

CAPÍTULO 1. Identificação e caracterização fenotípica de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* em leite pasteurizado e queijo Minas Frescal

1 INTRODUÇÃO

Doenças transmissíveis por alimentos (DTA) são relacionadas, principalmente, ao consumo de produtos de origem animal. Dados disponíveis indicam que os surtos de etiologia bacteriana respondem por 60% das hospitalizações e por aproximadamente 70% das mortes, embora bactérias patogênicas estejam presentes em somente 30% dos casos de DTA de etiologia conhecida (IFT, 2004). Por isso, os esforços são normalmente direcionados para a prevenção dos surtos causados por esse grupo de microrganismos. Os surtos de DTA são reconhecidamente subnotificados, tornando-se impossível avaliar seu real impacto na saúde das populações e na economia dos países, mesmo os desenvolvidos. O impacto de DTA nos países em desenvolvimento é ainda mais difícil de calcular; mas, estima-se que nestes países morrem anualmente 2,1 milhões de crianças devido a doenças diarreicas, sendo que a água e os alimentos veiculam a maioria dos patógenos responsáveis (OMS, 2002a,b). Somente nos EUA, estimam-se que ocorram 76 milhões de DTA por ano, com prejuízos entre 6,5 e 34,9 bilhões de dólares; relacionados, principalmente, a despesas médicas, perdas de produtividade e recolhimento de produtos (IFT, 2004).

Nas últimas décadas, microrganismos não associados a doenças em animais, passaram a ocupar um lugar de destaque na etiologia das DTA (Hubbert et al., 1996). O aumento do número de DTA tem sido explicado pelas mudanças culturais e comportamentais vivenciadas no período, sendo as mais conhecidas o aumento do consumo de produtos de origem animal, a necessidade de as pessoas se alimentarem fora de casa e a

rápida mobilização de pessoas e alimentos entre países ou regiões (Hubbert et al., 1996). Essa situação é diferente da existente até as primeiras décadas do século passado, quando os microrganismos causadores de doenças em animais de produção, como a brucelose e a tuberculose, eram os principais riscos à saúde dos consumidores de produtos de origem animal.

Grande parte dos surtos de DTA deve-se ao consumo do leite não pasteurizado e de seus derivados, especialmente queijos (Altekruse et al., 1998; Pitt et al., 1999; De Buyser et al., 2001). Casos relacionados ao consumo de leite pasteurizado foram atribuídos à contaminação pós-pasteurização e na distribuição do produto (Hubbert et al., 1996; Tompkin, 2002; Silva et al., 2003). São reconhecidas várias possibilidades de introdução de patógenos no ambiente de processamento industrial, sendo o leite cru, uma das mais citadas (Tondo et al., 2000; Norton et al., 2001).

Os microrganismos mais freqüentemente isolados em casos de DTA são *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* produtora de enterotoxina semelhante à de *Shigella* (STEC), *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenes* (Jayarao & Henning, 2001). Além desses, agentes comuns de infecção intramamária, como *S. aureus* e espécies de *Streptococcus*, podem representar riscos para a saúde humana (Hubbert et al., 1996). A partir da década de 1980, um novo patógeno, *Enterobacter sakazakii*, foi reconhecido, sendo associado a infecções que resultam em meningite em neonatos prematuros, com altos índices de morbidade e mortalidade,

embora a infecção possa ocorrer em todas as faixas etárias (Lai, 2001; IFT 2004). A fonte de contaminação desse patógeno inclui queijos, carne, hortaliças, grãos, condimentos e, especialmente, fórmulas infantis que usam leite em pó (Muytjens et al., 1988; Van Acker et al., 2001; Iversen et al., 2005).

Cyclospora, *Cryptosporidium*, *Brucella* e *Mycobacterium paratuberculosis*, *S. chester*, *Campylobacter jejuni* são apontados como causadores de infecções emergentes ou reemergentes e associados às DTA. A infecção por *Cyclospora* é amplamente distribuída: Ásia, Índia, Paquistão, África, Reino Unido, Caribe e Américas. A criptosporidiose vem ganhando importância à medida que o número de casos de AIDS no mundo aumenta, visto que esta doença é associada à infecção pelo vírus HIV, causando, algumas vezes, diarreias fatais nesses pacientes. A brucelose é uma zoonose de elevada importância econômica e de saúde pública. Os produtos de origem animal, sobretudo derivados do leite consumidos cru, estão altamente associados à transmissão dessa enfermidade e também da tuberculose (Miller e Page, 1998).

A espécie *L. monocytogenes* tem sido isolada em diferentes tipos de queijos, em vários países dos continentes americano e europeu (Silva et al., 1998; Saltijeral et al., 1999; Cordano & Rocout, 2001; Rudolf & Scherer, 2001; Park et al., 2002; Leclerc et al. 2002). Produtos com alta umidade apresentam as melhores condições para sua multiplicação.

Considerando a importância de *L. monocytogenes* em produtos lácteos, a legislação brasileira não permite a presença desta bactéria em queijos com média, alta e muito alta umidade (Brasil, 2001). Entretanto, em vários estudos publicados, observa-se uma frequência variada de 2,3% a 41,2% em queijos comercializados em várias regiões do país. A variação de

freqüência de *L. monocytogenes* pode ser explicada pela origem, amostragem, região geográfica ou tipo de acondicionamento do produto (Destro et al., 1991; Silva et al., 1998; Branco, 2002; Sousa, 2002; Carvalho, 2003).

Intoxicações estafilocócicas atribuídas ao consumo de queijos têm sido relatadas em várias partes do mundo (ICMSF, 1996; Altekruze et al., 1998; Meyrand & Vernozy-Rozand, 1999; De Buyser et al., 2001; Hui et al., 2001; Leclerc et al., 2002). No Brasil, surtos de intoxicações estafilocócicas são associados, principalmente, ao consumo de queijos do tipo Minas Frescal e Minas Padrão (Carmo et al., 1995; 2002). A multiplicação de *S. aureus* e a produção de enterotoxina dependem das características físicas, químicas e microbiológicas de cada tipo de queijo, sendo os queijos moles mais favoráveis à formação de enterotoxinas (Meyrand & Vernozy-Rozand, 1999). A presença de *S. aureus* tem sido constatada em queijo Minas Frescal (Carmo et al., 1995; Sabione et al., 1998; Almeida Filho et al., 2002; Carvalho, 2003), queijo de coalho (Florentino e Martins, 1999; Leite Júnior et al., 2000; Feitosa et al., 2003), queijo mussarela (Nicolau, 2000) e em queijos frescos (Araújo et al., 2002). A mera identificação de *S. aureus* no alimento, no entanto, não indica que esse microrganismo seja o responsável por um surto de intoxicação alimentar; sendo, para isso, necessários estudos moleculares complementares e identificação de amostras produtoras de enterotoxinas. Outro fator de contaminação por *Staphylococcus* coagulase positivo em plantas de processamento de alimentos é a habilidade do patógeno em formar biofilmes, quando não há um programa efetivo de limpeza e sanitização (Luppens et al., 2002).

Emergente nas últimas décadas, *E. coli* O157:H7 é um importante patógeno causador de DTA e, apesar de sua incidência relativamente baixa, apresenta

consequências desastrosas para a saúde do consumidor, especialmente crianças, jovens e idosos (OMS, 2002a). O principal sintoma associado a este sorotipo é a diarreia com sangue, denominada colite hemorrágica. Uma séria consequência da infecção é a síndrome hemolítica urêmica, com possível falha renal e ocasional morte dos pacientes, quando não tratados a tempo (Hui et al., 2001). Em 1996, um surto de *E. coli* O157:H7 no Japão afetou mais de 6.300 crianças em idade escolar e resultou em duas mortes, sendo este o maior surto reconhecido por este patógeno (OMS, 2002a). Em maio de 1993, ocorreram seis casos de infecção humana com *E. coli* O157:H7 na cidade de Sheffield (Inglaterra) e o leite não-pasteurizado foi identificado como a origem da infecção (Mechie et al., 1997). Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos EUA, o número de surtos envolvendo infecção por *E. coli* O157:H7 vem aumentando dramaticamente, embora tal aumento possa ser atribuído, em parte, ao aumento de comunicações e à melhoria do diagnóstico laboratorial (Boyce et al., 1995).

Bactérias do gênero *Salmonella* estão presentes nas fezes de animais de produção incluindo aves, bovinos, caprinos e suínos. Elas podem contaminar o leite e seus derivados, tendo sido isoladas de queijos de coalho em várias ocasiões (Florentino & Martins, 1999; Feitosa et al., 2003).

Um ponto crucial nos sistemas de gestão de qualidade e segurança, como a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), é o uso de métodos rápidos para a monitorização. Nos métodos microbiológicos tradicionais os procedimentos de isolamento e identificação de bactérias como *Salmonella* podem levar até seis dias ou mais (Marshall, 1992).

Técnicas moleculares são usadas para investigação de surtos, para confirmar e delimitar o comportamento da transmissão

de um ou mais clones de microrganismos epidêmicos, para testar hipóteses sobre fontes e veículos de transmissão destes clones e monitorar os reservatórios de organismos epidêmicos. A tipagem é usada também para avaliação de medidas de controle, por meio da documentação da prevalência e circulação de organismos epidêmicos em populações infectadas (Maslow & Mulligan, 1996).

Diversos métodos genotípicos e fenotípicos são empregados para identificação e classificação microbiana. Cada um deles permite certo nível de classificação filogenética, para gênero, espécie e biovariedade de uma estirpe. Cada método apresenta vantagens e desvantagens, em relação à facilidade de aplicação, reprodutibilidade, requerimentos de equipamentos e nível de resolução (Akkermans et al., 1995). A combinação entre métodos fenotípicos e genotípicos na tipagem de *Salmonella* vem sendo utilizada como ferramenta em estudos epidemiológicos (Borrego et al., 1992). Os métodos fenotípicos adotados nessas investigações são fagotipagem, sorotipagem e resistência a antimicrobianos (Lailler et al., 2002; Yang et al., 2002). A análise genotípica de *Salmonella* por métodos de tipagem molecular é a forma de caracterizar as linhagens de diferentes sorovares de *Salmonella* (Lailler et al., 2002). Técnicas moleculares são de eleição, também, nos estudos de relação epidemiológica entre linhagens multirresistentes de *Salmonella* Typhimurium (Yang et al., 2002; Ling et al., 2002). O desenvolvimento dos métodos moleculares associados à fenotipagem possibilitou um alto poder de identificação dos microrganismos isolados (Baudart et al., 2000).

Entre os métodos moleculares, a PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) tem maior poder discriminatório, podendo ser aplicada a vários grupos de patógenos como os gêneros *Salmonella*, *Listeria* e

Staphylococcus (Liebisch e Schwarz 1996; Lange et al. 1999; Sandvang et al., 2000; Borucki et al. 2004). Além de altamente discriminatória, a PFGE permite comparar perfis obtidos em amostras de diferentes proveniências, para elucidar possíveis fontes de amostras isoladas de surtos de DTA (Borucki et al., 2004). Da mesma forma, pode ser utilizada para monitoramento de amostras multirresistentes e no rastreamento de possíveis fontes de infecção (Borucki et al., 2004).

Em razão da relevância das DTA no contexto contemporâneo, o principal objetivo desse trabalho foi identificar e caracterizar patógenos bacterianos (*Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*) contaminantes do leite pasteurizado e do queijo Minas Frescal, comercializados em diferentes regiões de Juiz de Fora, Minas Gerais, e ainda, detectar possíveis fontes de contaminação destes na produção, manufatura e comércio da região de Juiz de Fora, Minas Gerais.

Espera-se com os resultados conhecer melhor a epidemiologia destes agentes, uma vez que a literatura apontou que a maioria deles é encontrada nesses produtos de origem animal. Com esses dados, poderá ser possível apontar prioridades para adoção de procedimentos que visem à eliminação de riscos de ocorrência de toxinfecções aos consumidores. Essas informações permitirão estruturar ou aperfeiçoar, em bases reais, programas de Boas Práticas Agropecuárias e Boas Práticas de Fabricação, que contribuirão para a prevenção e controle de patógenos na matéria-prima e nos derivados lácteos, resultando em produtos mais seguros e de melhor qualidade para o consumidor, menores prejuízos para o produtor e maior rendimento industrial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leite e segurança alimentar

A importância da segurança dos alimentos para a população humana é reconhecida pelos legisladores da maioria dos países e por instituições como a Organização Mundial de Saúde, FAO (*Food Agriculture Organization*), FDA (*Food and Drug Administration*), IDF/FIL (*International Dairy Federation*) e a Organização Mundial do Comércio (FAO, 1999; WHO/OMS, 1999; Horton, 2001). No caso dos produtos de origem animal, a garantia da segurança baseia-se na prevenção de transferência de agentes patogênicos (ou de suas toxinas) e de resíduos de drogas químicas, empregadas no manejo dos rebanhos, para os alimentos. Nos últimos anos, ocorreu um grande número de surtos de toxinfecções alimentares, muitos deles envolvendo mais de um país e, alguns, mais de um continente. Esses surtos prejudicam os programas de saúde pública, que, em grande parte, já são deficitários e causam importante redução da atividade econômica (WHO/OMS, 1999; Horton, 2001).

O leite é um dos alimentos mais consumidos no mundo e, devido a sua composição bioquímica complexa e alta atividade de água, é um excelente nutriente para o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos. Esse aspecto influencia o processamento e a qualidade dos derivados lácteos, com reflexos na sua vida de prateleira, na atividade econômica e na aceitação pelo consumidor. A qualidade do leite cru é influenciada pela sua composição físico-química (teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais) e por aspectos de higiene. Os parâmetros de higiene incluem baixo número de microrganismos deteriorantes, ausência de microrganismos patogênicos e de resíduos de drogas ou medicamentos e baixa contagem de células somáticas (Heeschen, 1996).

Antes do advento da pasteurização, o leite fluido e seus derivados encontravam-se entre os principais veículos de doenças, como febre tifóide, difteria, escarlatina, tuberculose e brucelose. A pasteurização foi introduzida com o objetivo de destruir os microrganismos patogênicos e reduzir o número dos deteriorantes. Os parâmetros de tempo e temperatura para a pasteurização do leite foram definidos em função da resistência térmica de microrganismos patogênicos, inicialmente *Mycobacterium tuberculosis* (60 °C / 15-20 minutos) e, posteriormente, *Coxiella burnetti* (63 °C / 30 minutos) (Hubbert et al., 1996). Apesar de a pasteurização ter contribuído para a redução da incidência das doenças transmissíveis pelo leite, as toxinfecções alimentares continuam sendo preocupantes para os consumidores, para as indústrias e para a saúde pública (Donnelly, 1990; Boor, 2001). Os riscos atuais são mais relacionados aos microrganismos que não constituem patógenos primários dos animais, embora possam causar nestes, infecções inaparentes. Muitos surtos de toxinfecção alimentar relacionados ao leite referem-se ao consumo de leite cru ou de derivados lácteos preparados com leite cru. Alguns casos relacionados ao consumo de leite pasteurizado ocorreram por contaminações pós-pasteurização (Hubbert et al., 1996). Dentre as diversas possibilidades para a introdução de patógenos no ambiente de processamento do leite, o leite cru compreende uma das predominantes (Donnelly, 1990; Boor, 2001).

Vários microrganismos patogênicos para o homem podem ser isolados do leite cru, incluindo *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* produtora de enterotoxina semelhante à de *Shigella* (STEC), *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenes* (Jayarao e Henning, 2001). Além desses, agentes comuns de infecção intramamária, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* spp. podem representar riscos para a saúde humana (Brito et al.,

1999; Hubbert et al., 1996; Balter et al., 2000). Muitos casos de toxinfecção alimentar por STEC (*E. coli* O157:H7) são relacionados ao consumo de leite cru, de queijo preparado a partir de leite cru e, em alguns casos, ao consumo de leite pasteurizado, demonstrando a possibilidade de ocorrência de contaminação do produto pós-pasteurização, pois esse patógeno é destruído por esse tratamento térmico (Rasmussen e Casey, 2001).

O leite e seus derivados podem abrigar uma variedade de microrganismos, entre eles patógenos causadores de doenças transmitidas por alimentos (DTA). A presença de patógenos no leite geralmente é proveniente do animal, do próprio ambiente da fazenda e da contaminação durante a ordenha. A maioria do leite consumido no mundo é tratado termicamente, porém a ocorrência de DTA pelo consumo de leite e derivados é comum. Isto se deve às seguintes razões: consumo de leite *in natura* não pasteurizado, consumo de queijos produzidos a partir de leite cru, não eliminação de toxinas de microrganismos produzidas durante o armazenamento do leite cru pela pasteurização e contaminação do leite pós-pasteurização, pela presença de biofilmes em utensílios e equipamentos de laticínios (Oliver et al, 2005).

Em virtude da importância de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *S. aureus* como causadores de DTA e da relevância destas no contexto contemporâneo, a seguir serão relatados dados da literatura científica relacionados à importância destes patógenos como causadores de toxinfecções alimentares.

2.2 *Escherichia coli* O157:H7

Escherichia é o gênero típico da família *Enterobacteriaceae* e *Escherichia coli* é a espécie típica deste gênero (Farmer III, 2003). *E. coli*, assim como outras

enterobactérias, apresenta numerosos sorotipos, os quais são associados a infecções no homem e em outros animais. É uma bactéria classificada como um bastonete Gram negativo; anaeróbia facultativa; geralmente móvel, por possuir flagelo; catalase positiva; oxidase negativa; geralmente não utiliza citrato como única fonte de carbono; fermentadora de carboidratos com produção de gás; e que coloniza o trato gastrointestinal (Barrow e Feltham, 1993). Sua membrana externa é constituída por lipopolissacarídeos, os quais são capazes de causar choques septicêmicos, coagulação intravascular disseminada e morte. Os lipopolissacarídeos são compostos por três componentes: lipídio A, um polissacarídeo central e o antígeno O (Kuntz e Kuntz, 1999).

Amostras de *E. coli* são sorologicamente diferenciadas tendo como base três antígenos de superfície: O (somático), H (flagelar), e K (capsular). Já foram identificados um total de 174 antígenos O, 56 antígenos H e 80 antígenos K (Doyle et al., 1997). O antígeno O é composto por uma longa cadeia de carboidratos e é responsável pela estabilidade da bactéria frente aos sais biliares (Kuntz e Kuntz, 1999).

E. coli faz parte do grupo conhecido como coliformes fecais, como também microrganismos dos gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter*. São internacionalmente considerados indicadores de segurança microbiológica dos alimentos, por serem geralmente inofensivos ao homem, sendo que somente algumas espécies são patogênicas para o homem. Além de ser considerada um microrganismo indicador de segurança microbiológica, *E. coli* pode ser patogênica para o homem e outros animais. A presença desses microrganismos nos alimentos demonstra que as práticas higiênico-sanitárias foram inadequadas (Duarte, 1999).

Isolados de *E. coli* que causam doenças no homem são classificados em grupos específicos de acordo com as propriedades de virulência, mecanismos de patogenicidade, sintomas clínicos e são, atualmente, conhecidos como sorotipos de *E. coli*. Cada um desses sorotipos é associado, epidemiologicamente e experimentalmente, a uma doença específica no homem e nos animais, sendo considerado um dos mais relevantes agentes etiológicos de infecções intestinais causadas pelo consumo de alimentos contaminados (González-García, 2000).

Os sorotipos mais importantes de *E. coli* associados a infecções intestinais em surtos de toxinfecções alimentares são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), causando diarreia em crianças; *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), responsável por diarreia dos viajantes no homem e colibacilose em bezerros, suínos e ovinos; *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), causando diarreia sanguinolenta no homem; *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), responsável por surtos de toxinfecções alimentares no homem, e classificada dessa forma por causar diarreia sanguinolenta e por ser produtora de potentes toxinas, sem ser invasiva (Levine, 1987; Blanco et al., 1996; Bopp et al., 2003).

E. coli enterohemorrágica (EHEC) é também chamada de *E. coli* verotoxigênica (VTEC) ou *E. coli* produtora de enterotoxina semelhante à de *Shigella* (STEC). Os sorogrupos mais importantes de EHEC são O26, O111 e O157, sendo o O157:H7 o mais relevante sorotipo em surtos de toxinfecções alimentares (Blanco et al., 1996; Bopp et al., 2003). *E. coli* O157:H7 foi identificada pela primeira vez, em 1982, como patogênica para o homem, em associação a um surto de colite hemorrágica nos EUA, pelo consumo de hambúrgueres mal cozidos distribuídos por uma cadeia de *fast-food* (Riley et al., 1983). A dose infectante de *E. coli* O157:H7 é muito baixa

quando comparada a outros patógenos. A dose mínima infectante de duas UFC em 25 gramas de alimento já foi determinada (Blanco et al., 1996).

