uma única linhagem de *L. monocytogenes* ou ocorrência de infecção com uma população mista do microrganismo.

Também é possível observar perfis com alta similaridade entre isolados de diferentes coletas. Por exemplo, do sorotipo 1/2a, um isolado do piso da câmara fria da 3ª coleta (P6) e um isolado de caixas plásticas da 4ª coleta (P7) no laticínio C, com 97,4% de similaridade. Outro exemplo são os pulsotipos P1 e P2, do sorotipo 1/2b com 97,4% de similaridade, obtidos em coletas diferentes no laticínio B. Essa alta similaridade observada entre esses isolados pode ser atribuída a possíveis eventos genéticos discretos.

Quanto à diversidade da espécie *L. monocytogenes*, diferentes resultados são encontradas na literatura, dependendo da fonte e origem geográfica. De acordo com Boerling et al. (1996) existe um grau considerável de diversidade de perfis de PFGE em populações de *L. monocytogenes*, o que também foi observado nessa pesquisa. Filiouis et al. (2009) compararam perfis de PFGE de *L. monocytogenes* isoladas de diferentes tipos de alimentos na Grécia e consideraram baixa a diversidade entre isolados de diferentes fontes, com base no número de pulsotipos. López et al. (2008), também consideraram relativamente baixa a diversidade genética entre isolados de *L. monocytogenes* provenientes de abatedouro de aves na Espanha, com base no número de pulsotipos. Em contraste, Leite et al. (2006) verificaram grande diversidade genética, com baixa similaridade entre alguns perfis, comparando uma população de isolados causadores de listeriose

humana em Portugal e isolados de queijos e ambientes relacionados. Em geral, os isolados de queijo formavam um grupo homogêneo.

Se, por um lado, os trabalhos de Boerling et al. (1996) e de Leite et al. (2006) revelam graus consideráveis de diversidade em populações de *L. monocytogenes*, por outro, AUTIO et al. (2002) sugerem uma ampla distribuição geográfica e temporal de algumas linhagens de *L. monocytogenes*, uma vez que isolaram os mesmos pulsotipos da bactéria em produtos diversos de diferentes países.

Com base na observação de que pulsotipos indistinguíveis de *L. monocytogenes* podem ser encontrados em diversos produtos de diferentes países, Autio et al. (2002) explicam que, no caso de doenças, a recuperação de pulsotipos indistinguíveis pode direcionar a investigação para o veículo da infecção, entretanto, também pode induzir a erro, uma vez que a recuperação de um padrão indistinguível de um alimento e de um paciente não prova que o alimento seja o veículo da infecção. Isso mostra que, além de dados moleculares, a investigação epidemiológica é importante, por exemplo, sobre o consumo de um determinado alimento.

Nesse contexto, alguns isolados não relacionados epidemiologicamente podem ter genótipos similares ou indistinguíveis, ao acaso, particularmente se a variabilidade genética da espécie ou subtipo for limitada. Assim, na prática, Tenover et al. (1995) explicam que a tipagem por PFGE é mais efetiva em investigações de surto quando é aplicada a pequenos conjuntos de isolados epidemiologicamente relacionados e que a tipagem de isolados sem informação epidemiológica pode resultar em informações enganosas e, ainda, que dados de tipagem não substituem dados epidemiológicos.

Quanto aos 4 isolados de *L. seeligeri* analisados, estes foram classificados em 3 pulsotipos (P41, P42 e P43) (Figura 9). Verifica-se o mesmo pulsotipo de *L. seeligeri* (P41) isolado na 3ª e 4ª coletas do laticínio A, sugerindo persistência dessa linhagem no piso da câmara fria desse laticínio. Na 1ª coleta, um pulsotipo encontrado no ralo da mesma câmara fria (P42) apresentou alta similaridade com o P41, mostrando possível persistência dessa linhagem na câmara fria. Assim, os 2 pulsotipos (P41 e P42) provavelmente são a mesma linhagem que sofreu eventos genéticos discretos no intervalo entre as coletas, uma vez que P41 se diferenciou visualmente de P42 apenas por 1 banda com a enzima *Apal*. A ocorrência de um perfil de *L. seeligeri* (P43) bem menos similar (63,1% de similaridade) isolado de outra câmara fria deste laticínio na 2ª coleta, demonstra que mais de uma linhagem dessa espécie contaminam o laticínio. Com PFGE foi possível verificar a persistência de *L. seeligeri*, demonstrando a adaptação dessa espécie às condições impostas pelo ambiente do laticínio A e a necessidade de controle do gênero *Listeria* nessa indústria, principalmente nas áreas refrigeradas.

Para muitas espécies, estudos indicam que isolados indistinguíveis por PFGE são improváveis de apresentar diferenças consideráveis por outras técnicas de tipagem (OKWUMABUA et al., 2005). Entretanto, na Figura 9, é possível observar isolados dos sorotipos 4b e 1/2b constituindo um mesmo pulsotipo (P27). Margolles et al. (1998) também encontraram perfis indistinguíveis de PFGE entre isolados de *L. monocytogenes* de diferentes sorotipos. De acordo com Ragon et al. (2008), o sorotipo 4b evoluiu do 1/2b, o que poderia explicar a ocorrência de um mesmo pulsotipo agrupando esses 2 sorotipos. Além disso, os genes que codificam as estruturas que determinam as características fenotípicas que diferenciam os sorotipos podem: a) não estar presentes nas bandas incluídas na análise b) não apresentar diferenças que alterem o peso molecular das bandas entre esses isolados de sorotipos distintos. Além disso, as enzimas utilizadas podem não ter sido suficientemente discriminatórias para diferenciar essas linhagens. Neste caso específico, a sorotipagem foi mais discriminatória do que PFGE. Isso demonstra que a combinação de mais de um método aumentou o poder discriminatório na tipagem dessa população de *L. monocytogenes*.

A ocorrência de sorotipos diferentes, portanto, linhagens diferentes não diferenciadas por PFGE, mesmo com duas enzimas, demonstra a limitação dessa técnica e corrobora com a afirmativa de Autio et al. (2002) que alertam sobre a necessidade de avaliar de forma criteriosa as semelhanças entre os isolados em investigações epidemiológicas.

Certos sorotipos de *L. monocytogenes* apresentam uma diversidade genética muito maior do que outros (AARTS; HAKEMULDER; VAN HOEF, 1999; KATHARIOU, 2002), sendo o sorotipo 1/2a o que apresenta maior diversidade (KATHARIOU, 2002), enquanto baixa diversidade genética do sorotipo 4b tem sido observada (GRAVES et al., 1994). De acordo com Thévenot et al. (2006), o sorotipo 1/2c é frequentemente isolado de alimentos e indústrias de alimentos. Todas as linhagens do sorotipo 1/2c analisadas por Thévenot et al. (2006) foram indistinguíveis geneticamente por PFGE, sugerindo que essa linhagem possa ser recente e/ou estar sob forte pressão de seleção. No presente trabalho, observa-se na Figura 9 que as *L. monocytogenes* do sorotipo 1/2c, provenientes de uma única amostra do piso da sala de pasteurização do laticínio B apresentaram 100% de similaridade (P5), mas foram bastante distintas (61,7% de similaridade) dos isolados da salmoura do laticínio C sorotipo 1/2c (P39). A linhagem 1/2c proveniente da salmoura do laticínio C (P40) apresentou perfil mais semelhante (82,4% de similaridade) ao da linhagem de referência ATCC® 7644 (Figura 9), que pertence ao sorotipo 1/2c e foi isolada de líquido céfalo-raquidiano humano. Entretanto, pelo critério de Tenover et al. (1995), a *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644 e as isoladas da salmoura, seriam consideradas não relacionadas, por apresentarem diferença visual de 7 bandas no perfil *Apal* + *Ascl*.