E. coli O157:H7 apresenta características típicas da maioria das *E. coli*, com algumas exceções. Diferenças nas propriedades bioquímicas incluem: *E. coli* O157:H7 não fermenta o sorbitol (Ratnam et al., 1988); não produz a enzima β -glucuronidase, a qual é a base para a característica de fluorescência da *E. coli* quando presente no meio MUG (4-metil-umbelliferone glucuronide), dessa forma, *E. coli* O157:H7 não é fluorescente neste meio (Ratnam et al., 1988); e produz enterohemolisina, a qual não é comum em outras *E. coli* (Beutin et al., 1989). Outra diferença importante da *E. coli* O157:H7 é que esta não cresce bem em temperaturas de 44 a 45,5 °C (Doyle e Schoeni, 1984). A temperatura ideal para crescimento e produção de gás por esta bactéria varia de 19,3 a 41 °C (Raghubeer e Matches, 1990).

A produção de enterotoxina semelhante à de *Shigella* (STEC) por *E. coli* está associada a uma série de patologias graves, como enterocolite, colite hemorrágica, colite ulcerativa e síndrome hemolítica urêmica (Aleksic et al., 1992). Além da transmissão por meio dos alimentos, *E. coli* O157:H7 também pode ser transmitida por contato direto com pessoas infectadas, sobretudo quando há condições inadequadas de higiene (Lior, 1993). Não há tratamento específico para a infecção causada por este patógeno, somente terapia de suporte (Kuntz e Kuntz, 1999).

A patogenicidade de *E. coli* O157:H7 está relacionada a três fatores de virulência: produção de enterotoxinas semelhantes à de *Shigella* (SLT I e II), produção de hemolisina e expressão de adesinas específicas com as quais a bactéria coloniza o epitélio intestinal. Esta bactéria pode produzir uma ou as duas enterotoxinas. A

produção de SLT II parece estar associada ao desenvolvimento da síndrome hemolítica urêmica. Estas toxinas são citotóxicas para as células do cólon e íleo (Armstrong et al., 1996).

E. coli O157:H7 foi reconhecida na década de 1990 como um importante patógeno alimentar e como um dos principais problemas de saúde pública na América do Norte e na Europa (Coia, 1998). Os fatores determinantes para o surgimento desta bactéria como importante patógeno incluem mudanças nos hábitos de vida da população, aumento do consumo de produtos industrializados e mudanças na indústria de alimentos (Armstrong et al., 1996). Além destes, mudanças no manejo dos animais, tal como a irrigação de pastagens com esterco, sugerem a criação de ambientes nos quais *E. coli* O157:H7 consegue persistir (Hancock et al., 1994).

Estudos revelam que esta bactéria apresenta uma tolerância incomum a alguns estresses ambientais, como pH baixo, umidade baixa (Glass et al., 1992; Arnold e Kaspar, 1995). *E. coli* O157:H7 é capaz de sobreviver em produtos lácteos fermentados, os quais apresentam pH baixo, tais como, iogurte e leite acidificado (Govaris et al., 2002).

Produtos de origem animal, tais como carne mal passada, leite cru, leite pasteurizado e iogurte têm sido associados a surtos de toxinfecções alimentares causadas por *E. coli* O157:H7 (Doyle, 1991; Griffin e Tauxe, 1991; Morgan et al., 1993; Upton e Coia, 1994; Boyce et al., 1995; Mechie et al., 1997; Betts, 2000; OMS, 2002a). Outros alimentos, tais como vegetais (alfaca e alface), legumes (batata), sucos, água e maionese também podem ser reservatórios de *E. coli* O157:H7 (Morgan et al., 1988; Weagant et al., 1994; Ackers et al., 1998; González-García, 2000). Para proteger a imagem dos produtos lácteos como alimentos saudáveis, a indústria de laticínios considera, desde o final do século XX, *E.*

E. coli O157:H7 tão importante quanto outros patógenos, como *Salmonella* e *S. aureus* (Duncan e Hackney, 1994).

Desde a sua identificação, *E. coli* O157:H7 vem sendo isolada em numerosos surtos de colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (Wachsmuth et al., 1997). Dados do Centro de Controle de Doenças (CDC) dos EUA apontam que *E. coli* O157:H7 causa aproximadamente 75.000 casos de infecções por ano, sendo que metade dessas são toxinfecções alimentares. Cerca de 2.000 são graves e requerem hospitalizações, e, ainda, 50 mortes por ano nos EUA são atribuídas a infecções por *E. coli* O157:H7 (Mead et al., 1999).

Investigações epidemiológicas revelaram que rebanhos leiteiros, especialmente animais jovens, consistem no principal reservatório de *E. coli* enterohemorrágica produtora de toxina semelhante à de *Shigella* (STEC), incluindo *E. coli* O157:H7 (Wells et al., 1991; Zhao et al., 1995). Hancock et al. (1994), estudando a prevalência de *E. coli* O157:H7 em rebanhos leiteiros e de corte no Estado de Washington, EUA, encontraram 8,3% e 16% de rebanhos leiteiros e de corte, respectivamente, positivos para este patógeno. Esta bactéria, bem como outros sorogrupos de *E. coli* (STEC), também já foram isolados de rebanhos leiteiros no Brasil, nos Estados do Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo, havendo, dessa forma, a possibilidade de sua presença no leite cru (Gonzalez, et al., 2001; Prado et al., 2001; Farah et al., 2003; Moreira et al., 2003).

E. coli O157:H7 é capaz de sobreviver em fezes por longo período e mantém sua habilidade de produção de verotoxinas. Fezes bovinas consistem em potencial veículo de transmissão de *E. coli* O157:H7 para o gado, alimento e ambiente (Wang et al., 1996). Contaminação fecal do leite é considerada uma das formas de transmissão de *E. coli* O157:H7 para o homem. Leite cru

contaminado com este patógeno foi a causa de vários surtos de gastroenterite e de síndrome hemolítica urêmica (Chapman et al., 1993).

Um surto associado ao consumo de leite pasteurizado foi relatado por Upton e Coia (1994). Nessa ocasião, mais de 100 pessoas foram infectadas. Quase um terço dos casos requereu hospitalização e nove crianças de nove meses a 11 anos de idade desenvolveram síndrome hemolítica urêmica. *E. coli* O157:H7 foi isolada de tubulações e da máquina de envase de leite pasteurizado no laticínio, indicando que uma pasteurização inadequada ou contaminação pós-pasteurização podem ser fatores responsáveis por surtos.

Surto de DTA pelo consumo de queijo fresco produzido a partir de leite cru contaminado com *E. coli* O157:H7 também foi relatado no Estado de Wisconsin, EUA, em junho de 1998. Neste caso, 55 pessoas foram identificadas, laboratorialmente, como portadoras da *E. coli* O157:H7, sendo 25 hospitalizadas. A maioria dos sintomas incluiu: diarreia sanguinolenta, cãibra, fadiga e náusea. A duração média da diarreia foi de cinco dias (Outbreak..., 2000).

No Reino Unido, as taxas mais altas de infecções causadas por *E. coli* O157:H7 foram observadas na Escócia, em 1996, quando foram relatados 506 casos desta infecção (Reilly, 1997). Entretanto, Coia et al. (2001) avaliaram amostras de leite cru e queijos produzidos a partir de leite cru quanto à presença de *E. coli* O157:H7. Estes pesquisadores analisaram 500 amostras de leite cru e 739 amostras de queijos e não encontraram a presença desta bactéria nas amostras pesquisadas, sugerindo que a prevalência deste patógeno, atualmente, seja baixa na Escócia.

Oksüz et al. (2004), investigando amostras de leite cru e de queijos produzidos com leite cru, na Turquia, encontraram 1% de

amostras de leite cru e 4% de amostras de queijos positivas para *E. coli* O157. Estes resultados demonstram que queijos produzidos a partir de leite cru têm potencial para causar infecções por *E. coli* O157.

A temperatura de armazenamento e as condições do ambiente de manufatura dos derivados do leite podem facilitar a proliferação de *E. coli* O157:H7. Wang et al. (1997), avaliando o crescimento e a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em leite cru e pasteurizado, observaram que nas temperaturas de 8 e 15 °C houve maior taxa de crescimento desta bactéria, chegando a contagens de 10⁸ unidades formadoras de colônias (UFC) por mL. De acordo com esses autores, armazenar o leite a temperaturas inferiores a 5 °C é recomendado para prevenir o crescimento deste patógeno. A sobrevivência, por várias semanas, de *E. coli* O157:H7 em salmouras típicas de queijos também já foi atestada (Ingham et al., 2000).

Apesar de *E. coli* O157:H7 ser capaz de crescer em produtos lácteos fermentados, como o iogurte, a contagem desta bactéria declina à medida que o pH diminui. Massa et al. (1997) avaliaram a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em iogurtes durante o seu processamento e armazenamento. Esses pesquisadores observaram que a contagem bacteriana diminuiu de 7,08 para 5,32 log UFC mL⁻¹, após sete dias de estocagem a 4 °C.

Jayarao e Henning (2001) pesquisaram a presença de *E. coli* (STEC) em amostras de leite cru. Cinco amostras apresentaram-se positivas para este patógeno, entretanto *E. coli* O157:H7 não foi encontrada em nenhuma das 131 amostras de leite analisadas. O mesmo aconteceu no estudo de Pigatto et al. (2003) com amostras de fezes de rebanhos leiteiros do Estado do Paraná, Brasil. *E. coli* (STEC) foram isoladas, porém *E. coli* O157:H7 não foi.

A persistência de *E. coli* O157:H7 em animais também não foi demonstrada no estudo de Rahn et al. (1997). Estes pesquisadores investigaram a presença deste patógeno em amostras de fezes de vacas, bezerros, trabalhadores rurais, gatos, roedores e pássaros selvagens, além de pesquisar em amostras do ambiente, em fazendas de Ontário, Canadá. Após um ano de monitoramento das fazendas e de implementação de medidas de higiene, *E. coli* O157:H7 foi detectada em fezes de apenas dois bezerros. Entretanto, a frequência de *E. coli* (STEC) foi alta, após um ano de monitoramento: 19,1 % em comedouros de bezerros; 14,9% de amostras positivas em comedouros de vacas; 12,5% de amostras positivas em partes de ordenhadeira mecânica; 8,2% de amostras positivas em fezes de vacas; e 18,3% de amostras positivas em fezes de bezerros.

Por outro lado, Mechie et al. (1997) investigaram a presença de *E. coli* O157:H7, monitorando um rebanho leiteiro durante 15 meses. Esses autores isolaram *E. coli* O157:H7 em 153 (4,3%) de 3.593 swabs retais de bovinos. A prevalência em vacas em lactação (14%) foi significativamente menor do que em outros grupos de animais, como novilhas (68%), bezerros (56%), e vacas secas (40%). Nas vacas em lactação, a maior contagem de *E. coli* O157:H7 foi observada na primeira semana pós-parto. Neste estudo, *E. coli* O157:H7 não foi isolada do leite de conjunto do rebanho, porém foi isolada de amostras de leite individuais de dois animais. Todos os isolados de *E. coli* O157:H7 obtidos pertenceram ao mesmo fagotipo.

Métodos rápidos para detecção de *E. coli* O157:H7 são importantes para a saúde da população e para identificar este patógeno no caso de surtos de toxinfecções alimentares. Tanto métodos moleculares quanto microbiológicos tradicionais são usados para detecção de *E. coli* O157:H7 em alimentos. Como os métodos

microbiológicos tradicionais exigem tempo prolongado para se obter resultados e são de execução trabalhosa e dispendiosa, eles não são ideais para análise de grande número de amostras e na investigação de surtos (Fode-Vaughan et al., 2003).

Os métodos convencionais incluem plaqueamento, cultura microbiana e bateria de testes bioquímicos. No caso de *E. coli* O157:H7, a detecção é baseada no ágar MacConkey sorbitol, o qual é composto por sais biliares, carboidrato e o sorbitol, como indicador. Sob condições normais, *E. coli* O157:H7 não fermenta o sorbitol. Se esta bactéria estiver presente, colônias rosa claro irão aparecer no meio, enquanto as outras enterobactérias irão formar colônias cor de rosa (Deisingh e Thompson, 2004).

Atualmente, as técnicas moleculares consistem em importantes métodos de detecção de patógenos em alimentos. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é apontada como uma técnica muito eficiente na detecção de vários patógenos em alimentos, inclusive *E. coli* O157:H7 (McKillip et al., 2000; Hsu e Tsen, 2001).

Um teste de PCR multiplex (Reação Múltipla em Cadeia da Polimerase) sensível e específico foi desenvolvido para detecção de *E. coli* O157:H7, com sensibilidade para $< 1 \text{ UFC mL}^{-1}$ de leite cru (Fratamico e Deng, 1995). Hu et al. (1999) também desenvolveram uma PCR multiplex para identificação de *E. coli* O157:H7, utilizando cinco *primers* que amplificam, especificamente, segmentos dos genes *eaeA*, *slt-I*, *slt-II*, *flicC*, *rbfE*, os quais permitem a identificação simultânea, em uma reação apenas, do sorotipo O157:H7 e seus fatores de virulência. A microbiota das fezes dos bovinos não interfere na reação de PCR multiplex e apenas uma célula de *E. coli* O157:H7 é capaz de ser detectada por esta técnica, se combinada com uma etapa de pré-enriquecimento.

Garcia (2006) padronizou duas reações de PCR multiplex para detecção de *E. coli* O157:H7. Uma reação utilizou os iniciadores RfbF/RfbR e FLICH7F/FLICH7R, e a outra reação utilizou os iniciadores SLT-IF/SLTIR e SLT-IIF/SLT-IIR. Ambas foram eficientes na detecção deste patógeno. Amâncio (2002) também utilizou, com sucesso, PCR multiplex para detecção de *E. coli* O157:H7 em amostras de leite pasteurizado, hambúrguer e fezes bovinas. O uso das técnicas de ELISA e PCR, em conjunto, também já foi eficiente na detecção de *E. coli* O157:H7 em leite pasteurizado, com sensibilidade de 10^2 UFC mL^{-1} (Daly et al., 2002).

Como rebanhos leiteiros e de corte muitas vezes são apontados como reservatórios de *E. coli* O157:H7, monitorá-los é uma importante medida auxiliar do controle e prevenção da disseminação deste patógeno. Prevenir a introdução de animais contaminados nos rebanhos parece reduzir a prevalência de *E. coli* O157:H7 em rebanhos leiteiros. Reposição de bezerras e novilhas pode colocar o rebanho em risco, uma vez que as taxas de contaminação de animais jovens são elevadas. Devem ser controlados, ainda, outros fatores, tais como: evitar o contato entre animais jovens e adultos; realizar o correto manejo nutricional e ambiental dos bezerros; e evitar o estresse dos animais (Dorn, 1995; Rahn et al., 1997).

Medidas como a adição de conservantes ao leite e queijos, sorbato de potássio e peróxido de hidrogênio, já foram atestadas como eficientes na redução da proliferação de *E. coli* O157:H7 nestes alimentos (Effat et al., 2001). Entretanto, a legislação brasileira não permite a adição dessas substâncias químicas no leite cru e pasteurizado (Brasil, 2002). A adoção de boas práticas agropecuárias e boas práticas de fabricação durante a manufatura de produtos de origem animal e o cozimento adequado dos alimentos antes do consumo

são importantes medidas de controle para prevenir infecções por *E. coli* O157:H7 (Doyle, 1991). O controle e a prevenção da presença de *E. coli* O157:H7 e de outros patógenos em alimentos deve englobar esforços de toda a cadeia de alimentos, desde o ambiente da fazenda até à mesa do consumidor. Deve-se também basear em um profundo entendimento da epidemiologia do patógeno e no consumo preferencialmente de alimentos tratados termicamente (Mead e Griffin, 1998).

Programas de qualidade total, como o APPCC, sempre trazem benefícios para a proteção dos alimentos e da indústria alimentícia como um todo contra patógenos. Evitar o consumo de alimentos de origem animal crus também é importante, preferindo os produtos tratados termicamente. Prevenir a contaminação cruzada e a contaminação pós-pasteurização consistem em pontos críticos de controle na proteção dos alimentos contra *E. coli* O157:H7 (Duncan e Hackney, 1994).

2.3 *Listeria monocytogenes*

Bactérias do gênero *Listeria* são amplamente distribuídas na natureza; entretanto, há um número limitado de espécies de importância médica e veterinária (Mow e Donachie, 1997; McLauchlin, 1997). No gênero *Listeria*, atualmente, seis espécies são reconhecidas: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* e *L. murrayi*. As espécies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri* são as únicas associadas com patogenicidade, mas somente *L. monocytogenes* é consistentemente patogênica para pessoas e animais. *L. ivanovii* causa doenças predominantemente em ovinos e raramente no homem (Jay et al., 2005); *L. seeligeri* somente uma vez foi diagnosticada como causa de meningite em um adulto não-imunocomprometido (IFT, 2004).

L. monocytogenes foi reconhecida como patogênica para o homem há mais de 70 anos; porém, foi identificada como patógeno de origem alimentar apenas na década de 1980, como resultado de vários surtos de listeriose no homem (Donnelly, 1990). Apesar de 13 sorotipos de *L. monocytogenes* já terem sido descritos, apenas três (1/2a, 1/2b e 4b) causam a maioria dos casos clínicos no homem e nos animais (Tappero et al., 1995; Jay et al., 2005). *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. grayi* são membros não patogênicos do gênero *Listeria* (Donnelly, 1990).

Listeria spp. são cocobacilos Gram-positivo, móveis, não esporulados, anaeróbios facultativos a microaeróbios e parasitas intracelulares facultativos. São, ainda, catalase positivo e oxidase negativo e fermentam carboidratos (Barrow e Feltham, 1993; Bille et al., 2003).

L. monocytogenes pode tolerar várias condições ambientais adversas, tais como valores de pH entre 4,1 e 9,6 e concentrações de até 30% de cloreto de sódio. É ubíqua na natureza, sendo encontrada em alimentos *in natura* e processados e no ambiente de processamento dos alimentos, como um biofilme, além ser amplamente reconhecida como agente de toxinfecção alimentar (Doyle, 1988; Muriama, 1996). Devido à resistência às condições ambientais desfavoráveis e à gravidade das infecções causadas, *L. monocytogenes* é considerada um dos patógenos de infecção de origem alimentar mais importantes na atualidade (Almeida e Almeida, 2003).

Após a replicação no trato gastrointestinal do hospedeiro, *L. monocytogenes* difunde-se diretamente nas células adjacentes por meio de um mecanismo de motilidade baseado na polimerização da actina da célula do hospedeiro. Os fatores de virulência envolvidos na aderência, entrada, sobrevivência intracelular, multiplicação e

difusão de célula a célula têm sido caracterizados. Embora considerável progresso tenha sido alcançado nos estudos sobre os genes e seus produtos responsáveis pela virulência de *L. monocytogenes*, diversos questionamentos em relação a estes mecanismos ainda permanecem não elucidados (Almeida e Almeida, 2003).

A dose infectante de *L. monocytogenes* depende de vários fatores, incluindo o estado imunológico do hospedeiro. A ocorrência e o curso da doença, por sua vez, dependem da dose infectante. Estudos em macacos (*Cebus apella*) e camundongos (*Mus musculus*) sugerem que, reduzindo-se os níveis de exposição, reduz-se também a manifestação clínica da infecção (Farber et al., 1991). Entretanto, estes experimentos não auxiliam na determinação da dose mínima para causar infecção no homem. Trabalhos sugerem que o número de *L. monocytogenes* em alimento contaminado capaz de causar surtos e casos esporádicos de listeriose é superior a 10^2 UFC g⁻¹; contudo doses infectantes inferiores a este valor não podem ser descartadas (Rocourt e Cossart, 1997).

L. monocytogenes já foi isolada de várias espécies animais, incluindo o homem, e de vegetais, água, serragem, silagem, material fecal, esgoto doméstico e industrial (Farber e Peterkin, 1991; Bille et al., 2003). Existe a possibilidade de que a *Listeria* possa ser transmitida dos animais para o homem. Homem, animais e o ambiente são reservatórios naturais deste microrganismo. Ela já foi isolada de mais de 40 espécies de mamíferos e 17 espécies diferentes de aves, incluindo a galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*) e o peru (*Meleagris gallopavo*) (Gray e Killinger, 1966; McGaughlin, 1987). Rodriguez et al. (1984) identificaram o ovino como o principal reservatório de *Listeria* na natureza. Em um único estudo, estes autores identificaram 88% de carneiros (*Hemitragus jemtanicus*) como portadores de alguma espécie de *Listeria*. A

característica da *Listeria* que a faz um importante patógeno no contexto dos produtos lácteos é a sua habilidade de crescer e se multiplicar em temperaturas de refrigeração, sendo caracterizada como psicrótrófica (Donnelly, 1990).