Em síntese, para os isolados de um mesmo laticínio, que exibem alta similaridade, pode-se considerar as hipóteses 1) Os laticínios são antigos, com atividades de processamento de leite há 13 anos (planta B) e 17 anos (planta C), o que sugere que eventos genéticos venham ocorrendo ao longo do tempo em populações de *L. monocytogenes* que contaminam o laticínio, que atualmente exibem alta similaridade de perfis de PFGE, originárias de ancestrais comuns; 2) A presença de diversos perfis de PFGE, embora altamente relacionados, pode indicar diversas fontes de contaminação por subtipos de *L. monocytogenes*.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados, pode-se concluir que:

- Bactérias do gênero *Listeria* estiveram presentes nos 3 laticínios pesquisados, porém, no laticínio A, não foi isolada *L. monocytogenes*. O isolamento de *L. monocytogenes*, em diversos pontos dos laticínios B e C, em todas as coletas, demonstra que as instalações desses laticínios são fontes potenciais de contaminação de queijos e de outros produtos.

- A frequência de isolamento de *Listeria* spp. foi mais elevada nos laticínios B e C, que apresentavam condições de instalações e práticas de higienização mais deficientes, comparadas ao laticínio A.

- Nos 3 laticínios as superfícies sem contato com alimentos apresentaram as maiores frequências de isolamento de *Listeria* spp.. Nos laticínios B e C os isolamentos de *L. monocytogenes* também foram mais freqüentes nas superfícies sem contato com alimentos.

- Não foram isoladas listérias das amostras de leite cru coletadas nos 3 laticínios. Das amostras de queijo Minas frescal não foi isolada *L. monocytogenes*, porém foi isolada *L. innocua* dos queijos dos laticínios B e C. A população de *L. innocua* detectada nos queijos Minas do laticínio C foi de no máximo 9,2 NMP/g, enquanto no queijo do laticínio B não foi determinada a população.

- *L. monocytogenes* foi isolada de queijo Prato do laticínio C. A presença de *L. monocytogenes* no queijo Prato indica risco direto à saúde do consumidor, uma vez que esse produto é pronto para o consumo e ingerido geralmente sem ser submetido a tratamento térmico.

- O uso de leite pasteurizado na produção dos queijos Minas frescal e Prato não elimina a possibilidade de contaminação por *Listeria* spp no produto final.

- Os isolamentos de *L. monocytogenes* do presente trabalho, em amostras de salmoura de laticínio, são inéditos no Brasil. A salmoura é uma fonte de contaminação de *L. monocytogenes* e pode conter diversos subtipos do patógeno, além de *L. innocua*.

- Embora tenha ocorrido diversidade entre os sorotipos isolados nos laticínios B e C, o 4b foi o mais prevalente, o que representa grande preocupação do ponto de vista de saúde pública, devido à importância epidemiológica deste sorotipo.

- Os laticínios B e C apresentaram uma diversidade de perfis de PFGE, alguns com baixa similaridade, o que mostra que esses estabelecimentos são contaminados por diversas linhagens de *L. monocytogenes*.

- Pulsotipos de *L. monocytogenes* foram isolados repetidamente, em mais de uma coleta, nos laticínios B e C, sugerindo persistência de linhagens nesses laticínios.

- Um pulsotipo foi compartilhado pelos laticínios B e C, apesar de serem independentes e distantes.

- O laticínio A apresentou contaminação por mais de um pulsotipo de *L. seeligeri* e houve isolamento repetido de um pulsotipo dessa espécie, entre as coletas, demonstrando adaptação da bactéria e necessidade de controle do gênero *Listeria* nessa indústria.

- A ocorrência de um mesmo pulsotipo de *L. monocytogenes* de sorotipos diferentes (1/2b e 4b) mostra que a sorotipagem deve acompanhar análises mais refinadas como as de natureza genotípica. A combinação de mais de um método de análise possibilitou aumentar o poder discriminatório da tipagem dessa população de *L. monocytogenes*.

7 RECOMENDAÇÕES

- A diversidade e distribuição de sorotipos e genótipos encontrada pode ser explorada para elaborar estratégias de prevenção de contaminação por *L. monocytogenes*. Estudos adicionais merecem ser conduzidos com os isolados de *L. monocytogenes* obtidos nesta pesquisa, especialmente aqueles que apresentaram pulsotipos comuns aos dois laticínios, os que foram isolados repetidamente e os isolados da salmoura, sobre o perfil de resistência a sanitizantes de uso industrial e antimicrobianos, comportamento em alimentos e potencial de virulência das linhagens. Estudos futuros podem complementar os resultados desta pesquisa, como o monitoramento da bactéria no ambiente desses laticínios associado à implantação de práticas de higienização e treinamento de funcionários.

- Nos laticínios B e C, a disseminação de *L. monocytogenes* no seu interior mostra a necessidade de medidas de controle e monitoramento do ambiente quanto à presença da bactéria. Há necessidade de estratégias de controle da bactéria por meio de programas de conscientização e treinamento dos proprietários e funcionários e emprego de técnicas de higienização adequadas.

- Foram identificados locais e rotas de contaminação que merecem atenção especial no desenvolvimento e implementação de estratégias de controle de *L. monocytogenes* nos laticínios. Assim, 1) para ralos e pisos, nos processos de higienização poderia ser incluído o uso de calor (na forma de vapor); 2) câmaras frias são locais críticos e esforço deve ser dedicado para eliminação e controle de *Listeria* spp nesses ambientes; 3) mais cuidado deve ser tomado com a higienização e o manuseio das caixas plásticas, que servem de abrigo e veículo para a bactéria; 4) No processo de produção do queijo Minas frescal, a possibilidade de eliminação do uso de salmoura deve ser considerada, pois isso pode significar a eliminação de um ponto importante de contaminação por *L. monocytogenes*. Ressalte-se que os laticínios A e B não utilizavam salmoura na produção do Minas frescal. Para laticínios que utilizam salmoura, na salga de outros tipos de queijos, é necessário que sejam adotadas práticas de prevenção de contaminações e controle da qualidade da salmoura.

- Uma medida que pode contribuir para prevenir a entrada de *Listeria* spp do ambiente externo para o interior dos laticínios é a lavagem sistemática e sanitização das botas das pessoas que entram no estabelecimento. Uma opção é a utilização de pedilúvio, que pode ser seco, pulverizado com sanitizante à base de amônia quaternária.

8 REFERÊNCIAS

AARTS, H.J.M.; HAKEMULDER, L.E.; VAN HOEF, A.M.A. Genomic typing of *Listeria monocytogenes* strains by automated laser fluorescence analysis of amplified fragment length polymorphism fingerprint patterns. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.49, n.1-2, p. 95–102, 1999.

ABRAHÃO, W. M. et al. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese and ice cream produced in the State of Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.44, n.2, p.289-296, 2008.

ALESSANDRIA, V. et al. Molecular methods to assess *Listeria monocytogenes* route of contamination in a dairy processing plant. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, 2010. In Press.

ALLERBERGER, F. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v.35, p.183–189, 2002.

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

ANVISA. Resolução - RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em: 15 nov. 2007.

ANVISA. Resolução – RDC Nº 275, de 06 de novembro de 2002. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em : <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/275_02rdc.htm>. Acesso em: 15 abr. 2009.

ARAGON-ALEGRO, L.C. **Influência dos coliformes no comportamento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas frescal**. 2007. 93f. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ARCURI, E.F. et al. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n.3, p.440-446, 2006.

ARIMI, S.M. et al. Diversity of *Listeria* ribotypes recovered from dairy cattle, silage, and dairy processing environments **Journal of Food Protection**, Ames, v. 60,n.7, p.811-816, 1997.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO (ABIC) 2010. Disponível em: <<http://www.abiq.com.br>>. Acesso em: 30 out. 2010.

AURELI, P. et al. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v.342, n.17, p.1236-1241, 2000.