Rebanhos leiteiros também podem ser considerados reservatórios de *L. monocytogenes* e esta bactéria pode causar mastite em vacas leiteiras (Gitter et al., 1980). Estudos realizados no Canadá e EUA demonstraram que *L. monocytogenes* pode ser encontrada no leite cru em taxas que variam de 1,3 a 5,4% (Lovett et al., 1987; Farber et al., 1988; Liewen e Plantz, 1988; Slade e Collins-Thompson, 1988; Hassan et al., 2001). No estudo de Lovett et al. (1987) em três áreas dos EUA, a incidência de *L. monocytogenes* no leite cru variou de 0% na Califórnia a 7% em Massachusetts, com incidência média de 4,2%. Já foi demonstrado também que vacas podem ser portadoras deste patógeno por mais de três anos, sem apresentarem qualquer sintoma ou qualquer alteração no leite. Animais portadores que não desenvolvem mastite e continuam sendo veiculadores de *L. monocytogenes* se tornam um problema de saúde pública (Farber et al., 1990).

A listeriose é considerada uma doença emergente sendo principalmente transmitida por alimentos (Faber e Peterkin, 1991) e consiste em uma DTA atípica e de grande importância em saúde pública, pela gravidade dos sintomas e da natureza não entérica da doença (Rocourt e Cossart, 1997). No homem, a listeriose apresenta-se sob formas clínicas graves, como septicemia e meningite. Mulheres grávidas são particularmente susceptíveis à infecção, podendo ocorrer aborto espontâneo ou originar natimortos. A listeriose é mais comum em neonatos, idosos e pacientes imunocomprometidos. A infecção é rara, mas a taxa de mortalidade varia de 20 a 30% e pode chegar a 75% nos grupos de risco

(Linnan et al., 1984; Gellin e Broome, 1989; Schuchat et al., 1991).

A sobrevivência e a proliferação de *Listeria* spp. em alimentos, sobretudo em produtos lácteos, crus e pasteurizados, são consideradas bastante elevadas. Tanto as espécies patogênicas quanto as não patogênicas podem estar presentes (Bearn e Girard, 1958; Fernández-Garayzábal et al., 1986; Faber e Peterkin, 1991). Há relatos da sobrevivência, em produtos lácteos, de *L. innocua* (não patogênica) e *L. monocytogenes* (patogênica) por mais de 178 e 140 dias, respectivamente (Erkmen, 1995; Öztürkoglu et al., 2006).

Rosenow e Marth (1987) analisaram o crescimento de *L. monocytogenes* em leite integral, leite desnatado, leite achocolatado e creme de leite armazenados em várias temperaturas e observaram que este patógeno é capaz de se proliferar em temperaturas que variam de 4 a 35 °C. O menor tempo de geração foi observado na temperatura de 35 °C; porém, em todas as temperaturas avaliadas (4, 8, 13, 21 e 35 °C) houve crescimento da população de *L. monocytogenes* alcançando 10^7 UFC mL⁻¹, valor este superior ao mínimo considerado capaz de causar toxinfecção alimentar, que é de 10^3 UFC mL⁻¹.

Alguns surtos envolvendo *L. monocytogenes* foram relatados e vários alimentos foram incriminados, como leite cru e pasteurizado, queijos, manteiga, carne crua e cozida, patês, vegetais, peixes e pratos prontos (Schlech et al., 1983; Fleming et al., 1985; James et al., 1985; Linnan et al., 1988; McLauchlin et al., 1991; Jensen et al., 1994; Bula et al., 1995; Goulet et al., 1995; McLauchlin, 1996; Dalton et al., 1997; Hurd et al., 2000; Lyytikäinen et al., 2000; Boggs et al., 2001).

Dois surtos importantes ocorreram nos EUA na década de 1980. Um deles ocorreu no Estado de Massachusetts, em 1983, no qual

leite pasteurizado foi considerado como veículo (Fleming et al., 1985), e o outro, na Califórnia, em 1985, no qual queijo estilo Mexicano foi o veículo. Este surto envolveu 148 casos e 48 mortes e, provavelmente, foi o alerta final para o papel do alimento como disseminador de listeriose (James et al., 1985). No surto de Massachusetts, 49 pacientes adquiriram listeriose e 14 (29%) morreram. De 40 isolados de *L. monocytogenes* disponíveis para testes, 32 pertenciam ao sorotipo 4b (Fleming et al., 1985). Este sorotipo é responsável por 33 a 50% dos casos esporádicos de listeriose ao redor do mundo e por todos os principais surtos já descritos (Rocourt e Cossart, 1997).

No caso específico do surto de Massachusetts, não foi encontrada nenhuma evidência de falha na pasteurização do leite na indústria. Levantou-se a hipótese de que *L. monocytogenes* poderia não ser destruída pela pasteurização (Bradshaw et al., 1985). Entretanto, vários estudos já comprovaram que a pasteurização rápida do leite, 72 a 75 °C por 15 a 20 segundos é adequada para destruir este patógeno no leite integral (Bradshaw et al., 1989; Farber et al., 1988; Mackey e Bratchell, 1989). O importante trabalho de Bradshaw et al. (1985), que estudou a termorresistência desta bactéria durante dois anos, demonstrou que 71,7 °C por 15 segundos foi o binômio tempo/temperatura suficiente para inativar *L. monocytogenes* em leite cru contaminado com 15 log deste microrganismo.

A taxa de prevalência de *L. monocytogenes* no leite varia muito entre os diversos estudos e pode ser influenciada por vários fatores, tais como região geográfica, estação do ano, tamanho da fazenda, número de animais na propriedade e manejo sanitário (Rohrbach et al., 1992). O consumo de leite cru ou submetido ao tratamento térmico inadequado tem sido associado a vários surtos de DTA causados por *L. monocytogenes* (Fleming et al., 1985; Linnan et al., 1988; Dalton et al., 1997).

Devido à gravidade das infecções produzidas, principalmente em grupos de risco, vários países têm adotado uma política exigente para controle de *L. monocytogenes* em alimentos (Carvalho, 2003).

Figueiredo (2000) avaliou a ocorrência do gênero *Listeria* na linha de processamento de leite pasteurizado. Neste estudo, coletaram-se amostras de leite cru e pasteurizado, ambiente, água, embalagem, equipamentos e utensílios. De acordo com os seus resultados, verificou-se que, das 260 amostras analisadas, espécies do gênero *Listeria* foram isoladas em 39 amostras (15%), sendo 19 (7,3%) amostras positivas para *L. monocytogenes*.

Jayarao e Henning (2001), ao avaliarem 131 amostras de leite cru, pesquisaram a presença de vários patógenos no leite, entre eles *L. monocytogenes*. Seus resultados demonstraram que seis amostras apresentaram-se positivas para este patógeno. Contaminação fecal pode ser a fonte da presença de *L. monocytogenes* no leite.

A presença de *L. monocytogenes* em leite pasteurizado foi também observada por Ahmed e Hussein (2005). Estes pesquisadores analisaram leite e creme de leite pasteurizados comercializados no Egito e detectaram este patógeno em 4% das amostras de leite pasteurizado. Nenhuma amostra de creme de leite apresentou *L. monocytogenes*. Além disso, tais autores avaliaram a termorresistência desta bactéria e detectaram que quanto mais tempo o alimento ficar em ebulição tanto menor é a contagem bacteriana. Manter o alimento em ebulição durante quatro minutos parece ser suficiente para eliminar *L. monocytogenes*.

Pesquisas realizadas por Destro et al. (1991) e Vieira (2000) evidenciaram a ocorrência de *L. monocytogenes*, respectivamente, em duas (10%) e cinco (25%) amostras de queijo industrializado, coletadas no

comércio varejista de Campinas, São Paulo. Os resultados obtidos por Oliveira (1993) demonstraram que uma (2%) amostra de queijo Minas Frescal colhida no varejo de Goiânia, Goiás, foi positiva para este microrganismo.

Allmann et al. (1995), aplicando a técnica de PCR, investigaram a presença de *L. monocytogenes* em leite cru, manteiga, queijo e iogurte produzidos a partir de leite cru. Esses autores observaram que a taxa de contaminação dos produtos lácteos por este microrganismo foi de 13%. Sendo assim, o consumo de produtos lácteos não pasteurizados pode estar associado à ocorrência de listeriose na população.

Cento e três amostras de diferentes tipos de queijos (47 tipo Minas Frescal, 32 Gorgonzola, 11 Brie, seis Camembert, três Ricota, dois Roquefort e dois Cheddar), comercializados na cidade do Rio de Janeiro, foram analisados com o objetivo de avaliar a incidência de *L. monocytogenes*. Das 103 amostras, 11 (10,7%) estavam contaminadas com *L. monocytogenes*. Das 207 amostras identificadas como *L. monocytogenes*, 59,9% pertenciam ao sorotipo 1/2a, 27,5% ao sorotipo 1/2b e 12,6% ao sorotipo 4b. Todos esses sorotipos têm sido envolvidos em surtos e casos esporádicos de listeriose de origem alimentar em diversos países (Silva, 1997).

Hofer et al. (2000) fizeram um levantamento das espécies de *Listeria* e os sorotipos mais prevalentes no Brasil, em 3.112 amostras de *Listeria* isoladas de diferentes fontes: 247 (9%) do homem; 239 (7,6%) de animais; 2.330 (74,8%) de alimentos; 296 (9,5%) do ambiente. As bactérias eram provenientes de diferentes regiões do país e foram coletadas durante o período de 1971 a 1997. As seguintes espécies foram identificadas no estudo: *L. innocua* (2269 – 72,9%), *L. monocytogenes* (774 – 24,8%), *L. seeligeri* (37 – 1,1%), *L. welshimeri* (22 – 0,7%), *L. grayi* (9 – 0,2%) e *L. ivanovii* (1 – 0,03%).

L. monocytogenes foi representada por dez sorotipos, sendo o 4b (352 – 11,3%) o mais prevalente, seguido por 1/2a (162 – 5,2%) e 1/2b (148 – 4,7%).

De acordo com Nichols et al. (1997), 16 (1%) de um total de 1.437 amostras de queijos frescos comercializados na Inglaterra e País de Gales foram positivas para *L. monocytogenes*. *Listeria* spp. também foi isolada de 51 (4%) amostras. Entretanto, todas as amostras positivas para *Listeria* apresentaram contagens inferiores a 10^2 UFC g⁻¹.

No estudo de Silva et al. (1998a), os quais avaliaram amostras de vários tipos de queijos comercializados no mercado varejista do Rio de Janeiro, quanto à presença de *Listeria* spp, observou-se que, das 103 amostras analisadas, 11 (10,68%) estavam contaminadas por *L. monocytogenes*. A maior incidência do patógeno (41,17%) foi observada em queijos Minas Frescal fabricados artesanalmente. Os queijos Minas Frescal industrializados apresentaram-se bem menos contaminados (3,03%). Mais uma vez evidencia-se a necessidade da pasteurização do leite para diminuir o risco de DTA.

Em estudo conduzido por Carvalho (2003), verificou-se a presença de *L. innocua* em três amostras de queijo Minas Frescal fabricado com adição de coalho láctico (acidificação direta). De acordo com o mesmo autor, a presença de *L. innocua*, em queijos obtidos por processamento com cultura láctica, indica a possibilidade da ocorrência de *L. monocytogenes* em queijos submetidos ao mesmo tipo de processamento. Silva et al. (1999a) também isolaram *L. innocua* no processamento de queijo Minas Frescal. Neste estudo, 11,1% das amostras de leite cru de um laticínio estavam contaminadas com este microrganismo.

Brigido et al. (2004), analisando amostras de queijo Minas Frescal comercializadas em cidades do interior do Estado de São Paulo, detectaram a presença de *L. monocytogenes* em uma (4,5%) amostra.

Elevada incidência de *L. monocytogenes* em queijos Minas Frescal foi observada por Silva et al. (2004a), na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul. Os resultados evidenciaram que 26,7% das amostras estavam contaminadas. Tais resultados, em virtude da elevada incidência, implicam em risco para a população, uma vez que o queijo é consumido pelo consumidor sem que se realize mais nenhum tipo de tratamento térmico.

A ocorrência de *Listeria* spp. em pontos críticos de controle e no ambiente de processamento de queijo tipo Minas Frescal em dois laticínios na Bahia foi determinada por Silva et al. (2003). Neste estudo os autores observaram que, na fabricação deste tipo de queijo, os pontos críticos de controle incluem a recepção do leite cru, a pasteurização, a coagulação e a estocagem do produto acabado. Em uma das fábricas, *L. monocytogenes* foi isolada de amostras de leite cru (16,7%) e de amostras do chão da sala de refrigeração dos queijos (14,3%). Dois sorotipos, 4b e 1/2a, foram observados entre as amostras de *L. monocytogenes* isoladas.

Kells e Gilmour (2004) monitoraram, durante um ano, dois laticínios, na Irlanda. A incidência de *Listeria* nos equipamentos foi de 18,8% (6,3% *L. monocytogenes*), no ambiente foi de 54,7% (40,6% *L. monocytogenes*) e no leite cru de 44,4% (22,2% *L. monocytogenes*). Em uma ocasião, *L. welshimeri* foi isolada de leite pasteurizado, provavelmente demonstrando contaminação pós-pasteurização.

Rocha (2005) realizou um estudo da presença de *L. monocytogenes* em indústria processadora de queijo Minas Frescal.

Foram analisados 20 queijos Minas Frescal, 120 amostras de superfície do ambiente após o processamento dos produtos, além de 10 amostras entre leite cru e pasteurizado. Neste estudo, não se isolou *L. monocytogenes*. No entanto, a ocorrência e disseminação de quatro outras espécies do gênero (*L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimerii* e *L. grayi*) nos vários pontos da linha de produção indicam a potencialidade da ocorrência de *L. monocytogenes*.

Uma das vias de contaminação de queijos por patógenos consiste na salmoura utilizada durante a fabricação. A contaminação da salmoura ocorre, sobretudo, quando o queijo é fabricado a partir de leite cru, ou quando a pasteurização é realizada de maneira inadequada, ou pela contaminação da matéria-prima após a pasteurização. Uma vez contaminada a salmoura, outros lotes de queijos que passem por esta podem ser contaminados. *L. monocytogenes* é capaz de sobreviver longos períodos em salmouras típicas de queijos (Larson et al., 1999).

Outros estudos realizados no Brasil (Casarotti et al., 1994; Corbia et al., 1999; 2001; Peresi et al., 2001; Sá, 2003) não detectaram a presença de *L. monocytogenes* em amostras de queijo Minas Frescal, expostas à venda no comércio de Piracicaba – SP, Rio de Janeiro – RJ, São José do Rio Preto – SP e Uberlândia – MG, respectivamente. Padilha et al. (2001) também não isolaram *L. monocytogenes* de 50 amostras de leite cru e 250 amostras de leite pasteurizado comercializadas no Recife – PE.

Outros produtos de origem animal também podem ser veiculadores de *Listeria* spp. e podem também representar risco para a saúde pública. Embora as carnes frescas apresentem, geralmente, baixas contagens de *L. monocytogenes*, à medida que aumenta seu grau de processamento, aumenta o risco de contaminação (Jay, 1996). Por esse motivo, diversos derivados cárneos têm sido

envolvidos tanto em surtos de listeriose quanto em casos esporádicos da enfermidade (Rocourt e Cossart, 1997).

Silva et al. (2004b) investigaram amostras de lingüiça frescal em frigoríficos, sob inspeção estadual, de Pelotas, Rio Grande do Sul, e observaram que 100% das amostras estavam contaminadas com *Listeria* spp. *L. innocua* foi isolada com maior frequência, em 96,7% das amostras, seguida por *L. monocytogenes* em 29,3% e *L. welshimerii* em 24,4%. A presença destes microrganismos nas amostras analisadas, em especial no produto final, demonstra a necessidade de readequação nas práticas de limpeza e sanificação das plantas de processamento analisadas, bem como representa risco potencial de listeriose ao consumidor. A ocorrência de *L. monocytogenes* em lingüiças do tipo frescal, no Brasil, também foi relatada por Destro (1990), que isolou o patógeno em 80% das amostras coletadas em São Paulo, e por Silva (1996), em Contagem, Minas Gerais, que encontrou este microrganismo em 6,6% das lingüiças de carne suína e de frango.

Na Espanha, foi observada alta incidência de *L. monocytogenes* em carne de frango crua, havendo 36,1% de amostras positivas. Apesar da alta incidência do patógeno, neste caso, este tipo de produto apresenta baixo risco de transmissão de listeriose, visto que, geralmente, passa por alto aquecimento antes de ser consumido (Vitas et al., 2004).

O interesse pela identificação de *Listeria* em alimentos, particularmente por *L. monocytogenes*, vem se intensificando desde a década de 1980, em função dos vários surtos e casos esporádicos de listeriose de origem alimentar ocorridos no Canadá, EUA e Europa. Dessa forma, uma grande variedade de métodos bacteriológicos, incluindo meios de culturas, foram propostos, objetivando acelerar o rastreamento de *L. monocytogenes* nos mais diversos tipos de alimentos (Buchanan et al.,

1989; Dominguez-Rodriguez et al., 1988; Curts et al., 1989; Destro et al., 1992; Hayes et al., 1992; Yu et al., 1995; Furlanetto et al., 1996).

A variedade de protocolos existentes para a pesquisa de *L. monocytogenes* em alimentos e outras amostras de interesse para a indústria de alimentos é muito grande, o que dificulta a escolha daquele que possa apresentar melhores resultados. Os protocolos recomendados nas metodologias tradicionais envolvem vários caldos de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo, assim como plaqueamento em meios de isolamento seletivo, alguns deles muito inibitórios, de execução laboriosa e lenta, além de não apresentarem sensibilidade para detectar pequenos números do microrganismo em alimentos contaminados (Almeida e Almeida, 2003; Rodrigues et al., 2003). Dentre os métodos convencionais para detecção e isolamento de *L. monocytogenes*, destacam-se os recomendados pelo *U. S. Department of Agriculture* (USDA), pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e pelo *Health Protection Branch* do Canadá (Lovett, 1988).

Contudo, não há um consenso em relação ao melhor método para a detecção de *L. monocytogenes* em alimentos, visto que vários métodos já foram propostos por diferentes organizações. Os vários procedimentos especificam um período total de enriquecimento de 48 horas; porém, eles diferem quanto ao tipo de meio de enriquecimento (meio seletivo ou não seletivo) e os meios seletivos em placas (Martin et al., 1984; Donnelly e Baigent, 1986; Doyle e Schoeni, 1986; Lovett et al., 1987; Pini e Gilbert, 1988; Silva et al., 1998b; Pinto et al., 2001; Almeida e Almeida, 2003; Rodrigues et al., 2003). Independentemente do método usado, a identificação microbiológica positiva de *L. monocytogenes* pode demorar de sete a 12 dias, quando a confirmação presuntiva é

realizada bioquimicamente (Rijpens e Herman, 2004).

A política de tolerância zero para *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo, aliada à obrigatoriedade da aplicação do sistema de Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle (APPCC) nos estabelecimentos processadores de alimentos em nível universal, inclusive no Brasil, apontam a necessidade de métodos rápidos, sensíveis, de baixo custo, simples e de fácil interpretação para detecção específica de *L. monocytogenes* (Brasil, 1993; Brasil, 1998; Almeida e Almeida, 2003).

Vários métodos rápidos, em que a etapa de enriquecimento foi modificada e a identificação bioquímica foi substituída por técnicas imunológicas ou moleculares, foram desenvolvidos e comercializados com intuito de acelerar o diagnóstico de *L. monocytogenes* em alimentos, sobretudo produtos lácteos (Notermans et al., 1991; Hill, 1996; Jersek et al., 1996; Sheu et al., 1998; Manzano et al., 1998; Pimenta et al., 1999; Peng e Shelef, 2000; Hudson et al., 2001; Pelisser et al., 2001; Mereghetti et al., 2002; Aznar e Alacón, 2003; Koo e Jaykus, 2003). Alguns desses métodos podem reduzir o tempo de análise e diagnóstico para apenas 55 horas (Fluit et al., 1993). Entretanto, vários estudos têm demonstrado que o uso de vários procedimentos de enriquecimento aumenta a taxa de isolamento de *Listeria* nos alimentos (Duarte et al., 1999; Pritchard e Donnelly, 1999; Donnelly, 2002).

Sendo assim, Rijpens e Herman (2004), para verificar qual é o procedimento mais adequado para isolar *L. monocytogenes* de queijos, realizaram um estudo comparando métodos de enriquecimento, associando-os à técnica de PCR. Estes pesquisadores observaram que os resultados dependeram do tipo de queijo analisado. Para queijos frescos, como Minas Frescal, os melhores resultados foram obtidos com o

procedimento de enriquecimento seletivo completo.

Ultimamente, técnicas moleculares têm sido utilizadas para detecção de *L. monocytogenes* em alimentos, sobretudo em produtos lácteos. Zeng et al. (2006) utilizaram uma reação de PCR para detecção deste patógeno no leite. As vantagens dessa técnica incluem: resultado rápido, detecção de $1,45 \times 10^0$ UFC mL⁻¹ e possibilidade de detecção de *L. monocytogenes* diretamente do leite, sem necessidade de pré-enriquecimento.

Para prevenir a presença de *L. monocytogenes* em leite e derivados é importante a adoção de boas práticas agropecuárias, boas práticas de fabricação e aplicação de conceitos de programas de controle de qualidade total na indústria de laticínios (Silva et al., 2003). Algumas medidas alternativas já foram atestadas para controlar o crescimento de *L. monocytogenes* em alimentos. A adição de cultura de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* produtora de bacteriocina foi empregada, com sucesso, no controle de crescimento deste patógeno em queijos Cheddar (Zottola et al., 1994; Buyong et al., 1998).

A população em expansão de pessoas altamente susceptíveis à *L. monocytogenes* (portadores do vírus HIV e pacientes submetidos a terapia com imunossupressores) associada à alta prevalência do patógeno em alimentos fazem com que sejam necessárias medidas de controle, prevenção e redução do risco de listeriose. Para tanto, é necessário estabelecer procedimentos de controle em diferentes pontos na cadeia de produção de alimentos, e aumentar a amostragem durante o processamento e a distribuição dos alimentos. Em adição, em virtude da livre circulação de alimentos entre diferentes países, parece lógico adotar uma política similar nas agências reguladoras de cada país, principalmente no que diz respeito às

metodologias de pesquisa e níveis de tolerância para *L. monocytogenes* em alimentos. Recentemente, o *Codex Alimentarius* preparou um documento que inclui considerações sobre metodologia e riscos deste microrganismo em alimentos, a fim de uniformizar os critérios em todo o mundo (Vitas et al., 2004).

2.4 *Salmonella* spp.

O primeiro relato de associação de infecção intestinal no homem com *Salmonella* ocorreu no início do século XVIII, o qual, posteriormente, foi identificado como um caso de febre tifóide. Mais tarde, estudos realizados na Europa permitiram o isolamento e a caracterização do bacilo causador da febre tifóide e o desenvolvimento de testes sorológicos para a detecção deste grave agente causador de infecção no homem, identificando-o como *Salmonella* (D'Aoust, 1997).

Salmonella spp. é uma bactéria Gram negativo, aeróbia e anaeróbia facultativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. A maioria das espécies de *Salmonella* é móvel, pela presença de flagelo, porém há espécies imóveis, como, por exemplo, *Salmonella pullorum* e *S. gallinarum*. Esta bactéria cresce bem a 37 °C e metaboliza a glicose e outros açúcares, produzindo ácido e gás. É oxidase negativa e catalase positiva, utiliza citrato como única fonte de carbono, geralmente produz ácido sulfídrico e não hidrolisa a uréia. Usualmente, *Salmonella* produz ácido e gás a partir da glicose presente no meio TSI (*triple sugar iron*) e reação alcalina a partir da descarboxilação da lisina à cadaverina no meio LIA (*lysine iron agar*). Atualmente, 2.375 sorotipos de *Salmonella* são reconhecidos (D'Aoust, 1997).

Salmonella é ubíqua no ambiente e presente também em indústrias processadoras de

carne, sobretudo de suíno e aves, uma vez que essas espécies consistem nos principais reservatórios desta bactéria, pois são portadores sãos. Esta bactéria habita o trato gastrointestinal de todos os mamíferos de sangue quente, inclusive o homem. Produtos de origem animal crus, assim como outros alimentos, frutas e vegetais, particularmente aqueles susceptíveis à contaminação fecal, também são importantes veiculadores de *Salmonella*. Esta bactéria é incapaz de sobreviver à pasteurização; assim, os produtos lácteos se contaminam como resultado de contaminação pós-pasteurização (Bradshaw et al., 1987).

Salmonella enterica ssp. *enterica* sorotipo Dublin causa infecção em bovinos de todas as idades e já foi isolada de rebanhos em todo mundo (Walker, 1995). Esta bactéria foi isolada de rebanhos leiteiros na Dinamarca, presente tanto nas fezes dos animais quanto no leite. Sendo os animais portadores sãos desta bactéria, há o risco da presença dela nos seus produtos, como carne e leite. Casos no homem são incomuns, mas pessoas acometidas podem apresentar sintomas graves, culminando, inclusive, com a morte (Li et al., 1999). Dessa forma, evitar o consumo de produtos de origem animal crus é importante para prevenir a contaminação por *Salmonella* (Wedderkopp et al., 2001).

Salmonella é a principal causa de DTA de origem bacteriana nos EUA, sendo responsável por 800.000 a quatro milhões de casos de infecções no homem, a cada ano. Aproximadamente 25% dos casos de salmonelose reportados ao Centro de Controle de Doenças (CDC) são atribuídos ao sorotipo Typhimurium (Cody et al., 1999). A ocorrência de salmonelose nos EUA, desde 1962, cresce cerca de 40.000 casos por ano (Chalker e Blaser, 1988; Cody et al., 1999).

A salmonelose é caracterizada pela ocorrência dos seguintes sintomas: febre,

diarréia e vômito. O período de incubação varia, em média, de 24 a 48 horas. A taxa de mortalidade de infecção por *Salmonella* é baixa, entretanto pode ser mais alta em crianças e idosos (Bradshaw et al., 1987).

Jayarao e Henning (2001) pesquisaram a presença de *Salmonella* em 131 amostras de leite cru. Seus resultados demonstraram que oito amostras apresentaram-se positivas para este patógeno. Os isolados de *Salmonella* pertenciam aos grupos D (4), B (2), C (1) e E (1), os quais já foram identificados como importantes causas de doenças em bezerros, vacas e no homem.

Vários surtos pelo consumo de produtos lácteos pasteurizados contaminados com *Salmonella* spp. já foram relatados (Johnson et al., 1990). D'Aoust et al. (1985) relataram surto de salmonelose pelo consumo de queijo Cheddar no Canadá e Ryan et al. (1987) relataram a ocorrência de surtos pela mesma bactéria pelo consumo de leite pasteurizado. Outro surto importante envolvendo leite pasteurizado ocorreu em Chicago, EUA, em 1985. Neste surto, mais de 23.000 casos foram confirmados laboratorialmente e 10% dos pacientes desenvolveram artrite como seqüela da salmonelose (Donnelly, 1990).

A importância do leite pasteurizado como fonte de salmonelose ainda não foi determinada. Nos EUA, de 1960 a 2000, 12 surtos de DTA foram associados ao consumo de leite pasteurizado. Desses 12 surtos, sete tiveram como causa da presença do patógeno no leite, a contaminação pós-pasteurização e cinco surtos foram causados por *Salmonella* (Olsen et al., 2004).

Olsen et al. (2004) também relataram surto de toxinfecção alimentar pelo consumo de leite pasteurizado, no estado da Pensilvânia, EUA, tendo como causa *Salmonella enterica* ssp. *enterica* sorotipo Typhimurium, um dos sorotipos mais comuns de *Salmonella*. Neste surto, 93 pessoas (76 do Estado da

Pensilvânia e 17 do Estado de Nova Jersey) apresentaram sintomas de salmonelose e foram constatadas como portadores da bactéria. O leite consumido pelos acometidos foi proveniente de um laticínio que beneficiava leite cru de 59 fazendas do estado da Pensilvânia e foi contaminado após a pasteurização. Durante o estudo epidemiológico do surto, observou-se que a indústria apresentava condições higiênic-sanitárias inadequadas, tais como excesso de umidade e condensação na sala de beneficiamento e estocagem do leite pasteurizado. Essas condições, neste caso, podem ter favorecido a contaminação do leite após o tratamento térmico.

De Buysler et al. (2001) realizaram um levantamento sobre as implicações do leite e derivados em surtos de toxinfecções alimentares na França e em mais sete países desenvolvidos (Canadá, Dinamarca, Escócia, EUA, Holanda, Suécia, Inglaterra e País de Gales). Neste estudo, os autores consideraram quatro patógenos: *Salmonella* spp., *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli*. Eles observaram que o leite e derivados são responsáveis por um a cinco por cento do total de surtos causados por bactérias. De um total de 60 surtos estudados, *Salmonella* spp. foi responsável por 29 surtos, sendo o principal patógeno associado a DTA.

A emergência de *Salmonella* var. Typhimurium DT 104 tem preocupado os órgãos responsáveis pela saúde humana e animal, devido a sua resistência cromossomal para, pelo menos, cinco antimicrobianos: ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamidas e tetraciclina. Leite cru, seus derivados e infecções do gado leiteiro têm sido implicados em casos de infecções humanas, que são associadas às maiores taxas de hospitalização e de mortalidade (Cody et al., 1999; Villar et al., 1999).

Dois surtos envolvendo *Salmonella* var. Typhimurium DT 104 e associados ao

consumo de queijo produzido a partir de leite cru, na Califórnia, EUA, foram relatados por Cody et al. (1999). Estes autores observaram que, no surto um, 31 pacientes, os quais consumiram queijo tipo Mexicano, foram confirmados, laboratorialmente, como portadores de *Salmonella* Typhimurium DT 104. Durante o surto dois, a mesma bactéria foi isolada de 79 pessoas que consumiram queijo Mexicano adquirido de vendedores ambulantes ou que consumiram leite cru.

Villar et al. (1999) também estudaram um surto de DTA envolvendo *Salmonella* var. Typhimurium DT 104 pelo consumo de queijo produzido a partir de leite cru, no estado de Washington, EUA. O surto ocorreu em 1997, havendo a confirmação de 54 casos de infecção por este patógeno. A idade média dos pacientes era de quatro anos e 91% deles eram de origem hispânica. Eles reportaram sintomas tais como diarreia, dor abdominal, febre e vômitos, sendo que cinco pacientes necessitaram de hospitalização. Setenta e sete por cento dos pacientes relataram o consumo, sete dias antes, de queijo Mexicano, o qual é produzido a partir de leite cru. Mais uma vez pode-se observar que casos de salmonelose podem estar vinculados ao consumo de leite e derivados não pasteurizados.

Salmonella spp. pode ser transferida para os queijos pela salmoura. A presença de proteína e outros compostos nitrogenados advindos dos queijos na salmoura parecem aumentar a sobrevivência microbiana. Pesquisas já mostraram que a salmoura pode conter diversos tipos de microrganismos (Ingham et al., 1997). Sendo assim, a sobrevivência, por várias semanas, de *Salmonella* Typhimurium em salmouras típicas de queijos também já foi atestada (Ingham et al., 2000).

Apesar de *Salmonella* ser um importante patógeno causador de toxinfecções alimentares em todo o mundo, no Brasil

vários estudos que investigaram este patógeno em leite e derivados não o encontraram. Corbia et al. (1999) analisaram queijo Minas Frescal comercialmente disponíveis para consumo no Estado do Rio de Janeiro; Pereira et al. (1999) analisaram amostras de queijos tipo Minas (frescal e padrão) com e sem registro no Serviço de Inspeção Federal (SIF) e vendidos em Belo Horizonte, Minas Gerais; Tinoco et al. (2002), os quais avaliaram leites pasteurizados produzidos em Minas Gerais; Almeida e Franco (2003), os quais avaliaram queijos tipo Minas Frescal comercializados no Rio de Janeiro; Barros et al. (2004), que avaliaram amostras de queijo Minas Frescal comercializadas na cidade do Rio de Janeiro; Brigido et al. (2004) avaliaram amostras de queijo Minas Frescal em cidades do interior do Estado de São Paulo; Bricio et al. (2005), os quais avaliaram leites pasteurizados comercializados no Rio de Janeiro; Gusmão et al. (2005), que, em seu estudo, analisaram amostras de leites pasteurizados comercializados em região do Estado de São Paulo; e Macedo e Pflanzler Júnior (2005) que, por sua vez, analisaram a qualidade microbiológica de leites pasteurizados comercializados na região metropolitana de Curitiba, Paraná, em nenhum desses trabalhos, *Salmonella* spp foi isolada de produtos lácteos.

Por outro lado, Peresi et al. (2001) analisaram amostras de queijos Minas Frescal comercializados em feiras livres e supermercados da cidade de São José do Rio Preto, São Paulo e identificaram *Salmonella* spp. em duas amostras produzidas artesanalmente.

Um dos métodos mais eficientes para detecção e identificação de *Salmonella* em amostras provenientes de animais, do homem e de alimentos é a técnica de PCR em tempo real. Após a identificação do patógeno, é importante realizar a fagotipagem da *Salmonella*, a fim de se conhecer exatamente qual é o sorotipo

envolvido. Para tal, a eletroforese em campo pulsado (PFGE) consiste em uma excelente técnica (Liebana et al., 2002).

É bastante claro que a ocorrência de salmonelose na cadeia de alimentos em todo o mundo é corrente e sua repercussão em saúde pública consiste em uma causa importante. Ao menos que mudanças significativas nas práticas agropecuárias sejam implementadas, a ocorrência de toxinfecções alimentares tendo como causa *Salmonella* deve continuar (D'Aoust, 1997).

2.5 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* apresenta 35 espécies e 17 subespécies, sendo *S. aureus* a espécie típica e o principal patógeno do gênero (Bannerman, 2003). Esta bactéria é classificada como cocos, normalmente ocorre em cachos similares aos de uva (podem aparecer aos pares ou em cadeias curtas), é Gram-positiva, imóvel e não esporulada. É aeróbia e anaeróbia facultativa, catalase positiva, geralmente oxidase negativa, fermenta carboidratos, e pode produzir enterotoxinas (Barrow e Feltham, 1993; Bannerman, 2003; Germano e Germano, 2003). Ela é considerada uma das mais resistentes bactérias patogênicas não formadoras de esporos, inclusive no que diz respeito à resistência a antimicrobianos (Barrow e Feltham, 1993; Jablonski e Bohach, 1997; Germano e Germano, 2003; Rapini et al., 2004).

As exigências nutricionais de *S. aureus* são poucas, cresce bem nos meios de cultura comuns como o caldo e ágar simples. As bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são tolerantes a concentrações de 10% a 20% de NaCl e também a nitratos, permitindo assim seu crescimento em alimentos curados (Murray et al., 1998; Corbia et al., 2000). *S. aureus* é uma bactéria mesófila, multiplica-se entre 7

°C e 48 °C, sendo 37 °C a temperatura ótima de crescimento. Suas enterotoxinas são produzidas entre 10 °C e 48 °C; contudo, a faixa de 40 °C a 45 °C é considerada ótima para seu desenvolvimento (Bergdoll, 1989). As faixas de pH e atividade de água (Aa) suportadas pela bactéria e toxina são amplas, sendo o pH ótimo de 7 a 7,5 e é o agente patogênico bacteriano mais resistente com relação a Aa diminuída (Adams e Motarjemi, 2002). Em geral, os casos de toxinfecção alimentar são provocados por alimentos que permaneceram nesse intervalo de temperatura por tempo variável. Em condições ótimas, as enterotoxinas tornam-se evidentes em quatro a seis horas (Franco e Landgraf, 2004).

A toxinfecção alimentar é causada pela ingestão da toxina previamente formada no alimento contendo *S. aureus* (Carmo et al., 1995; Carmo et al., 1996; Carmo, 1997; Jablonski e Bohach, 1997; Forsythe, 2002; Trabulsi et al., 2002; Sant'ana e Azeredo, 2005). Em condições favoráveis, o microrganismo multiplica-se no alimento, produzindo as enterotoxinas sem que seja alterada significativamente a cor, o aroma e o sabor (Santos, 1997). Até o momento, são conhecidos 19 tipos de enterotoxinas estafilocócicas (SE). Existem cinco tipos clássicos principais, SEA, SEB, SEC, SED, SEE, e novas SE ou superantígenos semelhantes à SE, como SEG a SEU (Chiang et al., 2008).

Essas toxinas são proteínas de baixo peso molecular, altamente termoestáveis e resistentes à cocção ou a enzimas proteolíticas, permanecem ativas nos alimentos tornando-se um risco em potencial para a saúde do consumidor e um problema para a saúde pública (Carmo, 1997; Carmo et al., 2002; Forsythe, 2002; Rapini et al., 2005). Uma dose de toxina menor que 1,0 µg/kg em alimentos contaminados pode produzir sintomas de toxinfecção por *Staphylococcus*. Esta quantidade é produzida quando a contagem de células ultrapassa de

10⁵ UFC por grama de alimento (Forsythe, 2002).

Apesar de muitos autores afirmarem que somente as espécies de *Staphylococcus* produtoras da enzima coagulase sejam capazes de produzir enterotoxinas (Pereira et al., 2001); atualmente, acredita-se que outras espécies de *Staphylococcus* também sejam capazes de produzir enterotoxinas, tanto as espécies coagulase positivas quanto as espécies coagulase negativas (Orden et al., 1992; Anunciação et al., 1994; Carmo et al., 2002; Lamaita et al., 2005; Rapini et al., 2005). Veras et al. (2008) desenvolveram um importante trabalho analisando *S. aureus* coagulase negativos isolados de produtos lácteos. Estes autores observaram que, entre oito isolados de *S. aureus* coagulase negativos analisados, cinco apresentaram genes que codificam enterotoxinas.

Além das enterotoxinas, as amostras de *S. aureus* produzem várias outras toxinas, como a α -toxina, β -toxina, δ -toxina, γ -toxina, estafiloquinases e toxina do choque tóxico; no entanto, apenas as enterotoxinas têm interesses em alimentos. De um modo geral, estima-se entre 0,015g e 0,375g de enterotoxina por quilo de peso corpóreo a quantidade mínima necessária para causar sintomatologias nos indivíduos. Essas enterotoxinas apresentam várias ações: emética, diarreica e entérica (Franco e Landgraf, 2004).

Outro fator de virulência do *S. aureus* é a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1). A síndrome do choque tóxico pode ser causada por várias toxinas que atuam como superantígenos, os quais são proteínas que ativam fortemente os linfócitos T. A ativação dos linfócitos T, por sua vez, causa a liberação de mediadores que são responsáveis pelos sintomas. A doença causada pela TSST-1 é aguda e caracteriza-se por febre alta, hipotensão e envolvimento de três ou mais órgãos sistêmicos e choque letal. Essa síndrome foi

descrita pela primeira vez em 1978, relacionada a infecções graves por *S. aureus* em crianças (Chesney, 1989; Parsonnet et al., 1996; Santos, 2003).

A produção de toxina da síndrome do choque tóxico, assim como de outras enterotoxinas, SEA, SEB, SEC e SED, foi determinada em amostras de *S. aureus* isoladas de leite proveniente de vacas com mastite no Estado de Minas Gerais. A verificação da produção de toxinas foi feita pela técnica de sensibilidade ótima em placa e das 127 amostras testadas, 60 (47%) eram produtoras de TSST-1 e 54 (43%) produtoras de SE (Cardoso et al., 2000).

A ausência de *S. aureus* nem mesmo a sua presença em pequeno número são garantia de que o alimento seja seguro, pois condições desfavoráveis para a sobrevivência desse microrganismo podem resultar em uma diminuição de sua população ou morte da célula microbiana, mas se quantidades suficientes de enterotoxinas já tiverem sido formadas, elas permanecem para induzir um quadro de intoxicação alimentar estafilocócica (Michelin, 2006).

Além do homem, outros animais podem também ser portadores de *Staphylococcus*. No caso particular dos bovinos, as mastites estafilocócicas em alguns casos têm origem em amostras humanas (Pereira et al., 1999; Assumpção et al., 2003; Hata et al., 2006). *S. aureus* é um dos principais agentes etiológicos de mastite bovina, é isolado de casos clínicos e subclínicos da doença, e contamina o leite na sua obtenção (Watts, 1988; Matsunaga et al., 1993; Booth, 1995; Bramley et al., 1996; Brito et al., 1999; Silva et al., 2000). Além disso, é um patógeno contagioso, que resiste à antibioticoterapia e persiste por longos períodos sem provocar sintomas. Por esta razão, o controle da mastite causada por *S. aureus* é muito difícil. Investigações epidemiológicas sobre a origem da infecção são importantes para

prevenir a proliferação do microrganismo e a sua presença no leite cru (Hata et al., 2006).

S. aureus apresenta distribuição mundial. Estima-se que 20% até 60% dos indivíduos possam ser portadores da bactéria, sem manifestar qualquer sintoma. Desta forma, representam risco ao lidarem com alimentos, pois podem contaminá-los durante as fases de preparação, por meio das mãos e da secreção oronasal (Raddi et al., 1988; Germano e Germano, 2003). Estudos já isolaram *S. aureus* de manipuladores de alimentos, superfícies e ar de ambiente de indústrias de laticínios (Iaria et al., 1980; Araújo-Arantes et al., 1982a; Araújo-Arantes et al., 1982b; Raddi et al., 1988; Brabes, 2005). Estudos epidemiológicos de surtos de intoxicação estafilocócica têm apontado os manipuladores como a principal fonte de contaminação do alimento (Pereira et al., 1999; Assumpção et al., 2003).

A presença de *S. aureus* em alimentos processados indica contaminação pós-processamento, proveniente da contaminação de manipuladores (Michelin, 2006). A não utilização de luvas ou a sanitização inadequada das mãos e antebraços podem ser os motivos das elevadas contagens deste microrganismo no produto alimentício (Assumpção et al., 2003).

Os equipamentos e os utensílios utilizados na preparação dos alimentos também podem atuar como fontes de contaminação, quando o patógeno for transferido de alimentos crus para equipamentos e esses não forem limpos de maneira adequada para posterior utilização (Adams e Motarjemi, 2002).