AUTIO, T. et al. Similar *Listeria monocytogenes* pulsotypes detected in several foods originating from different sources. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.77, n.1-2, p.83-90, 2002.

AUTIO, T. et al. Characterization of persistent and sporadic *Listeria monocytogenes* strains by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and amplified fragment length polymorphism (AFLP). **Systematic and Applied Microbiology**. Stuttgart, v.26, n.4, p.539-545, 2003.

BARRET, T.J.; GERNER-SMIDT, P.; SWAMINATHAN, B. Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.3, n.1, p.20-31, 2006.

BEMRAH, N. et al. Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.37, n.1-4, p.129-145, 1998.

BERZINS, A. Factors associated with *Listeria monocytogenes* contamination of cold-smoked pork products produced in Latvia and Lithuania. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.115, n.2, p.173-179, 2007.

BILLE, J. et al. Outbreak of human listeriosis associated with tome cheese in northwest Switzerland, 2005. **Eurosurveillance**, v.11, n.6, p.91-93, Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=633>>. Acesso em: 05 dez. 2009.

BLODGETT, R. Most probable number from serial dilutions. In: US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), **Bacteriological Analytical Manual Online**, 8th Edition, Modified from Revision A CD ROM version 1998 on 6/21/2000. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm109656.htm>> Acesso em: 30 ago. 2010.

BOERLING, P. Subtyping *Listeria monocytogenes* isolates genetically related to the swiss epidemic clone. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.34, n.9, p. 2148–2153, 1996.

BORGES, MF. **Diagnóstico da contaminação por bactérias patogênicas em indústria de processamento de queijo de coalho e detecção de genes associados a fatores de virulência**. Campinas, 2006. 199f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

BORUCKI, M.K. et al. Dairy farm reservoir of *Listeria monocytogenes* sporadic and epidemic strains. **Journal of Food Protection**, Ames, v. *Listeria monocytogenes* 67, n.11, p.2496-2499, 2004.

BORUCKI, M.K. et al. Genetic diversity of strains from a high-prevalence dairy farm. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.71, n.10, p.5893-5899, 2005.

BRANCO, M.A.A.C. et al. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido artificialmente. **Boletim do Ceppa**, Curitiba, v.21, n.2, p.393-408, 2003.

BRANT, L.M.F.; FONSECA, L.M.; SILVA, M.C.C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, n.6, p.1570-1574, 2007.

BRASIL. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 mar. 96. Seção I. 50p.

BRASIL. Portaria nº 352 de 4 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Minas frescal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF. 8 set. 1997. Seção 1, p. 19684. (BRASIL, 1997a).

BRASIL. Portaria nº 358 de 04 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo prato. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF. 8 set. 1997. Seção 1, p. 19690. (BRASIL, 1997b).

BRASIL. Portaria nº 9 de 08 de abril de 2009. Apresenta Procedimentos de Controle da *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 abr. 2009. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=15201>>. Acesso em: 03 maio 2010.

BRITO, J.R. et al. Retail survey of brazilian milk and minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.74, n.15, p.4954-4961, 2008.

BROSCH, R.; CHEN, J.; LUCHANSKY, J.B. Pulsed-field fingerprinting of *Listeriae*: identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.60, n.7, p.2584-2592, 1994.

BRUHN, J.B.; VOGEL, B.F.; GRAM, L. Bias in the *Listeria monocytogenes* enrichment procedure: lineage 2 strains outcompete lineage 1 strains in University of Vermont Selective Enrichments. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.71, n.2, p.961-967, 2005.

BUCHRIESER, C. Biodiversity of the species *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*. **Microbes and Infection**, Paris, v.9, n.10, p.1147-1155, 2007.

BÜLA, C. J., J. BILLE, AND M. P. GLAUSER. 1995. An epidemic of foodborne listeriosis in Western Switzerland: Description of 57 cases involving adults. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.20, n.1, p.66–72, 1995.

CAMARGO, T.M. **Prevalência de *Listeria monocytogenes*, coliformes totais e *Escherichia coli* em leite cru refrigerado e ambiente de ordenha de propriedades leiteiras do Estado de São Paulo**. Piracicaba, 2010. 104f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

CARRIQUE-MAS J. J. et al. Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese: an outbreak of listeriosis? **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.130, n.1, p.79–86, 2003.

CARVALHO, J.D.G.; VIOTTO, W.H.; KUAYE, A.Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**. London, v.18, n.2, p.262-267, 2007.

CASAROTTI, V.T.; GALLO, C.R.; CAMARGO, R. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo minas frescal comercializados em Piracicaba-SP. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.44, n.3, p.158-163, 1994.

CATÃO, R.M.R.; CEBALLOS, B.S.O. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.3, p.281-287, 2001.

CDC – Center for Disease Control and Prevention. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food --- 10 States, 2007. 2007. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5714a2.htm>>. Acesso em: 03 nov. 2010.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Listeria monocytogenes* Infections Associated with Pasteurized Milk from a Local Dairy - Massachusetts, 2007. 2008. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5740a1.htm>>. Acesso em: 10 mar. 2009.

CHAMBEL, L. et al. Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.116, n.1, p.52-63, 2007.

CHARLTON, B. R., KINDE, H.; JENSEN. L.H. Environmental survey for *Listeria* species in California milk processing plants. **Journal of Food Protection**, v.53, n.3, p.198–201, 1990.

CHASSEIGNAUX, E. et al. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from the environment, raw meat and raw products in two poultry- and pork-processing plants. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.91,n.5, p.888- 899, 2001.

CHEN, Y. et al. *Listeria monocytogenes*: low levels equal low risk. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 66, n.4, p.570-577, 2003.

CHIARINI, E. ***Listeria monocytogenes* em matadouros de aves: marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação**. 2007. 145f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Disponível em: <<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2005R2073:20060101:EN:PDF>>. Acesso em: 07 maio 2010.

CONTER, M. et al. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.128, n.3, p. 497–500, 2009.

CORNU, M.; KALMOKOFF, M.; FLANDROIS, J.P. Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.73, n.2-3, p.261-274, 2002.

COTONI, L. A propos des bacteries denommes Listerella-rappel d'une observation ancienne de meningite chez l'homme. **Annales de L'Institut Pasteur**, Paris, v. 68, n.4, p.92-95, 1942.

COTTON, L.N.; WHITE, C.H. *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella* in dairy plant environment. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.75, n.1, 1992.

CUMMINS, A.J.; FIELDINGT, A.K.; McLAUCHLIN, J. *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. **Journal of Infection**, London, v.28, n.1, p.89-91, v.1994.

CVE (Centro de Vigilância Epidemiológica) Informações sobre doenças transmitidas por água e alimentos. *Listeria monocytogenes*/listeriose. 2003. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Listeria.htm>>. Acesso em 08 maio 2008.

DALTON C.B. et al. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v.336, n.2, p.105-, 1997.

D'AMICO, D.J.; DONNELLY, C.W. Detection, Isolation, and Incidence of *Listeria* spp. in small-scale artisan cheese processing facilities: a methods comparison. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 72, n.12, p. 2499–2507, 2009.

DAUPHIN, G.; RAGIMBEAU, C.; MALLE, P. Use of PFGE typing for tracing contamination with *Listeria monocytogenes* in three cold-smoked salmon processing plants. **International Journal of Food Microbiology**, Amesterdam, v. 64, n.1-2, p. 51-61, 2001.

DE NES, F. et al. Antimicrobial resistance and investigation of the molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* in dairy products. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.43, n.4, p.382-385, 2010.

DE SÁ, F.R.N. *Listeria monocytogenes* pneumonia in a cirrhotic child. **International Journal of Clinical Practice**. Surrey, v.58, n.5, p.536-538, 2004.

DESTRO, M.T. ***Listeria monocytogenes* na cadeia produtiva de alimentos: da produção primária ao consumidor final**. São Paulo, 2006. 74f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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

DESTRO, M.T.; LEITÃO, M.F.F.; FARBER, J.M. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 62, n.2, p.705-711, 1996.

DIAS, D.A.M. **Persistência de cepas de *Listeria monocytogenes* em linha de abate industrial de frango localizado no Estado de São Paulo**. São Paulo, 2008. 66f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, L. et al. Isolation of microorganisms of the species *Listeria* from raw milk intended for human consumption. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.31, n.10, p.938-941, 1985.

DOUMITH, M. et al., Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.42, n.8, p.3819-3822, 2004.

DUARTE, D.A.M. et al. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.3, p.297-302, 2005.

DURMAZ, H.; AYGUN, O.; ARDIC, M. The effect of cheese brine concentrations on survival of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v.7, n.3-4, 2009.

EL-SHENAWY, M. Sources of *Listeria* spp. in domestic food processing environment. **International Journal of Environmental Health Research**, London, v.8, n.3, p.241–251, 1998.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA) 2000. Produção, Industrialização e Comercialização (Indústria). Estatísticas. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/industria/tabela0404.php>. Acesso em 05 nov. 2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). 2007. Produção, Industrialização e Comercialização (Indústria). Estatísticas. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/industria/tabela0404.php>. Acesso em 05 nov. 2010.

ESPER, L.M.R. **Diagnóstico da qualidade de ricotas comercializadas no município de Campinas – SP**. Campinas, 2006. 97f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

ESPER, M.R.N.R. et al. Meningite por *Listeria monocytogenes* em São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.38, n.1, p.37-41, 1978.

EVANCHO, G.M. et al. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (ed). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Forth Edition, Washington: American Public Health Association; 2002. Chap. 3, p.25-34.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization) Risk assessments of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: technical report. Geneva: FAO/WHO; 2004. 269p.

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

FDA (Food and Drug Administration). Bad bug book: foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. *Listeria monocytogenes*. 2007. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap6.html>> Acesso em: 30 nov. 2009.

FDA/FSIS (Food and Drug Administration/ Food Safety and Inspection Service / U.S. Department of Agriculture). Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. 2003. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/lmr2-toc.html>>. Acesso em: 10 nov. 2007.

FDA/USDA (Food and Drug Administration/ U.S. Department of Agriculture). Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. 2003. Disponível em:<<http://www.foodsafety.gov/~dms/LMr2-toc.html>>. Acesso em: 10 nov. 2007.

FENLON, D.R.; WILSON, J.; DONACHIE, W. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. **The Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.81, n.6, p.641-650, 1996.

FERRONATTO, A.I. **Contaminação de carcaças e do ambiente por *Listeria* sp. Em diferentes etapas do abate de suínos**. Porto Alegre, 2010. 65f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

FIGUEIREDO, E.A.T. **Ocorrência do gênero *Listeria* e avaliação da diversidade genética de *Listeria monocytogenes* através do random amplified polymorphic DNA (RAPD) e sua distribuição em linha de processamento de leite pasteurizado tipo “C”**. São Paulo, 2000. 100f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

FILIOUSIS, G. et al. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from open-air food markets in Greece. **Food Control**, London, v.20, n.3, p.314-317, 2009.

FLEMMING, D.W. et al. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v.312, n.7, p.404-407, 1985.

FRETZ, R. et al. Listeriosis outbreak caused by acid curd cheese 'Quargel' Austria and Germany 2009. **Eurosurveillance**, v.15, n.5, p.1-2, 2010. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19477>>. Acesso em 25 out. 2010.

FRYE, C.; DONNELLY, C.W. Comprehensive survey of pasteurized fluid milk produced in the United States reveals a low prevalence of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Ames, v.68, n.5, p.973-979, 2005.

FSAI (Food Safety Authority of Ireland). The control and management of *Listeria monocytogenes* contamination of food. Dublin: FSAI, 2005. 94p. (Technical Report) Disponível em: <http://www.fsai.ie/publications/reports/listeria_report.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2009.

FUGETT, E.B. et al. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of temporally matched *Listeria monocytogenes* isolates from human clinical cases, foods, ruminant farms, and urban and natural environments reveals source-associated as well as widely distributed PFGE types. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.45, n.3, p.865-873, 2007.

FURLANETTO, S.M.P.; SANTOS, M.A.A.; HARA, C. *Listeria* spp: Avaliação da eficiência de quatro meios de plaqueamento no seu isolamento. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.10, n.46, p.30-34, 1996.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M.L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.113, n.1, p.1-15, 2007.

GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P.M.; Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.29, n.5, p.851-875, 2005.

GAULIN, C. First documented outbreak of *Listeria monocytogenes* in Quebec, 2002. **Canada Communicable Disease Report**. 2003; v.29, n.21. Disponível em: <<http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/ccdr-rmtc/03vol29/dr2921ea.html>>. Acesso em: 20 ago. 2007.

GILOT, P.; CONTENT, J. Specific Identification of *Listeria welshimeri* and *Listeria monocytogenes* by PCR Assays Targeting a Gene Encoding a Fibronectin-Binding Protein. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 40, n.2, p.698-703, 2002.

GLASER, P. et al. Comparative genomics of *Listeria* species, **Science**, Washington, v.294, n.26, p. 849-852. 2001.

GOLNAZARIAN, C. et al. Comparison of infectious dose of *Listeria monocytogenes* F5817 as determined for normal versus compromised C67B1/6J mice. **Journal of Food Protection**, Ames, v.52, n.10, p.696-701, 1989.

GOULET, V. et al. Listeriosis from consumption of raw-milk cheese. **The Lancet**, London v.345, n.8964, p.1581-1582, 1995.

GOULET, V. et al. Increasing Incidence of Listeriosis in France and Other European Countries. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.14, n. 5, p.734-740, 2008.

GRAM, L. et al. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. **Food Control**. London, v.18, n.10, p.1165-1171, 2007.

GRAVES, L.M. et al. Comparison of ribotyping and multilocus enzyme electrophoresis for subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n.12, p. 2936-2943, 1994.

GRAVES, L.M. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. International **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 60 n.6, p.1280-1288, 2010.

GRAVES, L.M.; SWAMINATHAN, B. Pulsenet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.65, n.1-2, p.55-62, 2001.

GRAVES, L.M. ; SWAMINATHAN, B.; HUNTER, S.B. Subtyping *Listeria monocytogenes*. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis and food safety**. Third Edition, Boca Raton: CRC Press, 2007. Chap. 9, p. 283-304.

GRAVES, L. M. et al. Microbiological aspects of the investigation that traced the 1998 outbreak of listeriosis in the United States to contaminated hot dogs and establishment of molecular subtyping based surveillance for *Listeria monocytogenes* in the PulseNet network. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v.43, n.5, 2350–2355, 2005.

GRAVESEN, A. et al. Genotyping of *Listeria monocytogenes*: comparison of RAPD, ITS, and PFGE. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.57, n.1-2, p.43-51, 2000.

GRAY, M.J. et al. *Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.70, n.10, 2004.

HAİN, T. et al. Whole genome sequence of *Listeria welshimeri* reveals common steps in genome reduction with *Listeria innocua* as compared to *Listeria monocytogenes*, **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.188, n.21, p.7405-7415, 2006.

HAMDI, T. M. et al. Identification and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated in raw milk in the region of Algiers (Algeria). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.116, n.1, p.190-193, 2007.

HARVEY, J., GILMOUR, A. Occurrence of *Listeria* species in raw milk and dairy products produced in Northern Ireland. **Journal of Applied Microbiology**. v.72, n.2, p.119–125, 1992.

HARVEY, J., GILMOUR, A. Characterization of recurrent and sporadic *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk and nondairy foods by pulsed-field gel

electrophoresis, monocin typing, plasmid profiling, and cadmium and antibiotic resistance determination. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.67, n.2, p.840-847, 2001.

HEISICK, J.E.; ROSAS-MARTY, L.; TATINI, S.R. Enumeration of viable *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* in foods. **Journal of Food Protection**, Ames, v.58, n.7, p.733-736, 1995.