Muitos tipos de alimentos já foram epidemiologicamente investigados e relatados como capazes de suportar o desenvolvimento de *S. aureus* e a produção de enterotoxinas e este microrganismo não causa alteração das características

organolépticas do alimento (Sena, 2000). Dentre os substratos alimentícios podem ser destacados produtos lácteos (queijos, leite cru, pasteurizado e em pó, manteiga e sorvetes), produtos de confeitaria (tortas, bolos recheados e doces cremosos), carnes frescas e curadas, ovos e massas alimentícias (Pereira et al., 2001; Shimamura et al., 2006).

Os padrões microbiológicos para queijos de alta umidade, como é o caso do queijo Minas Frescal, são determinados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e pelo Regulamento Técnico Geral para fixação dos requisitos microbiológicos de queijos do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1996). Estes padrões microbiológicos foram estabelecidos de acordo com critérios e planos de amostragem para aceitação de lotes da Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas dos Alimentos (I.C.M.S.F). Os métodos analíticos especificados respondem à metodologia internacionalmente aceita. A legislação brasileira permite valor máximo de *S. aureus* nesses queijos de 10^3 UFC g⁻¹ (Brasil, 1996; 2001).

O isolamento de *S. aureus* em leite e em outras fontes em propriedades leiteiras foi realizado por Silva et al. (1999b), na região Sul do Estado do Rio Grande do Sul. Estes pesquisadores observaram a ocorrência de *S. aureus* em 41,5% e 50% das amostras provenientes de propriedades com ordenha mecânica e com ordenha manual, respectivamente. As amostras de mãos de ordenhadores apresentaram positividade de 26,3%, as de ordenhadeiras mecânicas de 15,8% e as amostras de tubulações de ordenhadeiras de 10%.

Outros autores também relataram a presença de *S. aureus* em leite e derivados, inclusive em produtos pasteurizados, e contestam sobre a qualidade desses produtos no Brasil (Câmara et al., 2002; Cardoso e Araújo,

2004; Lamaita et al., 2005; Macedo e Pflanzler Júnior, 2005; Santana et al., 2006). Cordeiro et al. (2002) avaliaram amostras de leite pasteurizado comercializadas no Estado do Rio de Janeiro e encontraram 83,4% de amostras positivas para *S. aureus*. Este patógeno também foi isolado em 10% das amostras de leite pasteurizado comercializado na região metropolitana de Curitiba, Paraná (Macedo e Pflanzler Júnior, 2005).

Lamaita et al. (2005) analisaram 80 amostras de leite cru refrigerado a 4 °C e estocado por 48 horas em tanques resfriadores de propriedades rurais do Estado de Minas Gerais quanto à contagem e identificação de *Staphylococcus* spp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas (SE) e da toxina do choque tóxico (TSST-1). Identificaram-se *S. aureus* e a produção de SEA, SEB, SEC, SED e de TSST-1, sendo que dos *Staphylococcus* enterotoxigênicos, 24,6% eram coagulase positiva e 41,3%, coagulase negativa.

A presença de *S. aureus* em queijos, sobretudo em queijos Minas Frescal é relatada por vários autores (Carmo et al., 1995; Sabioni e Maia, 1998; Almeida Filho e Nader Filho, 2000; Corbia, 2000; Corbia et al., 2002; Barros et al., 2004). Corbia (2000) analisou amostras de queijo Minas Frescal de três estados brasileiros (Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e observou que 10,56% das amostras, de cinco marcas diferentes, apresentaram positividade para *S. aureus*. Entre elas, três tinham Inspeção Federal (SIF) e duas não.

Os resultados obtidos por Almeida Filho e Nader Filho (2000), ao avaliaram amostras de queijos Minas Frescal produzidos artesanalmente e comercializados na cidade de Poços de Caldas, Minas Gerais, evidenciaram a presença de *S. aureus* em 50% das amostras, cujas contagens revelaram valores médios em tono de 10^5 UFC g⁻¹. Resultados semelhantes foram

obtidos por Loguercio e Aleixo (2001) em queijos Minas Frescal produzidos artesanalmente, comercializados em Cuiabá, Mato Grosso. Esses pesquisadores detectaram 96,67% das amostras analisadas com valores de *S. aureus* superiores a 10^3 UFC g⁻¹, estando apenas uma amostra (3,33%) em conformidade com o padrão legal.

Em outro estudo, 20% das amostras de queijo Minas Frescal analisadas por Araújo et al. (2002) estavam contaminadas por *S. aureus*, sendo que 17,7% dessas apresentavam valores acima do permitido pela legislação brasileira. A presença de *S. aureus* em 57 amostras de queijo Minas Frescal obtidas de supermercados e de indústria no estado do Rio de Janeiro foi determinada por Corbia et al. (2002). Esses autores enfatizam que a presença de *S. aureus* em quantidade superiores aos limites preconizados pela legislação sugere contaminação cruzada por meio dos manipuladores e dos equipamentos, pasteurização inadequada do leite proveniente de vacas com mastite, e / ou a combinação desses fatores.

Barros et al. (2004) isolaram *S. aureus* de amostras de queijos Minas Frescal comercializadas no Rio de Janeiro. Assim como Rocha et al. (2006), que avaliaram sete marcas de queijos Minas Frescal, também comercializadas na cidade do Rio de Janeiro, a presença de *S. aureus* foi detectada em todas as marcas avaliadas, sendo que em seis os valores estavam acima do permitido pela legislação brasileira.

Um dos tipos mais comuns de doenças de origem alimentar em todo o mundo é a toxinfecção causada por alimentos contendo enterotoxinas de *S. aureus*, doença de curso rápido, em que indivíduos afetados geralmente não necessitam de atendimento médico e a maioria dos casos não é notificada (Rodrigues et al., 2004). O início dos sintomas da enfermidade ocorre, em

média, de duas a quatro horas após a ingestão do alimento contaminado, sendo a doença normalmente autolimitante e, geralmente, os sintomas desaparecem de dois a três dias após o seu início (Su e Wong, 1997; Forsythe, 2002; Le Loir et al., 2003; Franco e Landgraf, 2004). Os principais sintomas desta toxinfecção são vômitos e diarreia, podendo ocorrer também náuseas, cólicas abdominais e sudorese. Estes sintomas, que têm curta duração, variam com o grau de susceptibilidade do indivíduo, com a concentração da enterotoxina no alimento e a quantidade ingerida (Forsythe, 2002; Bannerman, 2003; Rodrigues et al., 2004).

Sabe-se que nos serviços de saúde do Brasil existem poucos registros epidemiológicos a respeito de doenças veiculadas por alimentos. No entanto, supõe-se que as intoxicações estafilocócicas sejam muito comuns no país, visto a precariedade de saneamento básico, bem como a falta de noções básicas de higiene no ciclo produtivo dos alimentos, além da deficiência nas notificações de doenças (Fernandez, 2003; Santana et al., 2006). Considerando o número de casos dos surtos notificados de doenças transmitidas por alimentos no Estado de São Paulo em 2000, *S. aureus* também teve destaque por tipo específico de bactéria, tendo sido responsável por 1.133 casos de toxinfecções notificados (Silva Júnior, 2005).

Vários estudos demonstraram que o queijo Minas Frescal e outros produtos lácteos estiveram envolvidos em muitos casos esporádicos e surtos de toxinfecção alimentar por *S. aureus* no Brasil e em outros países (Carmo e Bergdoll, 1990; Anunciação et al., 1994; Adesiyun et al., 1998; Almeida Filho e Nader Filho, 2000; Carmo et al., 2002; Asato et al., 2003; Veras et al., 2003). Carmo e Bergdoll (1990) registraram a ocorrência de 18 surtos de toxinfecções alimentares causadas por *S. aureus* envolvendo o consumo de queijos e

bolos confeitados. Asato et al. (2003) relataram a ocorrência de um surto em Osaka, Japão, no ano de 2000, no qual foram comprovados mais de 10.000 casos de intoxicação estafilocócica pelo consumo de produtos lácteos contaminados.

Sabioni et al. (1988) identificaram a ingestão de queijo Minas contaminado com *S. aureus* como causa de surto de intoxicação alimentar em quatro pessoas de uma família, das quais duas tiveram internação hospitalar, em Ouro Preto, Minas Gerais. Além de *S. aureus*, o número de coliformes fecais excedia os padrões, confirmando o alto nível de contaminação do queijo consumido. Foram encontradas as toxinas SEA, SEB, SED e SEE, sendo 80% do tipo A.

Em outro estudo, Sabioni (1994) verificou a ocorrência de um surto de toxinfecção alimentar por *S. aureus* a partir do consumo de queijo Minas não pasteurizado, fabricado na fazenda e comercializado pelo próprio fabricante sem qualquer refrigeração. O surto atingiu 11 pessoas, das quais três foram hospitalizadas. A análise do queijo revelou níveis da ordem de 10^8 UFC g⁻¹, indicando *S. aureus* como agente causador. Foram identificadas as toxinas SEA, SEB e SED.

Dias (1995), analisando 21 surtos de toxinfecção alimentar em 11 municípios do Estado de Minas Gerais, entre 1992 e 1994, comprovaram como principal alimento envolvido o queijo Minas, incluindo o tipo Frescal. Duzentas e dezoito pessoas entre 239 expostas (91,3%) apresentaram sintomatologia característica e 49 (20,5%) foram hospitalizadas. As más condições higiênico-sanitárias dos queijos ficaram evidentes pela alta contaminação com coliformes fecais, pois 61,9% das amostras apresentaram valores entre 10^3 e 10^5 NMP g⁻¹. *S. aureus* foi encontrado em 85,7% das amostras, sendo apontado como o agente etiológico potencial dos surtos analisados,

com evidente participação da toxina pré-formada no alimento.

Silva e Castro (1995) detectaram um surto de toxinfecção alimentar na cidade de Contagem, Minas Gerais, a partir do consumo de queijo Minas, envolvendo 14 pessoas entre 15 expostas (taxa de ataque 93,3%). Nove dos acometidos ficaram hospitalizados, sendo que três deles ficaram internados por períodos de três a seis dias, sob tratamento à base de antibióticos. O curso da doença variou de três a cinco dias e o período de incubação de três horas e meia a 27 horas – média de 16:50 h. As análises microbiológicas do alimento (e das fezes das pessoas envolvidas) revelaram números elevados de *S. aureus*, fora dos padrões para queijos. Esses resultados, associados ao curto período de incubação em algumas pessoas acometidas, sugerem intoxicação estafilocócica.

Carmo et al. (2002) descreveram dois surtos de toxinfecção alimentar por *Staphylococcus* ocorridos em duas cidades do interior de Minas Gerais: Manhuaçu e Passa Quatro, em 1999. Os dois surtos envolveram 378 indivíduos. No primeiro surto (Manhuaçu), 50 indivíduos ficaram doentes pelo consumo de queijo Minas Frescal contaminado e os sintomas, os quais incluíam diarreia, vômitos e dor de cabeça, apareceram em apenas duas horas após a ingestão do queijo. O segundo surto (Passa Quatro) afetou 328 indivíduos, os quais apresentaram diarreia e vômito após o consumo de leite cru. As análises dos queijos consumidos no primeiro surto demonstraram que *S. aureus* esteve presente em quantidades de $2,4 \times 10^3$ a $2,0 \times 10^8$ UFC g⁻¹ e produziu as enterotoxinas SEA, SEB e SEC. Já a análise do leite cru indicou a presença de *Staphylococcus* coagulase negativa em quantidades que excederam $2,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ e a produção de enterotoxinas SEC e SED. As enterotoxinas específicas encontradas em cada um dos dois surtos implicam que a origem da contaminação no primeiro surto

parece ser proveniente dos manipuladores e, no segundo caso, de mastite bovina.

Foram investigados oito surtos, por meio de análises microbiológicas e de inquéritos epidemiológicos, ocorridos na região de São José do Rio Preto, São Paulo, no período de dezembro de 2001 a abril de 2003. Desses, quatro (50%) foram confirmados laboratorialmente e *S. aureus* foi o agente envolvido. Os produtos de confeitaria, como doces e salgados, foram os alimentos implicados. Segundo inquéritos epidemiológicos, o número total de indivíduos afetados foi 52, sendo 13 a média de pessoas por surto e de hospitalizados sete (13,5%). Vômitos e diarreias foram os sintomas comuns e prevalentes na totalidade dos surtos, sendo, ainda, observada a presença de febre em três (75%) deles. O estudo dessas enfermidades é de extrema importância, gerando subsídios aos órgãos de saúde pública para tomada de medidas de prevenção e controle dos riscos relacionados às práticas de fabricação e conservação dos alimentos, visando à redução de ocorrência de DTA (Peresi et al., 2004).

O diagnóstico da intoxicação estafilocócica deve ser feito com base em levantamentos do quadro clínico dos doentes e história de ingestão de alimentos suspeitos. Alimentos incriminados na investigação epidemiológica devem ser isolados, coletados e examinados. O isolamento de microrganismos de um mesmo fagotipo de fezes ou vômito de duas ou mais pessoas ajudam na confirmação da enfermidade (São Paulo, 2007).

A pesquisa do microrganismo em alimentos é feita por meio de sua detecção e enumeração em meios seletivos e diferenciais e posterior caracterização pela microscopia e coloração de Gram e pelos testes de coagulase, termonuclease e catalase. Estes testes podem requerer até quatro dias para obtenção dos resultados

finais, além do tempo e material dispensados ao seu uso (Sant'ana e Azeredo, 2005).

O método microbiológico utilizado para enumeração de *S. aureus* em alimentos é o de contagem em placas utilizando o ágar Baird - Parker. Este é o meio de cultura recomendado pela *American Public Health Association* (APHA) e pelo *Food and Drug Administration* (FDA). As colônias típicas são negras, brilhantes, delimitadas e com dois halos. O meio Baird-Parker utiliza a habilidade que o *S. aureus* possui de se desenvolver na presença de telurito de potássio, glicina, cloreto de lítio e polimixina, que são agentes seletivos. Suas características diferenciais baseiam-se na redução do telurito de potássio à telureto de potássio, produzindo colônias negras, e à capacidade de hidrolisar a gema do ovo, formando halos ao redor das colônias. O piruvato de sódio é adicionado ao meio de cultura para melhorar a recuperação de células injuriadas, prevenindo o acúmulo de peróxido de hidrogênio, que é tóxico para as células. Para confirmação, após a seleção de placas que contenham entre 20 e 200 colônias típicas, *S. aureus* responde de forma positiva aos testes de coagulase, catalase, fermentação anaeróbica de glicose e manitol, produção de termonuclease e sensibilidade a lisostafina (Silva et al., 1997).

Contudo, hoje em dia, métodos moleculares estão sendo amplamente utilizados na detecção de *S. aureus* em alimentos. A técnica de PCR é uma das mais pesquisadas e atestadas na comunidade científica. Vários trabalhos relatam o uso desta técnica na identificação de *S. aureus* e na detecção de genes produtores de enterotoxinas (Pitcher et al., 1989; Johnson et al., 1991; Becker et al., 1998; Schmitz et al., 1998; Straub et al., 1999; Tamaparu et al., 2001).

Em relação às medidas de controle e profilaxia da presença de *S. aureus* em alimentos, deve-se procurar controlar sua

contaminação e crescimentos subsequentes de *S. aureus* nos alimentos (Hayes, 1993). As enterotoxinas podem ser evitadas respeitando-se as regras higiênicas ao longo de toda a cadeia de produção de alimentos (Jay, 1994; Bourgeois et al., 1994).

A contaminação dos alimentos por *S. aureus* de origem humana pode ser bastante reduzida mediante diminuição da manipulação dos alimentos, higiene dos manipuladores e adoção de boas práticas de manuseio. O microrganismo deve ser destruído pelo calor (pasteurização) antes que se multiplique e os alimentos devem ser mantidos sob refrigeração, em temperaturas inferiores a 6 °C. Controlando-se os fatores que afetam o crescimento de *S. aureus*, a produção da enterotoxina também estará controlada e, conseqüentemente, os surtos de intoxicação (Assumpção et al., 2003).

De acordo com Franco e Landgraf (2004), o crescimento de *S. aureus* é inibido por amostras de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *L. lactis* ssp. *cremoris*, pela produção de bacteriocina (nisina). Portanto, a competição microbiana ajuda no controle destas intoxicações.

A ocorrência de surtos requer a notificação imediata às autoridades de vigilância epidemiológica para o controle da transmissão, com adoção de medidas como: interdição de produtos contaminados; verificação de práticas inadequadas nas cozinhas e da presença de portadores; manipuladores com ferimentos (São Paulo, 2007). É importante, na indústria, a aplicação do Sistema APPCC para preparação do alimento, baseado na identificação dos perigos específicos e nas

medidas para controle de contaminação cruzada do alimento (Adams e Motarjemi, 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem de leite pasteurizado e queijo Minas Frescal

A parte experimental do trabalho foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, Minas Gerais. Foram analisadas um total de 110 amostras de leite pasteurizado e 100 amostras de queijo Minas Frescal comercializados em Juiz de Fora, Minas Gerais, divididas em dois períodos distintos, seco (inverno) e chuvoso (verão). As amostras foram adquiridas em padarias, escolhidas aleatoriamente, a partir de uma listagem do sindicato dos panificadores de Juiz de Fora, Minas Gerais.

Para a seleção das padarias, onde foram adquiridas as amostras de leite pasteurizado e queijo Minas Frescal, foi utilizada uma amostragem probabilística aleatória estratificada. A cidade de Juiz de Fora foi dividida em sete macrorregiões (centro-centro, centro-norte, centro-sul, leste, oeste, noroeste e sul) (Figura 1) e as padarias listadas pelo sindicato dos panificadores de Juiz de Fora, de acordo com a localização, foram divididas nessas macrorregiões. Quanto maior o número de padarias alocadas em uma macrorregião, maior foi a amostragem naquela região. Sendo assim, foram selecionadas um total de 37 padarias, distribuídas nas macrorregiões de acordo com a tabela 1.



Figura 1. Mapa da cidade de Juiz de Fora, MG, dividida em macrorregiões.

Tabela 1. Número de padarias selecionadas para amostragem de leite pasteurizado e queijo Minas Frescal por macrorregião de Juiz de Fora, MG

Macrorregião de Juiz de Fora	Número de padarias selecionadas
Centro-centro	8
Centro-norte	9
Centro-sul	7
Leste	2
Oeste	3
Noroeste	6
Sul	2

Foram analisadas 56 amostras de leite pasteurizado e 50 amostras de queijo Minas Frescal no período de 14 de junho a 27 de setembro de 2005 (seco) e 54 amostras de leite pasteurizado e 50 amostras de queijo Minas Frescal no período de nove de janeiro a 20 de março de 2006 (chuvoso).

No período seco, as 56 amostras de leite pasteurizado representaram 11 marcas diferentes. Dessas 11 marcas, oito apresentavam inspeção federal e três apresentavam inspeção estadual. O número de amostras analisadas por marca está descrito na tabela 2.

Tabela 2. Número de amostras, por marca de leite pasteurizado, submetidas a análises microbiológicas, no período seco, de junho a setembro de 2005

Marca de leite pasteurizado	Número de amostras analisadas	Nível de Inspeção
A	7	Federal
B	5	Federal
C	7	Federal
D	6	Federal
E	6	Estadual
F	5	Estadual
G	1	Federal
H	6	Federal
I	6	Federal
J	6	Federal
L	1	Estadual
TOTAL	56	

No período chuvoso, as 54 amostras de leite pasteurizado representaram nove marcas diferentes, foram excluídas as marcas G e L, visto que, desde junho de 2005 (ainda dentro

do período seco), não foram mais encontradas no mercado varejista de Juiz de Fora. O número de amostras analisadas por marca está descrito na tabela 3.

Tabela 3. Número de amostras, por marca de leite pasteurizado, submetidas a análises microbiológicas, no período chuvoso, de janeiro a março de 2006

Marca de leite pasteurizado	Número de amostras analisadas	Nível de Inspeção
A	7	Federal
B	5	Federal
C	7	Federal
D	6	Federal
E	6	Estadual
F	5	Estadual
H	6	Federal
I	6	Federal
J	6	Federal
TOTAL	54	

Em relação aos queijos Minas Frescal, tanto no período seco quanto no período chuvoso foram analisadas cinco amostras de dez marcas distintas, nomeadas de A a J. Dessas marcas, duas apresentavam inspeção federal, uma apresentava inspeção estadual e sete apresentavam inspeção municipal.

Os produtos foram adquiridos em embalagem de polietileno de um litro, no caso do leite pasteurizado, e em embalagens

plásticas contendo 400 gramas de produto, no caso do queijo Minas Frescal; e foram transportados sob refrigeração até o laboratório para a realização de exames microbiológicos, visando o isolamento e identificação de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *S. aureus*. Os microrganismos isolados foram armazenados em um banco de culturas; mantendo-se, no mínimo, cinco colônias de cada microrganismo isolado. Esse

procedimento foi repetido em cada etapa do trabalho.