HHS/USDA (U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Department of Agriculture). Quantitative assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. 2003. Disponível em: <<http://www.foodsafety.gov/dms/lmr2-toc.html>>. Acesso em: 20 fev. 2005.

HITCHINS, A.D. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. In: US Food and Drug Administration (FDA), Bacteriological Analytical Manual Online. Chapter 10, revised January 2003. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>. Acesso em: 06 jul. 2007.

HITCHINS, A.D.; WHITING, R.C. Food-borne *Listeria monocytogenes* risk assessment. **Food Additives and Contaminants**, London, v.18, n.12, p.1108-1117, 2001.

HO, A.J.; LAPPI, V.R.; WIEDMANN, M. Longitudinal monitoring of *Listeria monocytogenes* contamination patterns in a farmstead dairy processing facility. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.90, n.5, p.2517-2524, 2007.

HOF, H. History and epidemiology of listeriosis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v.35, n.3, p.199-202, 2003a.

HOF, H. Therapeutic options. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v.35, n.3, p.203-205, 2003b.

HOF, H.; SZABO, K.; BECKER, B. Epidemiology of listeriosis in Germany: a changing but ignored pattern. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, v.132, n.24, p.1343-1348, 2007. Disponível em: <<http://lib.bioinfo.pl/auth:Hof,H>> Acesso em: 20 jul. 2007.

HOFER, C.B.; MELLE, C.E.A.; HOFER, E. *Listeria monocytogenes* in renal transplant recipients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.41, n.6, p.375-377, 1999.

HOFER E, MENEZES D.M.F. de. Isolamento de *Listeria monocytogenes* em secreção vaginal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 1., 1969, Rio de Janeiro. Resumos. Rio de Janeiro: SBM, 1969. p.158.

HOFER, E.; NASCIMENTO, R.S.; OLIVEIRA, M.A. Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.31, n.2, p.173-177, 1998.

HOFER, E.; PESSÔA, G.V.A.; MELLES, C.E.A. Listeriose humana. Prevalência de sorotipos de *Listeria monocytogenes* isolados no Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.44, n.2, p.125-131, 1984.

HOFER, E.; REIS, C.M.F.; HOFER, C.B. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas isoladas de material clínico humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.39, n.1, p.32-37, 2006.

HOFER, E.; RIBEIRO, R.; FEITOSA, D.P. Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.95, n.5, p.615-620, 2000.

HOFFMAN, A. et al. *Listeria monocytogenes* contamination patterns for the smoked fish process environment and for raw fish. **Journal of Food Protection**. v.66, n.1, p.52-60, 2003.

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

ILSI. Research foundation/risk science institute, expert panel on *Listeria monocytogenes* in foods. Achieving continous improvement in reduction in foodborne listeriosis – a risk based approach. **Journal of Food Protection**, Ames, v.68, n.9, p.1932-1994, 2005.

IVANEK, R.; GRÖHN, Y.T.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* in multiple habitats and host populations: review of available data for mathematical modeling. **Foodborne Pathogens and Disease**, New York, v.3, n.4, p.319-336, 2006.

JACQUET, C. et al. Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.61, n.6, p.2242-2246, 1995.

JACQUET, C., J. ROCOURT, REYNAUD, A. Study of *Listeria monocytogenes* contamination in a dairy plant and characterization of the strains isolated. **International Journal of Food Microbiology**, Baltimore, v.20, n.1, p.13–22. 37, 1993.

JAY J.M. **Modern food microbiology**. 6nd ed. Gaithersburg: Aspen Publishers; 2000. 679p.

JEMMI, T.; STEPHAN, R. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, v.25, n.2, p.571-580, 2006. Disponível em: <http://www.oie.int/boutique/extrait/09jemmi571580.pdf>. Acesso em: 04 abr. 2007.

JEFFERS, G.T. et al. Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. **Microbiology**, New York, v.147, n.5, p.1095-1104, 2001.

KABUKI, D.Y. et al. Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in latin-style fresh-cheese processing plants. **Journal of Dairy Science**. Lancaster. v.87, n.9, p.2803-2812, 2004.

KALOREY, D.R.; WARKE, S.R.; KURKURE, N.V.; RAWOOL, D.B.; BARBUDDJE, S.B. *Listeria* species in bovine raw milk: a large survey of central India. **Food Control**, London, v.19, n.2, p.109-112, 2008.

KATHARIOU, S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. **Journal of Food Protection**, Ames, v.65, n.11, p.1811-1829, 2002.

KELLS, J.; GILMOUR, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in two Milk processing environments, and assessment of *Listeria monocytogenes* blood agar for isolation, **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.91, n.2, p.167– 174, 2004.

KORNACKI, J.L.; GURTNER, J.B. Incidence and Control of *Listeria* in food processing facilities. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis and food safety**. Third Edition, Boca Raton: CRC Press, 2007. Chap. 17, p. 681-766.

KOZAK, J et al. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods: incidence in dairy products. **Food Control**, Guildford, v.7, n.4/5, p.215-221, 1996.

LAKE, R. et al. Risk Profile: *Listeria monocytogenes* in processed ready-to-eat salads/Institute of Environmental Science & Research Limited. New Zealand. 2005. 68p. (Technical Report) Disponível em: <http://www.nzfsa.govt.nz/science/risk-profiles/FW0446_L_mono_in_RTE_salads_2005.pdf> Acesso em: 01 abr. 2008.

LANDGRAF, I.M. et al. Surto de meningite neonatal por *Listeria monocytogenes*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 58, n.1, p.63-67, 1999.

LARSON, A.E.; JOHNSON, E.A.; NELSON, J.H. Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial cheese brines. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.9, p.1860-1868, 1999.

LEITE, P. et al. Comparative characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from Portuguese farmhouse ewe's cheese and from humans. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.106, n.2, p.111-121, 2006.

LEMES-MARQUES, E. G.; CRUZ, C. D.; DESTRO, M. T. Pheno and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates from the southwestern region of the State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo. v.38, n.2, p.287-292, 2007.

LIANOU, A., SOFOS, J.N. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. **Journal of Food Protection**, Ames, v.70, n.9, p. 2172 – 2198, 2007.

LINNAN, M.J. et al. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v.319, n.13, p.823-828, 1988.

LOMONACO, S. et al. *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola: subtypes, diversity and persistence over time. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.128, n.3, p. 516-520, 2009.

LÓPEZ, V. Traceback Identification of an ingredient (Pork Dewlap) as the possible source of *Listeria monocytogenes* serotype 4b contamination in raw chicken products. **Journal of Food Protection**, Ames, v.70, n.6, p.1513-1517, 2007.

LÓPEZ, V. et al. Different contamination patterns of lineage I and II strains of *Listeria monocytogenes* in a spanish broiler abattoir. **Poultry Science**, Albany, v.87, n.9, p.1874-1882, 2008.

LOW, J. C. & DONACHIE, W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. **The Veterinary Journal**, London, v.153, n.1, p.9–29, 1997.

LUKINMAA, S. et al. *Listeria monocytogenes* isolates from invasive infections: variation of sero- and genotypes during an 11-year period in Finland. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.4, 1694–1700, 2003.

LUKINMAA, S. et al. A. Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates of human and food origin studied by serotyping, automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.10, n.6, p.562-568, 2004.

LUNDÉN, J.; TOLVANEN, R.; KORKEALA, H. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in europe. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.87, (E. Suppl.):E6–E11, 2004.

LYYTIKÄINEN, O. et al. An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finlandia. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.181, n.5, p.1838-1841, 2000.

MacDONALD, P.D.M. et al. Outbreak of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese. **Clinical Infectious Disease**, Chicago, v.40, n.5, p.677-682, 2005.