3.2 Isolamento e identificação de patógenos associados a doenças transmitidas por alimentos em leite pasteurizado e queijo Minas Frescal comercializados em Juiz de Fora, Minas Gerais

O processamento das amostras no laboratório foi realizado de acordo com Marshall (1992). Cada amostra de leite (25 mL) ou queijo (25 g) foi inoculada em 225 mL de meio de enriquecimento específico para *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Salmonella*. A descrição completa da análise microbiológica para isolamento e identificação de cada microrganismo encontra-se a seguir.

3.2.1 *Escherichia coli* O157:H7

Para *E. coli*, foram usados para enriquecimento 225 mL de caldo EC acrescido de 45 µL de novobiocina e, após 24 horas de incubação a 35 °C, foi feito o plaqueamento, em duplicata, em ágar TC-SMAC (*Mac Conkey sorbitol agar* acrescido de 2,5 mL de telurito de potássio por litro e 0,05 mg de cefixime por litro). Essas placas também foram incubadas a 35 °C por 24 horas.

No ágar TC-SMAC, foi observado o crescimento de colônias sorbitol-negativas, as quais se apresentam de coloração rosa pálida. Sendo assim, foram selecionadas dez colônias típicas, ou, no caso do não crescimento de colônias típicas, colônias atípicas foram selecionadas, para crescimento em ágar EC MUG (ágar EC adicionado de 4 methyl-umbelliferyl-BD glucoronide). As placas de EC MUG foram incubadas a 35 °C por 24 horas.

Após o período de incubação nas placas de EC MUG, verificou-se a fluorescência dos isolados com luz ultravioleta. *E. coli* O157:H7 não fluoresce quando em contato com a luz ultravioleta. Sendo assim, os microrganismos isolados que não fluoresciam foram considerados suspeitos de *E. coli* O157:H7 e, em seguida, foram submetidos à confirmação sorológica, teste de aglutinação, com soro anti *E. coli* O157. Os microrganismos isolados que apresentaram resultado positivo no teste de soroaglutinação foram, então, submetidos à reação de PCR, para confirmação de *E. coli* O157:H7.

3.2.2 *Listeria monocytogenes*

Para o isolamento de *L. monocytogenes* foi usado o caldo de enriquecimento LEB (*Listeria Enrichment Broth*), incubando-se a 30 °C por 48 horas. O plaqueamento foi realizado em ágar Palcam e ágar Oxford (em duplicatas) e as placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas, quando se fez o exame para seleção de colônias típicas do gênero *Listeria*.

Colônias típicas de *Listeria* apresentavam-se enegrecidas nos dois meios utilizados. De cada placa com colônias suspeitas, independentemente de ter havido crescimento em apenas um meio ou em ambos, foram selecionadas cinco colônias típicas, que foram, então, semeadas em ágar TSYEA (ágar triptona-extrato de levedura), incubadas a 35 °C durante 24 h. A partir deste meio foi realizada a técnica de PCR para confirmação dos microrganismos isolados.

3.2.3 *Salmonella* spp.

De acordo com Dowens e Ito (2001), inicialmente o procedimento consistiu em realizar um pré-enriquecimento em garrafa para reagente, homogeneizando-se a amostra

e transferindo-se 25 mL para 225 mL de caldo lactosado, seguido de incubação a 35 °C por 18 a 24 horas. O enriquecimento seletivo consistiu da transferência de 1 mL do caldo lactosado para tubos contendo 10 mL de caldo tetracionato, o qual foi incubado, em banho-maria, a 43 °C por 24 horas, e 1 mL em caldo selenito-cistina, que foi incubado a 35 °C durante 24 horas.

A partir de cada meio do "enriquecimento seletivo", estrias, com alça de 3 mm, foram realizadas em ágar Hektoen (HE) e em ágar xilose lisina desoxicolato (XLD), que foram incubados a 35 °C por 24 horas e, se necessário, por 48 horas. As placas foram examinadas e cinco colônias típicas de *Salmonella* de cada placa, no ágar HE colônias verde-azuladas podendo apresentar centro negro ou totalmente negras, e no ágar XLD colônias rosa-avermelhadas com ou sem centro negro (devido à produção de H₂S), foram semeadas em dois tubos, para isolamento em meio não-seletivo diferencial. Um continha meio TSI (*Triple Sugar Iron*) e o outro meio LIA (*Lysine Iron Agar*). O isolamento em meio não-seletivo diferencial foi realizado para a caracterização bioquímica preliminar. Foram inoculadas com agulha as colônias suspeitas para tubos contendo ágar TSI inclinado, inoculando-se por estria na superfície inclinada e por picada em profundidade. Sem flambar a alça, repetiu-se inoculando o ágar LIA. A incubação foi realizada a 35 °C por 24 horas. Completado o período de incubação dos tubos de TSI e LIA, foi observada a coloração dos tubos e a formação ou não de gás e de H₂S.

A interpretação dos resultados, de acordo com Quinn et al. (2000), foi a seguinte: ágar TSI - coloração vermelha (alcalino) na inclinação do meio e amarela (produção de ácido) na base do tubo, com ou sem produção de H₂S (meio negro); ágar LIA - coloração púrpura (alcalino) na base com ou sem produção de H₂S. A maioria das amostras das *Salmonella* produz H₂S. É

importante ressaltar que toda cultura que apresentou base alcalina no LIA, independentemente da reação no TSI, é uma potencial *Salmonella*, e culturas que apresentaram base ácida no LIA, base ácida e bisel alcalino no TSI também foram consideradas potenciais *Salmonella*.

Os microrganismos isolados que apresentaram crescimento característico nos meios TSI e LIA foram, então, submetidos ao teste sorológico com soro *Salmonella* polivalente somático, anti-O. Aqueles que apresentaram resultados positivos na soroglutinação foram submetidos à reação de PCR para confirmação como bactéria do gênero *Salmonella*.

3.2.4 *Staphylococcus aureus*

No caso de *S. aureus*, foi usado o método de isolamento e contagem também de acordo com Marshall (1992).

Foram preparadas diluições do leite e do queijo (suspensão em g/mL). Para leite pasteurizado foi utilizado como diluente a água fosfatada e para o queijo Minas Frescal o citrato de sódio a 2%. Para o preparo da água fosfatada, foi, inicialmente, preparada uma solução estoque a partir de 34 g de KH₂PO₄ em 500 mL de água Mili Q, com pH 7,2. Em seguida, 1,25 mL dessa solução estoque foi acrescida em um litro de água destilada. E, então, esta última foi utilizada como diluente para as amostras de leite pasteurizado.

Inicialmente, 25 mL de leite ou 25 g de queijo foram diluídos em 225 mL de água fosfatada e citrato de sódio 2%, respectivamente. Em seguida, as diluições foram realizadas utilizando-se tubos contendo 9 mL de cada diluente. Para leite pasteurizado, foram utilizadas as diluições 10⁰, 10⁻¹ e 10⁻²; e, para o queijo Minas Frescal, 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴.

Depois de realizadas as diluições, cada tubo foi agitado em Vortex e semeado em meio Baird-Parker, para obtenção de colônias isoladas, incubando-se as placas a 35 °C, por 48 horas. Foram utilizadas três placas por diluição: em duas placas já contendo meio de cultura solidificado foram dispensados 0,3 mL da diluição em cada e em outra placa também já contendo o meio de cultura foram dispensados 0,4 mL, totalizando nove placas de Baird-Parker por amostra de leite ou queijo. Para a adequada distribuição da diluição no meio de cultura, esta foi espalhada com alça de Drigalski sobre o meio.

Após 48 horas de incubação das placas de Baird-Parker, foi observado o crescimento de colônias típicas de *S. aureus* no ágar Baird-Parker, colônias enegrecidas com halo claro ao redor. Foram, então, selecionadas dez colônias suspeitas ou atípicas, no caso do não crescimento de colônias típicas, por amostra e essas foram semeadas em ágar TSA (*Trypticase Soy Agar*). As placas de TSA foram, então, incubadas a 35 °C por 24 horas.

Os microrganismos isolados crescidos em TSA foram submetidos ao teste de coagulase. Plasma de coelho fresco ou comercial liofilizado é o reagente utilizado. O plasma de coelho contém fibrinogênio que é convertido em fibrina pela enzima coagulase de algumas espécies de *Staphylococcus* (Quinn et al., 2000).

O procedimento consistiu em colocar 0,5 mL do plasma de coelho liofilizado não diluído, conforme instruções do fabricante, em solução fisiológica estéril em um tubo de ensaio de 8 a 10 mm de diâmetro. Em seguida, suspendeu-se no plasma uma alça cheia do crescimento bacteriano da placa de TSA e incubou-se o tubo a 35 °C por 24 horas. Quando o teste é positivo, ocorre coagulação do plasma com formação de um coágulo que pode ser sólido ou frouxo. Foram utilizados como controles positivo e

negativo para o teste *S. aureus* e uma amostra de *Staphylococcus* sp. coagulase negativo, respectivamente (Quinn et al., 2000).

As amostras coagulase positivas foram submetidas ao teste de Voges-Proskauer (VP). A modificação de Colbenz do teste de Voges-Proskauer é usada para determinar a habilidade de um certo microrganismo de produzir um composto neutro, o acetilmetilcarbinol (acetoína), a partir da fermentação da glicose (Ribeiro & Soares, 1998).

Com o auxílio de uma alça de níquel, duas ou três colônias crescidas na placa de TSA foram inoculadas em um tubo contendo 2 mL do meio de cultura Voges-Proskauer, o qual foi incubado a 35 °C durante 24 horas. Após o período de incubação, foram adicionadas ao tubo 10 gotas de solução A (α -naftol 5%) e 10 gotas de solução B (hidróxido de potássio a 40% com 0,3% de creatina). O tubo foi agitado vigorosamente várias vezes durante 30 minutos, para que o oxigênio atmosférico penetrasse e oxidasse a acetoína em diacetila.

O hidróxido de potássio atua como agente oxidante e o α -naftol como catalisador e intensificador de cor. Com o uso de um agente oxidante, a cor produzida desaparece rapidamente, sobretudo porque o complexo de reação diacetila-peptona pode ser rapidamente oxidado em um composto incolor. Portanto, a reação positiva foi obtida quando ocorreu a coloração avermelhada do tubo ao final dos 30 minutos.

Ao final desses testes, os microrganismos isolados coagulase positivos e VP positivos foram submetidos à reação de PCR para confirmação de *S. aureus*.

3.3 Emprego da técnica de PCR para a identificação molecular de patógenos isolados a partir de leite pasteurizado e queijo Minas Frescal

A extração de DNA bacteriano de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. foi realizada por lise térmica, de acordo com Hu et al. (1999). Inicialmente, colocou-se 100 µL de água Mili Q estéril em um tubo de reação estéril. Em seguida, homogeneizou nessa água uma alçada do crescimento bacteriano em ágar BHI (*Brain Heart Infusion* agar) incubado a 35 °C por 24 horas. O tubo foi, então, submetido à fervura (100 °C) por dez minutos. Após a fervura, foi centrifugado a 12.000 rpm (rotações por minuto) durante dois minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo estéril, e o DNA assim obtido foi utilizado reação de PCR.

Em amostras de *S. aureus*, o DNA foi obtido também por lise térmica, conforme protocolo descrito por Nunes et al. (1999). Brevemente, 1 mL de uma cultura de bactéria suspeita, incubada a 37 °C durante 18 horas, foi centrifugada a 5.000 rpm por quatro minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuscitado, homogeneizado em vortex e centrifugado a 5.000 rpm durante dois minutos. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. Em seguida, o *pellet* foi ressuscitado em 100 µL de TE (Tris-EDTA – 10 mM tris-HCL pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0), homogeneizado em vortex e mantido a 100 °C por dez minutos. O tubo de reação foi centrifugado a 12.000 rpm durante 30 segundos e o sobrenadante utilizado na reação de PCR.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems). Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada microrganismo, descritos na literatura. A tabela 4 apresenta

os oligonucleotídeos que foram utilizados nas reações. Amostras-referência de *E. coli* O157:H7 (IAL 1848), *L. monocytogenes* (ATCC 19117), *Salmonella* Typhimurium (IAL 1472) e *S. aureus* (ATCC 29213) foram utilizadas como controles positivos das reações de PCR. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose (1,5%, p/v) corado com solução de brometo de etídio (0,005%, p/v) e fotodocumentados (Eagle Eye, Stratagene).

As colônias suspeitas de *E. coli* O157:H7 foram confirmadas de acordo com Hu et al. (1999), utilizando-se quatro oligonucleotídeos iniciadores que amplificam segmentos dos genes *slt-I*, *slt-II*, *fliC* e *rfbE*, que permitem a identificação simultânea do sorotipo O157:H7 e seus fatores de virulência em uma única reação (PCR multiplex). De acordo com Garcia (2006), a reação de PCR ficou estabelecida em duas reações: “A” (com *RfbF/RfbR* e *Flic_{h7}F/Flic_{h7}R*) e “B” (com *SLT-IF/SLTIR* e *SLT-IIF/SLT-IIR*). A reação “A” com 5 µL de tampão de PCR (10x), 1 µL da mistura de nucleotídeos (10mM), 0,3 unidades de taq DNA polimerase, 2,5 mmol/L de MgCl₂, 20 pmol de cada oligonucleotídeo FLIC_{h7} (1,0 µL), 30 pmol de cada *Rfb* (1,5 µL), 2,5 µL de DNA bacteriano (20 ng/ µL) e água bidestilada para completar o volume total de 50 µL. A reação “B” foi idêntica à reação “A”, porém com 50 pmol de cada oligonucleotídeo (2,5 µL). As misturas foram aquecidas por cinco minutos a 94 °C seguido de 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 57 °C por um minuto e extensão a 72 °C por um minuto) e extensão final a 72 °C por dez minutos.

Para confirmação de *L. monocytogenes* foi amplificado o gene *hlyA*, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Border et al. (1990). A reação de PCR foi realizada de acordo com Lange et al. (2005). Adicionou-se 1 µL de DNA bacteriano (100 ng/µL) a uma mistura contendo 1 µL de

cada oligonucleotídeo (10 mM), 5 µL de tampão de PCR (10 x), 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 1 µL da mistura de nucleotídeos (10 mM), 1 U de Taq polimerase e água bidestilada para completar um volume de 50 µL. As condições de amplificação foram: 5 minutos a 94 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos à temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos (50 °C) e 45 segundos a 72 °C, e uma extensão final de cinco minutos a 72 °C.

Para confirmação de *Salmonella* foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Rahn et al. (1992) e Aabo et al. (1993). A reação de PCR multiplex foi realizada de acordo com Arcuri et al. (2007): amplificação em um volume de 50 µl contendo 1X tampão de PCR, 2 mM de cada nucleotídeo, 1,5 mM de MgCl₂, 2,0 U de enzima Ampliteq DNA polimerase, 20 pmol de cada primer, 100 ng de DNA bacteriano e água bidestilada para completar o volume de 50 µl. As condições de amplificação foram: ciclo inicial a 94 °C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos (desnaturação a 94 °C por 45

segundos, anelamento a 60 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos), com o término da reação a 72 °C por 10 minutos.

As amostras foram confirmadas como *S. aureus* por meio da amplificação de um fragmento de 132 pb do gene *femA* (Mehrotra et al. 2000). Para a reação de PCR, adicionou-se 1 µL de DNA bacteriano (50-100 ng/ µL) a uma mistura contendo 2,0 µL de cada oligonucleotídeo (100mM), 5 µL de tampão de PCR (10x), 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 1 µL da mistura de nucleotídeos (10 mM), 1 U de Taq polimerase e água bidestilada para completar um volume de 50 µL. As condições de amplificação foram: 4 minutos a 94 °C, 5 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 56 °C e 45 segundos a 72 °C, 20 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 52 °C e 45 segundos a 72 °C e uma extensão final de 5 minutos a 72 °C (Mehrotra et al. 2000). Detalhes dos oligonucleotídeos que foram usados nas reações de PCR são apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR para identificação de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *S. aureus* isolados de amostras de leite pasteurizado e queijo Minas Frescal

Microrganismo	Oligonucleotídeos	Gene-alvo	Referências
<i>E. coli</i> O157:H7	SLT-1F / SLT-1R	<i>slt-I</i> (enterotoxina)	Hu et al. (1999)
<i>E. coli</i> O157:H7	SLT-2IF / SLT-2IR	<i>slt-II</i> (enterotoxina)	Hu et al. (1999)
<i>E. coli</i> O157:H7	FLIC _{H7} -F / FLIC _{H7} -R	<i>fliC</i> (H7)	Hu et al. (1999)
<i>E. coli</i> O157:H7	RfbF / RfbR	<i>rfbE</i> (O157)	Hu et al. (1999)
<i>L. monocytogenes</i>	LM1/ LM2	<i>hlyA</i>	Border et al. (1990)
<i>S. aureus</i>	<i>femA1</i> / <i>femA2</i>	<i>femA</i>	Mehrotra et al. (2000)
<i>Salmonella</i> spp.	139 / 140	<i>int A</i>	Rahn et al. (1992)
<i>Salmonella</i> spp.	ST11 / ST 15	Fragmento randômico	Aabo et al. (1993)

3.4 Rastreamento dos laticínios com confirmação de patógenos isolados

Após a confirmação de isolamento de um ou mais dos quatro microrganismos citados, foram identificados os laticínios de origem de cada produto, sendo escolhido um

laticínio para esta etapa. Após contato com a direção do laticínio, foi realizado um estudo de caso com a finalidade de identificar a provável fonte de contaminação a partir da recepção da matéria-prima e do processamento. Foram obtidas amostras para análise microbiológica de: leite cru, leite pasteurizado, massa de queijo, soro, água e

swabs obtidos de vários pontos do ambiente do processamento (bancada, parede, piso, formas usadas para queijo) e das mãos dos funcionários. A obtenção de amostras e as análises laboratoriais foram conduzidas de acordo com Marshall (1992).

Os procedimentos para análise destas amostras serão descritos na seção Material e Métodos do capítulo 2.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a análise microbiológica de 110 amostras de leite pasteurizado e 100 amostras de queijo Minas Frescal, comercializadas na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, os resultados obtidos são apresentados e discutidos nos próximos itens

4.1 Leite pasteurizado

4.1.1 *Escherichia coli* O157:H7

Nenhuma amostra de leite pasteurizado, no período seco ou no período chuvoso, apresentou resultado positivo para *E. coli* O157:H7.

Este resultado é condizente com os resultados de alguns estudos encontrados na literatura. Silva et al. (2001) avaliaram a qualidade microbiológica de leite pasteurizado comercializado na cidade do Rio de Janeiro, com o objetivo de isolar *E. coli* O157:H7. Entretanto, os resultados obtidos no estudo demonstraram a presença apenas do sorotipo EPEC (enteropatogênica) em 90 amostras de leite pasteurizado provenientes de três marcas diferentes.

Carneiro et al. (2006) também estudaram três marcas diferentes de leite pasteurizado comercializados na cidade do Rio de Janeiro para isolamento de sorotipos de *E. coli*. Esses autores encontraram 56 isolados de *E. coli*, todos pertencentes ao sorotipo EPEC

(enteropatogênica). Mais uma vez o sorotipo EHEC (enterohemorrágica), ao qual pertence a *E. coli* O157:H7 não foi isolado de amostras de leite pasteurizado. Por outro lado, a presença de *E. coli* O157:H7 foi observada em 2,04% de amostras de leite pasteurizado em estudo realizado por Manna et al. (2006), na Índia.

Surto envolvendo o consumo de leite pasteurizado contaminado com *E. coli* O157:H7 já foram relatados em outros países (Upton e Coia, 1994). Nessa ocasião, *E. coli* O157:H7 foi isolada da tubulação e da máquina de envase de leite pasteurizado no laticínio, indicando pasteurização inadequada ou contaminação pós-pasteurização. Contudo, no Brasil, até o presente momento, nenhum surto envolvendo o consumo de leite pasteurizado contaminado com *E. coli* O157:H7 foi relatado às autoridades responsáveis, assim como nenhum estudo sobre o isolamento deste patógeno em laticínios no Brasil foi encontrado na literatura.

É importante ressaltar que todas as amostras de leite pasteurizado analisadas no presente estudo eram provenientes de laticínios submetidos a algum nível de inspeção, seja este estadual ou federal. Sabe-se que um programa de controle de qualidade e o serviço de inspeção de produtos de origem animal são essenciais para a produção de alimentos seguros para o consumidor. Dessa forma, possivelmente, as amostras de leite pasteurizado comercializadas em Juiz de Fora e analisadas neste estudo são provenientes de indústrias submetidas a programas de controle de qualidade, o qual atenta-se para adequada pasteurização do leite e minimiza riscos de contaminação pós-pasteurização, e a um adequado serviço de inspeção, o qual exige baixa contaminação do leite, e, por isso, apresentaram resultado negativo para ocorrência de *E. coli* O157:H7. Ou, ainda, este resultado pode explicado realmente pela baixa prevalência do patógeno em produtos lácteos

pasteurizados. Entretanto, para confirmação dessa hipótese, outros estudos são necessários.

4.1.2 *Listeria monocytogenes*

Nenhuma amostra de leite pasteurizado, analisada no período seco ou no período chuvoso, apresentou resultado positivo para *L. monocytogenes*.

Vários trabalhos demonstraram a ocorrência de *L. monocytogenes* em leites crus e submetidos à pasteurização comercializados em diversas regiões do Brasil e do mundo. A taxa de prevalência desse patógeno no leite varia muito entre os diversos estudos e pode ser influenciada por fatores, tais como região geográfica, estação do ano, tamanho da fazenda, número de animais na propriedade e manejo sanitário (Rohrbach et al., 1992). O consumo de leite cru ou submetidos ao processo de pasteurização tem sido associado a vários surtos de DTA causados por *L. monocytogenes* (Fleming et al., 1985; Linnan et al., 1988; Dalton et al., 1997). Devido à gravidade das infecções produzidas, principalmente em grupos de risco (crianças, idosos), vários países têm adotado uma política severa para controle de *L. monocytogenes* em alimentos (Carvalho, 2003).

A presença de *L. monocytogenes* em leite pasteurizado foi observada por Ahmed e Hussein (2005). Estes pesquisadores analisaram amostras de leites pasteurizados comercializados no Egito e detectaram este patógeno em 4% dessas amostras. Por outro lado, Padilha et al. (2001) não isolaram *L. monocytogenes* de 50 amostras de leite cru e 250 amostras de leite pasteurizado comercializados no Recife – PE.

Uma explicação para a ausência deste microrganismo nas amostras de leite pasteurizado analisadas neste estudo pode ser a baixa prevalência do patógeno nos rebanhos leiteiros originários do leite

analisado. Além disso, os leites analisados neste estudo são provenientes de laticínios inspecionados que, provavelmente, realizam adequadamente a pasteurização do leite e trabalham em boas condições de higiene, com boas práticas de fabricação e controle de qualidade, uma vez que as causas da presença de *L. monocytogenes* em produtos lácteos pasteurizados estão relacionadas à contaminação pós-pasteurização ou pasteurização realizada de maneira inadequada.

4.1.3 *Salmonella* spp.

Todas as amostras de leite pasteurizado analisadas no período seco ou no período chuvoso apresentaram resultado negativo para *Salmonella* spp..

Este resultado condiz com os resultados de outros estudos conduzidos no Rio de Janeiro (Bricio et al., 2005), no estado de São Paulo (Gusmão et al., 2005) e em Curitiba (Macedo e Pflanzler Júnior, 2005).

A incidência de *Salmonella* em leite cru no Brasil também não parece ser elevada. Ávila e Gallo (1996) não detectaram a presença deste patógeno em amostras de leite cru oriundas de propriedades rurais do Município de Piracicaba, São Paulo. Garrido et al. (2001) também, ao estudarem a qualidade microbiológica de leite cru proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto, São Paulo, não observaram a presença de *Salmonella* spp.. Moraes et al. (2005) estudaram a qualidade microbiológica de leite cru produzido em cinco municípios do Estado do Rio Grande do Sul. Não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. em amostras de leite cru oriundas de 42 propriedades, 21 com ordenha manual e 21 com ordenha mecânica, confirmando sua baixa incidência no leite.

Salmonella é a principal causa de DTA causada por bactérias nos Estados Unidos (Cody et al., 1999). De Buyser et al. (2001) também apontam este patógeno como o principal causador de toxinfecções alimentares no Canadá, Dinamarca, Escócia, Holanda, Suécia, Inglaterra e País de Gales. Sendo assim, vários surtos pelo consumo de produtos lácteos pasteurizados contaminados com *Salmonella* spp. já foram relatados (Johnson et al., 1990). Ryan et al. (1987), Donnelly (1990) e Olsen et al. (2004) relataram a ocorrência salmonelose pelo consumo de leite pasteurizado contaminado pós-pasteurização.

Olsen et al. (2004) descreveram a ocorrência de um surto de salmonelose causado pelo consumo de leite pasteurizado contaminado com *Salmonella enterica* Typhimurium. Neste caso, o leite foi contaminado após a pasteurização, em função da má condição higiênico-sanitária dos silos de armazenamento do leite pasteurizado e da máquina de envase.

Possivelmente, a ausência de *Salmonella* spp. e também de *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* nas amostras de leite

pasteurizado analisadas no presente estudo deve-se à baixa prevalência do patógeno no leite cru, como alguns trabalhos já demonstraram, ao correto beneficiamento dos leites pasteurizados por parte dos laticínios investigados, assim como à correta armazenagem e embalagem do leite pasteurizado, evitando-se, então, contaminação do produto pós-pasteurização.

4.1.4 *Staphylococcus aureus*

Todas as amostras de leite pasteurizado analisadas no período seco (inverno) apresentaram resultado negativo para *S. aureus*. No período chuvoso (verão), três (5,55%) de um total de 54 amostras analisadas apresentaram resultados positivos para *S. aureus*. Essas três amostras foram provenientes de três marcas distintas: C, H e I.

O produto da reação de PCR dessas amostras de leite pasteurizado evidenciou fragmentos de 132 pares de bases obtidos com um fragmento do gene *femA* de *S. aureus* (Figura 1).

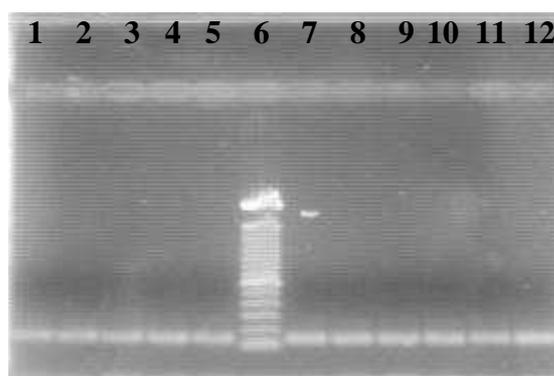


Figura 2. Fragmentos de 132 pb obtidos com a amplificação de um fragmento do gene *femA* de *S. aureus* isolados de amostras de leite pasteurizado. 1 - 5 e 7 - 12 = *S. aureus*; 6 = marcador de peso molecular 100 pb.

Como é possível perceber na tabela 5, as três amostras de leite pasteurizado positivas para *S. aureus* apresentaram contagens abaixo de 10^5 UFC mL⁻¹, valor este considerado o

mínimo para que haja a produção de enterotoxinas responsáveis pela intoxicação estafilocócica (Forsythe, 2002).

Tabela 5. Contagem de *S. aureus* nas amostras de leite pasteurizado positivas para *S. aureus* analisadas no período chuvoso (verão)

Amostra positiva	Contagem (UFC mL ⁻¹)
C1	3×10^0
H1	1×10^2
I1	$1,2 \times 10^2$

Em relação às marcas de leite pasteurizado contaminadas, todas eram provenientes de laticínios sob Serviço de Inspeção Federal (SIF). A legislação brasileira para laticínios com selo do Serviço de Inspeção Federal exige que programas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) sejam implantados nas fábricas com o apoio de pessoal especializado, e sejam revistos periodicamente (Brasil, 1997; 1998). Silva et al. (2003) também apontaram para a necessidade de implantação de APPCC em todos os laticínios e salientaram para a possibilidade de contaminação pós-processamento.

Outros autores também relataram a presença de *S. aureus* em leite e derivados, inclusive em produtos pasteurizados, e contestaram a qualidade desses produtos no Brasil (Garrido et al., 2001; Câmara et al., 2002; Cardoso e Araújo, 2004; Lamaita et al., 2005; Macedo e Pflanzler Júnior, 2005; Conciani et al., 2006; Santana et al., 2006). Cordeiro et al. (2002) avaliaram amostras de leite pasteurizado comercializadas no Estado do Rio de Janeiro e encontraram 83,4% de amostras positivas para *S. aureus*. Este patógeno também foi isolado em 10% das amostras de leite pasteurizado comercializado na região metropolitana de Curitiba, Paraná (Macedo e Pflanzler Júnior, 2005).

Contudo, considerando os resultados do presente estudo, pode-se afirmar que o leite pasteurizado comercializado em Juiz de Fora apresentou baixa contaminação e, conseqüentemente, baixo risco para os consumidores, pois apresentou resultados negativos para três patógenos (*E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp.) e, ao considerarmos a totalidade das amostras analisadas (110), apenas 2,72% das amostras apresentaram resultado positivo para *S. aureus*. Este valor é inferior ao que é relatado na literatura.

Como *S. aureus* é eliminado pela pasteurização do leite e, acreditando-se que as marcas analisadas neste estudo sejam submetidas a um processamento térmico adequado, visto que são inspecionadas, provavelmente essas amostras de leite pasteurizado positivas para o patógeno foram recontaminadas após a pasteurização, podendo ser proveniente de más condições de higiene de equipamentos e utensílios ou dos manipuladores.

4.2 Queijo Minas Frescal

4.2.1 *Escherichia coli* O157:H7

Todas as amostras de queijo Minas Frescal analisadas no período seco ou no período chuvoso apresentaram resultado negativo para *E. coli* O157:H7.

Este resultado é semelhante aos resultados de outros estudos encontrados na literatura. Ansay e Kaspar (1997) analisaram amostras de queijos provenientes de 15 laticínios nos estados de Wisconsin, Illinois e Iowa, nos Estados Unidos, para a presença de *E. coli*. Este patógeno foi isolado de 58% das amostras testadas, porém especificamente *E. coli* O157:H7 não foi detectada. Ahmed e Sallam (2001) avaliaram amostras de queijos frescos comercializados na cidade do Cairo, Egito, para a presença de *E. coli*. Esses pesquisadores detectaram vários sorogrupos de *E. coli*, mas não detectaram a presença do sorogrupo *E. coli* O157. Coia et al. (2001) avaliaram 500 amostras de leite cru e 739 queijos produzidos, na Escócia, a partir de leite cru, quanto à presença de *E. coli* O157:H7 e não encontraram a presença desta bactéria nas amostras analisadas.

Em estudos no Brasil, Manhani (2000) avaliou 60 amostras de queijo, submetidas a algum nível de inspeção, e nenhuma delas revelou a presença de *E. coli* O157:H7. Rossi (2004) avaliou amostras de queijo Minas Frescal comercializadas na cidade de Araguaína, Tocantins, quanto à presença de *E. coli*. Em seu estudo, 96% das amostras de queijo encontravam-se contaminadas com *E. coli*, porém os sorogrupos identificados foram O125, O111, O55 e O119. Mais uma vez, o sorogrupo *E. coli* O157:H7 não foi detectado.

Por outro lado, outros estudos demonstraram a presença de *E. coli* O157:H7 em queijos frescos. Oksüz et al. (2004), investigando amostras de leite cru e de queijos produzidos com leite cru na Turquia, encontraram 1% de amostras de leite cru e 4% de amostras de queijos positivas para *E. coli* O157. Estes resultados demonstram que queijos produzidos a partir de leite cru têm potencial para causar infecções por *E. coli* O157.

Surtos de DTA causados pelo consumo de queijo fresco produzido a partir de leite cru contaminado com *E. coli* O157:H7 também

já foram relatados na literatura internacional (Reilly, 1997; Outbreak..., 2000). Todavia, no Brasil também não há dados relacionados à ocorrência de surtos de toxinfecção alimentar pelo consumo de queijo Minas Frescal contaminado com *E. coli* O157:H7.

No presente estudo, os resultados negativos da presença de *E. coli* O157:H7 em queijos Minas Frescal podem ser explicados sob duas vertentes. A primeira é a de que o patógeno realmente apresente baixa prevalência nos produtos lácteos, como alguns trabalhos também demonstraram, e a segunda é a de que, quando este microrganismo foi isolado de queijos, a maioria deles foi produzida com leite cru, e as amostras analisadas neste estudo eram provenientes de laticínios sob algum nível de inspeção, a qual não permite a produção de queijo a partir de leite cru.

4.2.2 *Listeria monocytogenes*

Das dez marcas de queijo Minas Frescal analisadas, totalizando 100 amostras, uma marca (F) analisada no período seco (inverno) apresentou amostras positivas para *L. monocytogenes*. Todas as demais amostras das outras nove marcas (96 amostras) apresentaram-se negativas para este patógeno.

De um total de cinco amostras da marca F analisadas no período seco (inverno), quatro amostras apresentaram resultado positivo para *L. monocytogenes*. O laticínio produtor destas amostras de queijo é submetido ao serviço de inspeção estadual. Nenhuma amostra da marca F analisada no período chuvoso (verão) apresentou resultado positivo, muito provavelmente por ter havido uma interdição no laticínio produtor dos queijos da marca F a qual será mais bem elucidada no capítulo 2 desta tese.

O produto da reação de PCR evidencia que as quatro amostras analisadas apresentaram

resultado compatível para *L. monocytogenes* (Figura 2).

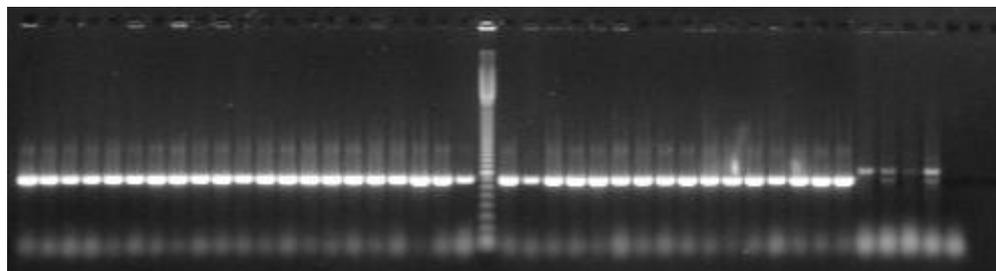


Figura 3. Fragmentos de 702 pares de bases obtidos com os oligonucleotídeos LM1/LM2, específicos para *L. monocytogenes*. Foi utilizado marcador de peso molecular de 100 pares de bases. Imediatamente antes e depois do marcador encontram-se os controles positivos. Nas últimas cinco colunas preenchidas a reação é negativa. Na última coluna preenchida encontra-se o controle negativo.

O resultado do presente estudo, 4% de amostras de queijo Minas Frescal comercializadas em Juiz de Fora, Minas Gerais, positivas para *L. monocytogenes*, está de acordo com diversos outros estudos relatados na literatura. Os resultados obtidos por Oliveira (1993) demonstraram que uma (2%) amostra de queijo Minas Frescal colhida no varejo de Goiânia, Goiás, era positiva para este microrganismo. Pesquisas realizadas por Destro et al. (1991) e Vieira (2000) evidenciaram a ocorrência de *L. monocytogenes*, respectivamente, em duas (10%) e cinco (25%) amostras de queijo Minas Frescal industrializado, coletadas no comércio varejista de Campinas, São Paulo.

Vieira (2001) avaliou amostras de queijo Minas Frescal produzidos artesanalmente e comercializados na região de Araguaína, Tocantins. Esse autor observou 8% das amostras positivas para *L. monocytogenes*. Brigido et al. (2004), analisando amostras de queijo Minas Frescal comercializadas em cidades do interior do Estado de São Paulo, detectaram a presença de *L. monocytogenes* em uma (4,5%) amostra de queijo.

Elevada incidência de *L. monocytogenes* em queijos Minas Frescal também foi observada por Silva et al. (2004a). Bactérias da espécie

L. monocytogenes foram isoladas de queijos Minas Frescal comercializados na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul. Os resultados evidenciaram que 26,7% das amostras estavam contaminadas com *L. monocytogenes*. Tais resultados, assim como o do presente trabalho, implicam em risco para a população, uma vez que o queijo é consumido sem que se realize mais nenhum tipo de tratamento térmico.

Cento e três amostras de diferentes tipos de queijos comercializados na cidade do Rio de Janeiro, foram analisados com o objetivo de avaliar a incidência de *L. monocytogenes*. A maior incidência do patógeno (41,17%) foi observada em queijos frescos fabricados artesanalmente. Os queijos Minas Frescal industrializados apresentaram-se bem menos contaminados (3,03%). Mais uma vez evidencia-se a necessidade de pasteurização do leite para diminuir o risco de DTA (Silva, 1997).

De acordo com Nichols et al. (1997), 16 (1%) de um total de 1437 amostras de queijos frescos comercializados na Inglaterra e País de Gales foram positivas para *L. monocytogenes*. Entretanto, todas as amostras positivas para *Listeria*

apresentaram contagens inferiores a 10^2 UFC/grama.

Alguns surtos envolvendo *L. monocytogenes* já foram relatados e vários alimentos já foram incriminados, entre eles os queijos frescos (Schlech et al., 1983; Fleming et al., 1985; James et al., 1985; Linnan et al., 1988; McLauchlin et al., 1991; Jensen et al., 1994; Bula et al., 1995; Goulet et al., 1995; McLauchlin, 1996; Dalton et al., 1997; Hurd et al., 2000; Lyytikäinen et al., 2000; Boggs et al., 2001). Dessa forma, o impacto da presença de *L. monocytogenes* nos queijos da marca F poderia ter sido grave. Entretanto, de acordo com a Secretaria Municipal de Saúde de Juiz de Fora e com a Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais (comunicação pessoal), nenhum caso de listeriose foi notificado em Juiz de Fora no período de junho de 2005 a junho de 2006.

Em contrapartida, nos estudos realizados por Casarotti et al. (1994), Corbia et al. (1999; 2001), Peresi et al. (2001) e Sá (2003) não foi detectada a presença de *L. monocytogenes* em amostras de queijo Minas Frescal expostas à venda no comércio de Piracicaba – SP, Rio de Janeiro – RJ, São José do Rio Preto – SP e Uberlândia – MG, respectivamente. Provavelmente, isto ocorreu porque estes queijos, nos três estudos, eram provenientes de indústrias sob serviço de inspeção que pasteurizavam o leite para a produção de queijos. Além disso, possivelmente havia correto beneficiamento dos queijos por parte dos laticínios investigados, englobando adequada pasteurização do leite, assim como, na correta armazenagem e embalagem dos queijos, evitando-se, então, contaminação do produto pós-pasteurização.

Uma possível origem da contaminação com *L. monocytogenes* dos queijos da marca F é a contaminação do leite cru, uma vez que rebanhos leiteiros podem ser considerados reservatórios de *L. monocytogenes* e esta

bactéria pode causar mastite em vacas leiteiras (Gitter et al., 1980). Estudos realizados no Canadá e Estados Unidos demonstraram que *L. monocytogenes* pode ser encontrada no leite cru em taxas que variam de 1,3 a 5,4% (Lovett et al., 1987; Farber et al., 1988; Liewen e Plantz, 1988; Slade e Collins-Thompson, 1988; Hassan et al., 2001). Já foi demonstrado também que vacas podem ser portadoras deste patógeno por mais de três anos, sem apresentarem qualquer sintoma ou qualquer alteração no leite (Farber et al., 1990).

Uma outra possível fonte de contaminação é material fecal e o esgoto industrial (Farber e Peterkin, 1991; Bille et al., 2003). Além disso, a característica de *L. monocytogenes* que a faz importante no contexto dos produtos lácteos é a sua habilidade de crescer e se multiplicar em temperaturas de refrigeração, sendo caracterizada como psicrotrófica (Donnelly, 1990). Dessa forma, esta bactéria pode contaminar os queijos durante a sua armazenagem.

Para prevenir a presença de *L. monocytogenes* em leite e derivados, é importante a adoção de boas práticas agropecuárias, boas práticas de fabricação e aplicação de conceitos de programas de controle de qualidade total na indústria de laticínios (Silva et al., 1993).

A população em expansão de pessoas altamente susceptíveis à *L. monocytogenes* (portadores do vírus HIV e pessoas submetidas a tratamento com medicamentos imunossupressores) associada à alta prevalência do patógeno em alimentos fazem com que sejam necessárias medidas de controle, prevenção e redução do risco de listeriose. Para tanto, é necessário estabelecer procedimentos de controle em diferentes pontos na cadeia de produção de alimentos, e aumentar a amostragem durante o processamento e a distribuição dos alimentos. Em adição, em virtude da livre circulação de alimentos entre diferentes

países, parece lógico adotar uma política similar nas agências reguladoras de cada país, principalmente no que diz respeito às metodologias de pesquisa e níveis de tolerância para *L. monocytogenes* em alimentos. Recentemente, o *Codex Alimentarius* preparou um documento que inclui considerações sobre metodologia e riscos deste microrganismo em alimentos, a fim de uniformizar os critérios em todo o mundo (Vitas et al., 2004).

4.2.3 *Salmonella* spp.

Nenhuma amostra de queijo Minas Frescal, no período seco ou no período chuvoso, apresentou resultado positivo para *Salmonella* spp.