MAHAMOODI, M.M. Occurrence of *Listeria monocytogenes* and dairy products in Noorabad, Iran. **Journal of Animal and Veterinary Advances**. Faisalabad, v.9, n.1, p.16-19, 2010.

MAIJALA R. et al. Exposure of *Listeria monocytogenes* within an epidemic caused by butter in Finland. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.70, n.1-2, p.:97–109, 2001.

MAKINO, S.I. et al. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v.104, n.2, p.189-196, 2005.

MARGOLLES, A.; MAYO, B.; DE LOS REYES-GAVILÁN, C.G. Polymorphism of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains isolated from short-ripened cheeses. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.84, n.n.2, p.255-262, 1998.

MARTH, E.H. Disease characteristics of *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, Chicago, v42, n.4, p.165-169, 1988.

MARTIN, P. Pulsed-field gel electrophoresis of *Listeria monocytogenes* strains: the PulseNet Europe feasibility study. **Foodborne Pathogens and Disease**, New York, v.3, n.3, p. 303-308, 2006.

MARTINS, I.M.; KABUKI, D.Y.; KUAYE, A.Y. Determination and characterization of pathogens found in dairy products. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.68, n.3, p.359-365, 2009.

MASSA, S. et al. The incidence of *Listeria* spp. in soft cheeses, butter and raw milk in the province of Bologna. **The Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 68, n.2, p. 153-156, 1990.

McLAUCHLIN J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. **Food Control**. London, v.7, n.4/5, p.187-193, 1996.

MEAD, P.S. et al. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.5, n.5, p.607-625, 1999.

MENENDEZ, S. et al. Removal of *Listeria* spp in a cheese factory. **Jornal of Food Safety**, Westport, v.17, n.2, p.133-139, 1997.

MEYER-BROSETA, S. et al. Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.80, n.1, p.1-15, 2003.

MIETTINEN, M.K.; BJÖRKROTH, K.J.; KORKEALA, H.J. Characterization of *L. monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.46, n.3, p.187-192, 1999.

MOURA, S.M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D.G.M. Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brasil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.9, n.3, p.229-237, 1993.

MULLAN, W.M.A. (2009). Modelling the probability of *Listeria monocytogenes* growing in cheese. (On Line). Dairy Science and Food Technology. Disponível em: <http://www.dairyscience.info/food-model/178-listeria-model.html>. Acesso em: 25 out. 2010.

MURAOKA, W.; GAY, C.; KNOWLES, D.; BORUCKI, M. Prevalence of *Listeria monocytogenes* subtypes in bulk milk of the pacific northwest. **Journal of Food Protection**, Ames, v.66, n.8, p.1413-1419, 2003.

MURRAY, E.G.D.; WEBB, R.A.; SWANN, M.R.B. A disease of rabbits characterized by large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus, *Bacterium monocytogenes* (n.sp). **Journal of Pathology and Bacteriology**, v.29, n.4. p.407-439, 1926.

NALDINI, M.C.M.; VIOTTO, W.H.; KUAYE, A.Y. Behaviour of *Listeria monocytogenes* inoculated into Minas Frescal cheese made by direct acidification or lactic culture during refrigerated storage. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v.62, n.3, 2009.

NASSONOVA, E.S. Pulsed field gel electrophoresis: theory, instruments and application. **Cell and Tissue Biology**, Moscow, v.2, n.6, p. 557-565, 2008.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). 2010. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>> Acesso em: 09 abr. 2010.

NELSON, K.E. et al. Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species, **Nucleic Acids Research**, London, v.32, n.8., p.2386-2395, 2004.

NERO, L.A. ***Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção.** São Paulo, 2005. 141f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

NEVES, E. Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE) analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from different sources and geographical origins and representative of the twelve serovars. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.31, n.5, p.387-392, 2008.

NORTON, D.M. et al. Application of the bax for screening/genus *Listeria* polymerase chain reaction system for monitoring *Listeria* species in cold-smoked fish and in the smoked fish processing environmental. **Journal of Food Protection**, Ames, v.63, n.3, p.343-346, 2000.

NORWOOD, D. E.; GILMOUR, A. Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.86, n.4, p.576–582, 1999.

OKWUMABUA, O. et al. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from food animal clinical cases: PFGE pattern similarity to strains from human listeriosis cases. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.249, n.2, 2005.

OOI, S. T., LORBER, B. Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. **Clinical Infectious Diseases**. Chicago, v.40, n.9, p.1327-1332, 2005.

PAGOTTO, F. et al., 2001. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. In: HEALTH CANADA. Government of Canada. Health Products and Food Branch. Ottawa. HPB Method (January 2001). HPB Method. **MFHPB-30**, 15p. Disponível em: <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume2/mfhp30-01-eng.php>. Acesso em 02 nov. 2010.

PAK, S.I. et al. Risk factors for *L. monocytogenes* contamination of dairy products in Switzerland, 1990–1999. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 53, n.2, p.55–65, 2002.

PAN, Y., BREIDT JR, F., KATHARIOU, S. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.72, n.12, p. 7711–7717, 2006.

PARIDA, S.K. et al. Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.28, n.1, p.81-93, 1998.

PERESI, J. T. M. et al. Queijo Minas frescal artesanal e industrial. Qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 83, p.63-70, abr., 2001.

PERRIN, M.; BEMER, M.; DELAMARE, C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.11, p.5508-5309, 2003.

PIATTI, R.M. et al. Presença de *Listeria monocytogenes* em amostras de caprinos com sintomatologia nervosa. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.71(supl), p.570-572, 2004.

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

PORTO, E.; EIROA, M.N.U. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* in vegetables. **Dairy Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.21, n.4, p.12-16, 2001.

PULSENET INTERNATIONAL- The international molecular subtyping network for foodborne disease surveillance. Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of *Listeria monocytogenes* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), 2009. Disponível em: <<http://www.pulsenetinternational.org/protocols/protocols.asp>>. Acesso em 19 out. 2009.

RADOSTITS, O.M.; BLOOD, D.C.; GAY, C.C. Veterinary medicine. London: Baillière Tindall;1994. 1763p.

RAGON, M. et al., A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. **PLoS Pathogens**, v.4, n.9, p. 1-14, 2008. Disponível em: <<http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1000146;jsesionid=B7A95393E04FD9FC4CE8E3F8D800BBCF>>. Acesso em: 20 mai. 2010.

RAMAGE, C.P. et al.Characterisation of *Listeria ivanovii* isolates from the UK using pulsed-field gel electrophoresis **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.170, n.2, p.349-353, 1999.

RAMOS, S.N.M.; COSTA, C.A da, Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijo artesanal tipo coalho comercializado na cidade de Manaus-AM, Brasil. **Acta Amazônica**, Manaus, v.33, n.4, p.613-618, 2003.

ROCHA, J.A.K. **Estudo da presença de *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* em indústria processadora de queijo minas frescal**. Campinas: 2004. 77f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

ROCOURT, J.; BUCHRIESER, C. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis and food safety**. Third Edition, Boca Raton: CRC Press, 2007. Chap. 1, p. 1-20.

ROCOURT, J.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. (eds). Food Microbiology: Fundamentals and frontiers. Washington: ASM Press. 1997. p.337-352.

ROCOURT, J. et al. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat: the FAO/WHO approach. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. Amsterdam, v.35, n. 3, p.263-267, 2003.

ROSSI M.L. et al. *Listeria monocytogenes* outbreaks: a review of the routes that favor bacterial presence. **Revista Chilena de Infectologia**, Santiago, v.25, n.5, p.328-335, 2008.

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

RYSER, E.T.; DONNELLY, C.W. *Listeria*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination on foods**. 4th.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. Chap. 36, p.343-356.

RYSER, E.T.; MARTH, E.H. (Ed). **Listeria, listeriosis, and food safety**. New York: Marcel Dekker,inc. 1991. 632p.

SAKATE, R.I. et al. Quantificação de *Listeria monocytogenes* em salames fatiados embalados a vácuo. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v.53, n.2, p.184-187, 2003.

SANAA, M. et al. Risk factors associated with contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* in dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.76, n.10, p.2891-2898, 1993.

SAUDERS, B.D. et al., 2009. Prevalence and molecular diversity of *Listeria monocytogenes* in retail establishments. **Journal of Food Protection**, Ames, v.72, n.11, p.2337-2349, 2009.

SAUDERS, B.D.; WIEDMANN, M. Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis and food safety**. Third Edition, Boca Raton: CRC Press, 2007. Chap. 2, p. 21-53.

SCHLECH III, W.F. Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, Chicago, v.42, n.4, p.176-178, 1988.

SCHWAB, J.P., EDELWEISS, M.I.A. Identificação imuno-histoquímica de *Listeria monocytogenes* em placentas fixadas em formol e embebidas em parafina. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v.25, n.7, p.501-505, 2003.

SCHWARTZ, D. C., CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome sized DNA by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, Cambridge, v.37, p.67-75, 1984.

SEELIGER H.P.R.; HÖHNE K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species, In: Bergan T & Norris J.R. (ed.) *Methods in Microbiology*. v. 13. p.31-49. Academic Press, London, 1979.

SILVA, F.T. Queijo prato. Brasília, DF: Embrapa Informação tecnológica, 2005. 54p.

SILVA, I.M.M.; ALMEIDA, R.C.C.; ALVES, M.A.O. ALMEIDA, P.F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of minas frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.81, n.3, p.241-248, 2003.

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

SILVA, N. et al. Manual de métodos de análise microbiológica de água. São Paulo: Varela; 2005. 164p.

SILVA, N. et al. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 4ed. São Paulo: Varela; 2010. 624p.

SJÖMAN, M. The use of serotyping and PFGE-typing of *Listeria monocytogenes* in food processing contamination studies and human foodborne infections. (2010) Department of Food Hygiene and Environmental Health Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki, Finland. 74p. Academic Dissertation. Disponível em: <https://oa.doria.fi/bitstream/handle/10024/59360/theuseof.pdf?sequence=1>. Acesso em: 03 abr. 2010.

SNAPIR, Y.W.; VAISBEIN, E.; NASSAR, F. Low virulence but potentially fatal outcome – *Listeria ivanovii*. **European Journal of Internal Medicine**, v.17, n.4, p.286-287, 2006.

SOUZA, R.A. et al. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho artesanal, comercializado à temperatura ambiente em Fortaleza, CE. **Higiene. Alimentar**, São Paulo, v.20, p.66-69, 2006.

STEPHENS, J.C. et al. Effect of growth temperature on virulence of strains of *Listeria monocytogenes* in the mouse: evidence for a dose dependence. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.70, n.3, p.239-244, 1991.

STESSL, B. Performance testing of six chromogenic ALOA-type media for the detection of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.106, n.2, p.651-659, 2009.

SUASSUNA, I. et al. Listeriose do sistema nervoso no Estado da Guanabara. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 1., 1969, Rio de Janeiro. Resumos. Rio de Janeiro: SBM, 1969. p.161.

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

TENOVER, F.C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.33, n.9, p.2233-2239, 1995.

THAM, W. et al. More than one variant of *Listeria monocytogenes* isolated from each of two human cases of invasive listeriosis. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.135, n.6, p.854-856, 2007.

THÉVENOT, D.; et al. Serological and molecular ecology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from 13 French pork meat salting–curing plants and their products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.112, n.2, p.153–161, 2006.

TODESCHINI, G. et al. A case of *Listeria murray/grayi* bacteremia in a patient with advanced Hodgkin's disease. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Berlin, v.17, p.808-810, 1998.

TOMA, B. et al. Applied veterinary epidemiology and the control of disease in populations. Maisons-Alfort, France: AEEMA; 1999. 536p.

TOMPKIN, R.B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. **Journal of Food Protection**, Ames, v.65, n.4, p.709-725, 2002.

TOYOSHIMA, M.T.K. et al. *Listeria monocytogenes* peritonitis in cirrhotic patients: first description in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.48, n.5, p.291-293, 2006.

TRANT, T.; HITCHINS, A.D. Evaluation of a selective enrichment most probable number method for viable *Listeria* spp. in dairy products. **Journal of Food Protection**, Ames, v.59, n.9, p.928-931, 1996.

UHITIL, S. et al. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and the other *Listeria* spp. in cakes in Croatia. **Food Control**, London, v.15, n.3, p.213-216, 2004.

UNIVERSITY OF MINNESOTA. Center for Infectious Disease Research & Policy. Listeriosis. Disponível em: <<http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/center/about/index.html>> Acesso em: 25 mai. 2007.

VAN KESSEL, J.S. et al. Prevalence of *Salmonellae*, *Listeria monocytogenes* and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.87, n.9, p.2822-2830, 2004.

VAZQUEZ-BOLAND, J.A. et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.14, n.3, p.584-640, 2001.

VAZQUEZ-SALINAS, C., V.S.; OSCAR, R.S.; IRMA, Q.R.E. Occurrence of *Listeria* species in raw milk in farms on the outskirts of México city. **Food microbiology**, London, v.18, n.2, p.177-181, 2001.

VIEIRA, M.A.S.; MASSAGUER, P.R. Incidência de *Listeria* spp. em queijos minas frescal comercializados em Campinas/SP. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, v.23, n.4, p.62-65, 1999.

WAAK, E.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M. Prevalence and Fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.68, n.7, p.3366-3370, 2002.

WAGNER, M. et al. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from 50 small-scale Austrian cheese factories. **Journal of Food Protection**, Ames, v.9, n.6, p.1297-1303, 2006.

WALKER, R.L. et al. Environmental survey for *Listeria* species in frozen milk product plants in California. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.3, p.178-182, 1991.

WARRINER, K.; NAMVAR, A. What is the hysteria with *Listeria*? **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 20, n.6-7, p.245-254, 2009.

WIEDMANN, M. Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Gaithersburg, v.85, n.2, p.524-531, 2002.

YDE, M.; GENICOT, A. Use of PFGE to characterize clonal relationships among Belgian clinical isolates of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v.53, n. p.399-402, 2004.

YÜCEL, N.; CITAK, S.; ÖNDER, M. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. **Food Microbiology**, v.2-3, p.241-245, 2005.

ZAFFARI, C.B.; MELLO, J.F.; COSTA, M. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, p.862-867, 2007.

ZHANG, W. et al. The bax pcr assay for screening *Listeria monocytogenes* targets a partial putative gene lmo2234. **Journal of Food Protection**, Ames, v.67, n.7, p.1507-1511, 2004.

9 APÊNDICE

Apêndice A - Dados dos isolados identificados como *L. monocytogenes* provenientes dos laticínios B e C e de *L. seeligeri* provenientes do laticínio A.

Código do Isolado	Sorotipo	Ponto de isolamento / Fonte	Coleta / Período	Procedência Laticínio
1B	4b	Ralo câmara fria A	1ª (nov/08)	B
2B	4b	Piso sala pasteurização	1ª (nov/08)	B
3B	1/2b	Piso sala pasteurização	1ª (nov/08)	B
4B	4b	Piso câmara fria B	1ª (nov/08)	B
5B	4b	Ralo câmara fria A	2ª (fev/09)	B
6B	4b	Ralo câmara fria A	2ª (fev/09)	B
7B	4b	Ralo câmara fria A	2ª (fev/09)	B
8B	4b	Ralo câmara fria A	2ª (fev/09)	B
9B	4b	Ralo câmara fria A	2ª (fev/09)	B
10B	4b	Ralo câmara fria A	2ª (fev/09)	B
11B	4b	Piso sala pasteurização	2ª (fev/09)	B
12B	4b	Piso sala pasteurização	2ª (fev/09)	B
13B	4b	Piso câmara fria A	2ª (fev/09)	B
14B	4b	Piso câmara fria A	2ª (fev/09)	B
15B	4b	Piso câmara fria A	2ª (fev/09)	B
16B	4b	Piso câmara fria A	2ª (fev/09)	B
17B	4b	Piso câmara fria B	2ª (fev/09)	B
18B	1/2b	Piso câmara fria B	2ª (fev/09)	B
19B	4b	Piso câmara fria B	2ª (fev/09)	B
20B	4b	Ralo câmara fria A	3ª (mai/09)	B
21B	4b	Ralo câmara fria A	3ª (mai/09)	B
22B	4b	Ralo câmara fria A	3ª (mai/09)	B
23B	4b	Ralo câmara fria A	3ª (mai/09)	B
24B	4b	Ralo câmara fria A	3ª (mai/09)	B
25B	4b	Estrado câmara fria A	3ª (mai/09)	B
26B	4b	Estrado câmara fria A	3ª (mai/09)	B
27B	1/2b	Piso câmara fria A	3ª (mai/09)	B
28B	4b	Piso câmara fria A	3ª (mai/09)	B
29B	4b	Piso câmara fria A	3ª (mai/09)	B
30B	4b	Piso câmara fria A	3ª (mai/09)	B
31B	1/2b	Piso câmara fria B	3ª (mai/09)	B
32B	1/2b	Piso câmara fria B	3ª (mai/09)	B
33B	4b	Ralo câmara fria A	4ª (ago/09)	B
34B	1/2b	Ralo câmara fria A	4ª (ago/09)	B
35B	4b	Ralo câmara fria A	4ª (ago/09)	B
36B	4b	Ralo câmara fria A	4ª (ago/09)	B
37B	1/2c	Piso sala pasteurização	4ª (ago/09)	B
38B	1/2c	Piso sala pasteurização	4ª (ago/09)	B
39B	1/2c	Piso sala pasteurização	4ª (ago/09)	B
40B	1/2c	Piso sala pasteurização	4ª (ago/09)	B
41B	4b	Caixas plásticas	4ª (ago/09)	B
42B	4b	Caixas plásticas	4ª (ago/09)	B
43B	4b	Caixas plásticas	4ª (ago/09)	B
44B	1/2b	Caixas plásticas	4ª (ago/09)	B
45B	1/2b	Estrado câmara fria A	4ª (ago/09)	B
46B	4b	Estrado câmara fria A	4ª (ago/09)	B
47B	4b	Estrado câmara fria A	4ª (ago/09)	B
48B	4b	Piso câmara fria A	4ª (ago/09)	B
49B	4b	Piso câmara fria A	4ª (ago/09)	B
50B	4b	Piso câmara fria A	4ª (ago/09)	B

51B	4b	Piso câmara fria A	4 ^a (ago/09)	B
52B	4b	Piso câmara fria B	4 ^a (ago/09)	B
53B	4b	Piso câmara fria B	4 ^a (ago/09)	B
54B	4b	Piso câmara fria B	4 ^a (ago/09)	B
55B	4b	Piso câmara fria B	4 ^a (ago/09)	B
1C	4b	Piso câmara fria	1 ^a (dez/08)	C
2C	4b	Piso câmara fria	1 ^a (dez/08)	C
3C	4b	Luvras de manipulador	2 ^a (mar/09)	C
4C	4b	Luvras de manipulador	2 ^a (mar/09)	C
5C	4b	Luvras de manipulador	2 ^a (mar/09)	C
6C	4b	Estrado câmara fria	2 ^a (mar/09)	C
7C	4b	Piso câmara fria	3 ^a (jun/09)	C
8C	4b	Piso câmara fria	3 ^a (jun/09)	C
9C	1/2a	Piso câmara fria	3 ^a (jun/09)	C
10C	1/2c	Salmoura	3 ^a (jun/09)	C
11C	1/2c	Salmoura	3 ^a (jun/09)	C
12C	4b	Caixas plásticas	4 ^a (set/09)	C
13C	4b	Caixas plásticas	4 ^a (set/09)	C
14C	4b	Caixas plásticas	4 ^a (set/09)	C
15C	1/2a	Caixas plásticas	4 ^a (set/09)	C
16C	4b	Estrado câmara fria	4 ^a (set/09)	C
17C	4b	Piso câmara fria	4 ^a (set/09)	C
18C	4b	Piso câmara fria	4 ^a (set/09)	C
19C	4b	Piso câmara fria	4 ^a (set/09)	C
20C	4b	Piso câmara fria	4 ^a (set/09)	C
21C	4b	Piso câmara fria	4 ^a (set/09)	C
22C	4b	Salmoura	4 ^a (set/09)	C
23C	4b	Salmoura	4 ^a (set/09)	C
24C	4b	Salmoura	4 ^a (set/09)	C
25C	4b	Queijo Prato	4 ^a (set/09)	C
26C	4b	Queijo Prato	4 ^a (set/09)	C
27C	4b	Queijo Prato	4 ^a (set/09)	C
28C	4b	Queijo Prato	4 ^a (set/09)	C
29C	4b	Queijo Prato	4 ^a (set/09)	C
30C	4b	Queijo Prato	4 ^a (set/09)	C
V1	<i>L. seeligeri</i>	Ralo câmara fria 1	1 ^a (out/08)	A
V2	<i>L. seeligeri</i>	Piso câmara fria 2	2 ^a (jan/08)	A
V3	<i>L. seeligeri</i>	Piso câmara fria 1	3 ^a (abr/09)	A
V4	<i>L. seeligeri</i>	Piso câmara fria 1	4 ^a (jul/09)	A

Apêndice B – Dendrograma representando relações genéticas entre isolados de *L. monocytogenes* e *L. seeligeri*, com base em perfis de PFGE (Apa1). Similaridades (%) entre os isolados foram calculadas pelo coeficiente de Dice e estão representadas pelos números acima dos nós. Os dados foram classificados pelo método UPGMA. Códigos de isolados, sorotipo, ponto de isolamento e ordem de coleta estão apresentados à direita. Cores iguais representam os mesmos locais de isolamento.

Apêndice C – Dendrograma representando relações genéticas entre isolados de *L. monocytogenes* e *L. seeligeri*, com base em perfis de PFGE (Ascl). Similaridades (%) entre os isolados foram calculadas pelo coeficiente de Dice e estão representadas pelos números acima dos nós. Os dados foram classificados pelo método UPGMA. Códigos de isolados, sorotipo, ponto de isolamento e ordem de coleta estão apresentados à direita. Cores iguais representam os mesmos locais de isolamento.

Apêndice D - Pulsotipos de PFGE obtidos a partir de 88 isolados de *L. monocytogenes*, sendo 85 provenientes dos laticínios e 3 incluídos na análise.

Pulsotipo	Número de isolados	Sorotipo
P1	1	1/2b
P2	1	1/2b
P3	2	1/2b
P4	1	1/2b
P5	4	1/2c
P6	1	1/2a
P7	1	1/2a
P8	2	4b
P9	1	4b
P10	2	4b
P11	1	4b
P12	1	4b
P13	1	4b
P14	1	4b
P15	1	4b
P16 ^A	1	4b
P17	2	4b
P18	1	4b
P19	3	4b
P20	4	4b
P21	8	4b
P22	1	4b
P23	1	1/2b
P24	4	4b
P25	1	4b
P26	2	4b
P27*	21	4b e 1/2b
P28	1	4b
P29	1	4b
P30	2	4b
P31	1	4b
P32 ^B	1	4b
P33	3	4b
P34	2	4b
P35	1	4b
P36	1	4b
P37	1	4b
P38	1	4b
P39	2	1/2c
P40 ^C	1	1/2c

^A = *L. monocytogenes* EP97 ^B = *L. monocytogenes* EP10 ^C = *L. monocytogenes* ATCC® 7644

* = pulsotipo no qual ficaram incluídos isolados pertencentes a 2 sorotipos (4b e 1/2b)