Este resultado é semelhante ao de vários estudos relatados na literatura. *Salmonella* spp não foi isolada de queijos Minas Frescal comercializados em Poços de Caldas (Almeida Filho, 1999), no Estado do Rio de Janeiro (Corbia et al., 1999; Almeida e Franco, 2003; Barros et al., 2004), em Belo Horizonte (Pereira et al., 1999), no Estado de Minas Gerais (Tinoco et al., 2002), e no Estado de São Paulo (Brigido et al., 2004).

Por outro lado, Peresi et al. (2001) analisaram amostras de queijos Minas Frescal comercializadas em feiras livres e supermercados da cidade de São José do Rio Preto, São Paulo e identificaram *Salmonella* spp. em duas amostras produzidas artesanalmente, isto é, produzidas a partir de leite cru.

Surtos de toxinfecções alimentares envolvendo queijos contaminados com *Salmonella* também já foram relatados na literatura; entretanto, em todos esses

trabalhos os queijos analisados foram produzidos a partir de leite cru (D'Aoust et al., 1985; Cody et al., 1999; Villar et al., 1999).

A ausência de *Salmonella* spp. nas amostras deste estudo pode ser admitida, possivelmente, em função de sua discreta incidência no leite, uma vez que é necessário que o rebanho esteja doente, ou que o homem que manipula o leite ou queijo na fábrica seja portador, ou, ainda, que se utilize água não potável no processamento do alimento (D'Aoust, 1989).

Além disso, todas as amostras de queijos analisadas neste estudo foram produzidas a partir de leite supostamente pasteurizado, uma vez que todas as marcas analisadas estão submetidas à inspeção, e esta proíbe a produção e o comércio de queijo Minas Frescal produzido a partir de leite cru. E é sabido que a pasteurização adequada do leite elimina a *Salmonella*.

4.2.4 *Staphylococcus aureus*

Em relação à presença de *S. aureus*, tanto amostras de queijo Minas analisadas no período seco quanto amostras analisadas no período chuvoso apresentaram resultados positivos para este patógeno.

Nas análises realizadas no período seco, 14 (28%) de um total de 50 amostras analisadas apresentaram resultados positivos para *S. aureus*. Estas amostras são provenientes de cinco marcas diferentes (B, D, H, I e J), ou seja, 50% das marcas analisadas apresentaram-se contaminadas. A tabela 6 mostra o número de amostras por marca positiva, bem como as respectivas contagens de *S. aureus* em cada uma.

Tabela 6. Número de amostras de queijos Minas Frescal positivas para *S. aureus* por marca analisadas no período seco e suas respectivas contagens

Marca de leite pasteurizado positiva para <i>S. aureus</i>	Amostra	Contagem (UFC mL ⁻¹)
B	B1	3 x 10 ⁴
D	D1	9 x 10 ⁴
	D2	3 x 10 ⁶
	D3	3 x 10 ⁶
H	H1	7,6 x 10 ³
	H2	1,14 x 10 ⁴
	H3	3 x 10 ³
I	I1	1,5 x 10 ⁵
	I2	5 x 10 ³
J	J1	3,4 x 10 ⁵
	J2	5 x 10 ⁴
	J3	4 x 10 ²
	J4	2,5 x 10 ⁵
	J5	1,5 x 10 ⁵

Dessas 14 amostras, 13, isto é, 92,85%, apresentaram contagens superiores a 10³ UFC por grama de queijo, que é o limite máximo estabelecido pela legislação brasileira (Brasil, 2001).

Nas análises realizadas no período chuvoso, 20 amostras (40%) de um total de 50 amostras analisadas apresentaram resultados

positivos para *S. aureus*. Estas amostras são provenientes de seis marcas diferentes (C, D, E, H, I e J), ou seja, 60% das marcas analisadas apresentaram-se contaminadas. A tabela 7 mostra o número de amostras positivas por marca, bem como as respectivas contagens de *S. aureus* em cada uma.

Tabela 7. Número de amostras de queijos Minas Frescal positivas para *S. aureus* analisadas no período chuvoso e suas respectivas contagens

Marca de leite pasteurizado positiva para <i>S. aureus</i>	Amostra	Contagem (UFC mL ⁻¹)
C	C1	3,0 x 10 ⁴
	C2	5,0 x 10 ⁴
	C3	9,0 x 10 ³
	C4	3,0 x 10 ⁶
D	D1	9,0 x 10 ³
	D2	1,1 x 10 ³
	D3	9 x 10 ⁴
	D4	9 x 10 ⁴
E	E1	4,0 x 10 ³
	E2	6,0 x 10 ⁶
	E3	5,6 x 10 ³
	E4	4,0 x 10 ²
H	H1	1,7 x 10 ³
	H2	4,7 x 10 ⁵
I	I1	9,0 x 10 ³
J	J1	9,0 x 10 ³
	J2	4,0 x 10 ⁵
	J3	1,9 x 10 ⁵
	J4	6,0 x 10 ⁵
	J5	3,0 x 10 ⁶

Dessas 20 amostras, 19 (95%) apresentaram contagens superiores a 10^3 UFC por grama de queijo, que é o limite máximo aceitável estabelecido pela legislação brasileira (Brasil, 2001).

Considerando os dois períodos analisados, um total de 34 amostras de queijo Minas Frescal foram positivas para *S. aureus*. Isto representa 34% de amostras positivas. Dessas, 32 (32%) apresentaram contagens de *S. aureus* superiores ao estabelecido na legislação brasileira (Brasil, 2001).

Além disso, 13 amostras de queijo Minas Frescal (13%) apresentaram contagens de *S. aureus* superiores a 10^5 UFC por grama de queijo. Este é o valor mínimo considerado pela literatura para a produção de enterotoxinas causadoras de toxinfecções alimentares.

Em relação às marcas de queijo Minas Frescal contaminadas por *S. aureus*, quatro (D, H, I e J) apresentaram-se contaminadas tanto no período seco quanto no período chuvoso. Outro dado relevante é que todas as amostras da marca J, as cinco analisadas no período seco e as cinco analisadas no período chuvoso, apresentaram-se contaminadas, sendo que nove amostras (90%) apresentaram valores de *S. aureus* superiores ao padrão legal vigente (10^3 UFC g^{-1}).

Ainda analisando-se especificamente as marcas de queijo Minas Frescal contaminadas, todas essas estão submetidas ao Serviço de Inspeção Municipal (SIM) de Juiz de Fora. Este dado pode indicar a necessidade de aperfeiçoamento deste serviço de inspeção.

Estima-se que 20% a 60% dos indivíduos possam ser portadores de *S. aureus*, sem manifestar qualquer sintoma, representando riscos de contaminação pela manipulação dos alimentos por meio das mãos e da secreção oronasal (Raddi et al., 1988;

Germano e Germano, 2003). Em estudos já se isolaram *S. aureus* de manipuladores de alimentos, superfícies e ar de ambiente de indústrias de laticínios (Iaria et al., 1980; Araújo-Arantes et al., 1982a; 1982b; Raddi et al., 1988; Brabes, 2005). Dessa forma, os manipuladores têm sido apontados como a principal fonte de contaminação do alimento (Pereira et al., 1999; Assumpção et al., 2003). Como o queijo Minas Frescal é um produto bastante manipulado durante a sua elaboração, a contaminação por *S. aureus* nesses queijos realmente pode ser oriunda dos manipuladores. Assumpção et al. (2003), ao realizarem um estudo em um laticínio produtor de queijos, também associaram a alta contaminação por *S. aureus* do queijo à elevada contagem do patógeno nas mãos e nos antebraços dos manipuladores.

Carmo et al. (2002) descreveram um surto de toxinfecção alimentar por *Staphylococcus* ocorrido em Manhuaçu, Minas Gerais, em 1999. Nessa ocasião, 50 indivíduos ficaram doentes pelo consumo de queijo Minas Frescal contaminado. As análises dos queijos consumidos demonstraram que *S. aureus* esteve presente em quantidades de $2,4 \times 10^3$ a $2,0 \times 10^8$ UFC / g e produziu as enterotoxinas SEA, SEB e SEC.

Nos alimentos processados, como no caso das amostras de queijo Minas Frescal analisadas, há destruição de *S. aureus* durante a pasteurização e a sua ocorrência indica geralmente contaminação pós-processamento (Michelin, 2006). Desta forma, o não uso de luvas ou a sanitização não adequada das mãos e antebraços podem ser os motivos das elevadas contagens do microrganismo no produto alimentício (Assumpção et al., 2003). Além disso, os equipamentos e os utensílios utilizados na preparação dos alimentos também podem atuar como fontes de contaminação (Adams e Motarjemi, 2002).

A presença de *S. aureus* em queijos, sobretudo em queijos Minas Frescal, é relatada por vários outros autores (Carmo et al., 1995; Sabioni e Maia, 1998; Almeida Filho e Nader Filho, 2000; Corbia, 2000; Corbia et al., 2002; Barros et al., 2004).

Os resultados obtidos no presente estudo são ligeiramente diferentes dos obtidos por Corbia (2000). Este autor analisou amostras de queijo Minas Frescal de três estados brasileiros (Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e observou que 10,56% das amostras, de cinco marcas diferentes, apresentaram positividade para *S. aureus*. Entretanto, os resultados obtidos por Almeida Filho e Nader Filho (2000), ao avaliaram queijos Minas Frescal comercializados na cidade de Poços de Caldas, Minas Gerais, evidenciaram a presença de *S. aureus* em 50% das amostras, cujas contagens revelaram valores médios em torno de 10^5 UFC g⁻¹. Resultados estes semelhantes aos obtidos no presente estudo. Nos estudos de Corbia (2000), de Almeida Filho e Nader Filho (2000) e no presente estudo, todas as amostras de queijo Minas Frescal analisadas foram provenientes de indústrias inspecionadas. É possível que a contaminação dos queijos nos três estudos seja proveniente de contaminação pós-pasteurização, considerando que este tratamento térmico seja corretamente realizado em indústrias sob serviço de inspeção.

Por outro lado, Loguercio e Aleixo (2001), que avaliaram queijos Minas Frescal comercializados em Cuiabá, Mato Grosso, detectaram 96,67% das amostras analisadas com valores de *S. aureus* superiores a 10^3 UFC / g, estando apenas uma amostra (3,33%) em conformidade com o padrão legal. Diferentemente do presente estudo, que detectou 32% das amostras com valores de *S. aureus* superiores a 10^3 UFC / g. Talvez essa diferença seja explicada pelo fato de que Loguercio e Aleixo (2001) analisaram amostras de queijos Minas

Frescal produzidos artesanalmente, a partir de leite cru, enquanto que o presente estudo analisou amostras de queijo Minas Frescal produzidos comercialmente e submetidos a serviço de inspeção.

Em outro estudo, 20% das amostras de queijo Minas Frescal analisadas por Araújo et al. (2002) estavam contaminadas por *S. aureus*, sendo que 17,7% dessas apresentavam valores acima do permitido pela legislação brasileira. Esses autores enfatizam que a presença de *S. aureus* em quantidades superiores ao limite preconizado pela legislação sugere contaminação cruzada por meio dos manipuladores e dos equipamentos, pasteurização inadequada do leite proveniente de vacas com mastite, e/ou a combinação desses fatores.

Barros et al. (2004) isolaram este patógeno de amostras de queijos Minas Frescal comercializadas no Rio de Janeiro. Rocha et al. (2006) avaliaram sete marcas de queijos Minas Frescal também comercializadas na cidade do Rio de Janeiro e observaram a presença de *S. aureus* em todas as marcas avaliadas, sendo que seis dessas apresentaram valores, para este microrganismo, acima do permitido pela legislação brasileira. Contagens elevadas de *S. aureus* em produtos lácteos podem estar relacionadas a más condições de armazenagem desses nos pontos de vendas.

É importante ressaltar, ainda, que nem a ausência de *S. aureus* ou a sua presença em pequeno número são garantias de que o alimento seja seguro, pois condições desfavoráveis para a sobrevivência desse microrganismo podem resultar em uma diminuição de sua população ou morte da célula microbiana, mas se quantidades suficientes de enterotoxinas já tiverem sido formadas, elas permanecem para induzir um quadro de intoxicação alimentar estafilocócica (Michelin, 2006).

Os resultados experimentais deste trabalho demonstram que a presença de *S. aureus* acima dos limites aceitáveis em 32% das amostras indica seu desacordo com o padrão legal vigente, sendo que 13% destas amostras foram produtos classificados como potencialmente capazes de causar toxinfecção alimentar. Acredita-se, portanto, que os achados deste trabalho sejam preocupantes, principalmente pelo fato de existirem amostras apresentando valores muito próximos ou superiores aos requeridos pelas amostras enterotoxigênicas para a produção de enterotoxinas em quantidades suficientes para a ocorrência de surtos de intoxicação alimentar estafilocócia.

Devido à ocorrência de amostras positivas para *S. aureus*, pode-se supor que o tratamento térmico do leite esteja sendo ineficiente, ou que esteja ocorrendo contaminação após este tratamento devido à manipulação ou contato com superfícies não sanitizadas ou que o leite cru esteja sendo usado na fabricação do queijo. Este fato está totalmente em desacordo com as recomendações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Maior atenção deve ser dada pelas autoridades sanitárias, uma vez que tais produtos colocam em risco a saúde do consumidor, além de comprometerem a qualidade e o prazo de validade dos mesmos.

Em relação às medidas de controle e profilaxia da presença de *S. aureus* em alimentos, eliminar esse patógeno é inviável, dada sua ampla difusão. Portanto, deve-se controlar sua contaminação e crescimentos subsequentes nos alimentos (Hayes, 1993). As enterotoxinas podem ser evitadas respeitando-se as regras higiênicas ao longo de toda a cadeia de produção de alimentos (Jay, 1994; Bourgeois et al., 1994). Além disso, é importante, na indústria, a aplicação do sistema de Análises de Perigo e Pontos Críticos de Controle (APPCC) para comparação do alimento, baseado na

identificação dos perigos específicos e nas medidas para controle da contaminação cruzada do alimento (Adams e Motarjemi, 2002).

A contaminação dos alimentos por *S. aureus* de origem humana pode ser bastante reduzida mediante diminuição da manipulação dos alimentos, higiene dos manipuladores e adoção de boas práticas de manuseio. O microrganismo deve ser destruído pelo calor (pasteurização) antes que se multiplique e os alimentos devem ser mantidos sob refrigeração, em temperaturas inferiores a 6 °C. Portanto, controlando-se os fatores que afetam o crescimento de *S. aureus*, a produção da enterotoxina também estará controlada (Assumpção et al., 2003).

5 CONCLUSÕES

A partir do trabalho realizado, considerando-se os resultados obtidos, pode-se concluir que:

As amostras de leite pasteurizado comercializadas em Juiz de Fora, Minas Gerais, analisadas neste estudo não revelaram a presença de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp., sugerindo baixa incidência desses patógenos no meio, ou, ainda, boa qualidade higiênico-sanitária das marcas de leite pasteurizado analisadas.

Staphylococcus aureus foi isolado em amostras de leite pasteurizado provenientes de laticínios inspecionados pelo Serviço de Inspeção Federal. Considerando que o processo de pasteurização corretamente realizado elimina este patógeno no leite, possivelmente a presença de *S. aureus* nestas amostras de leite pasteurizado é reflexo de contaminação pós-pasteurização.

L. monocytogenes e *S. aureus* foram isolados de amostras de queijo Minas

Frescal, demonstrando uma maior incidência destes microrganismos em produtos lácteos.

Várias amostras de queijos apresentaram contagens de *S. aureus* superiores aos padrões legais vigentes e, em alguns casos, por apresentarem contagens mais elevadas, foram consideradas como potencialmente capazes de causar intoxicação estafilocócica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AABO, S.; RASMUSSEN, O. F.; ROSSEN, L.; SORENSEN, P. D.; OLSEN, J. E. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes*, v. 7, p. 171-178, 1993.

ACKERS, M.; MAHON, B. E.; LEAHY, E.; GOODE, B.; DAMROW, T.; HAYES, P. S.; BIBB, W. F.; RICE, D. H.; BARETT, T. J.; HUTWAGNER, L.; GRIFFIN, P. M.; SLUTSKER, L. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *The Journal of Infectious Disease*, v. 177, n. 6, p. 1588-1593, 1998.

ADAMS, M.; MOTARJEMI, Y. *Organização Mundial de saúde/Segurança básica dos alimentos para profissionais da saúde*. São Paulo: Roca, 2002. 128 p.

ADESIYUN, A. A.; WEBB, J. A.; ROMAIN, H. T. Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bulk and composite milk and cattle handlers. *Journal of Food Protection*, v. 61, p. 629-632, 1998.

AHMED, A. M.; SALLAM, S. S. Prevalence of *E. coli* serotypes in raw milk

and some dairy products. *Assiut Veterinary Medicine Journal*, v. 25, n. 50, 1991.

AHMED, E. K.; HUSSEIN, S. Z. Incidence of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk and some pasteurized milk products and effect of boiling on its viability. *Assiut Veterinary Medical Journal*, v. 51, n. 105, p. 89-99, 2005 (Resumo).

AKKERMANS, A. D. L.; VAN ELSAS, J. D.; BRUJIN, F. J. *Molecular ecology manual*. Kluwer Academic: Dordrecht, The Netherlands, 1995. 488 p.

ALEKSIC, S.; KARCH, H.; BOCKEMÜHL, J. A biotyping scheme for shiga-like (Vero) toxin-producing *Escherichia coli* O157 and a list of serological cross-reactions between O157 and other Gram-negative bacteria. *Zentralbl Bakteriol*, v. 276, p. 221-230, 1992.

ALLMANN, M. HÖFELEIN, C.; KÖPPEL, E.; LÜTHY, J.; MEYER, R.; NIEDERHAUSER, C.; WEGMÜLLER, B.; CANDRIAN, U. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy products. *Research in Microbiology*, v. 146, p. 85-97, 1995.

ALMEIDA, P. F.; ALMEIDA, R. C. C. Métodos de detecção e mecanismos de virulência de *Listeria monocytogenes*. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 37, n. 2, p. 136-145, 2003.

ALMEIDA, P. M. P.; FRANCO, R. M. Bacteriological evaluation of Minas frescal cheese for pathogenic organisms of public health importance: *Staphylococcus aureus*,

Salmonella spp and faecal coliforms. *Revista Higiene Alimentar*, v. 17, n. 111, p. 79-85, 2003.

ALMEIDA FILHO, E. S.; LINDNER, A. L.; ALMEIDA, D. S.; SIGARINE, C. O.; FERREIRA, M. B. Perfil microbiológico de queijo tipo Minas Frescal, de produção artesanal e inspecionada, comercializado no município de Cuiabá-MT. *Revista Higiene Alimentar*, v. 16, n. 92/93, p. 51-56, 2002.

ALMEIDA FILHO, E. S.; NADER FILHO, A. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in cheese made in Brazil. *Revista de Saúde Pública*, v. 34, n. 6, p. 578-580, 2000.

ALTEKRUSE, S. F.; TIMBO, B. B.; MOWBRAY, J. C.; BEAN, N. H.; POTTER, M. E. Cheese-associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992: sanitary manufacturing practices protect consumers. *Journal of Food Protection*, v. 61, n. 7, p. 709-725, 1998.

AMÂNCIO, G. C. S. *Avaliação de métodos tradicionais e otimização da técnica PCR multiplex para detecção de Escherichia coli O157:H7*. 2002. 100p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ANSAY, S. E.; KASPAR, C. W. Survey of retail cheeses, dairy processing environments and raw milk for *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, v. 25, p. 131-134, 1997.

ANUNCIACÃO, L. L. C.; LINARDI, W. R.; CARMO, L. S.; BERGDOLL, M. S. Production of staphylococcal enterotoxin A

in white cheese. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 25, p. 257-276, 1994.

ARAÚJO, V. S.; PAGLIARES, V. A.; QUEIROZ, M. L. P.; FREITAS-ALMEIDA, A. C. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio the Janeiro, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, v. 92, n. 6, p. 1172-1177, 2002.

ARAÚJO-ARANTES, M. A.; UTHIDA-TANAKA, A. M.; CASTRO, O. C. *Staphylococcus aureus*: prevalência de portadores extra-hospitalares (restaurantes) na cidade de Ribeirão Preto, SP (1981). *Medicina*, v. 15, p. 225-232, 1982a.

ARAÚJO-ARANTES, M. A.; LIMA, E. G.; CASTRO, O. C. Prevalência de portadores de *Staphylococcus aureus* entre trabalhadores de uma fábrica de produtos alimentícios. *Revista Goiana de Medicina*, v. 28, p. 151-158, 1982b.

ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. C.; BRITO, J. R. F. Estabelecimento de PCR multiplex para *Salmonella* spp. e sua aplicação na identificação de isolados obtidos de leite. In. CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE, 6., 2007, Resende. *Anais...* Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2007 (CD-Rom).

ARMSTRONG, G. L.; HOLLINGSWORTH, J.; MORRIS JUNIOR, J. G. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into food supply of the developed world. *Epidemiologic Reviews*, v. 18, n. 1, p. 29-51, 1996.

ARNOLD, K. W.; KASPER, C. W. Starvation and stationary phase induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, p. 2364-2368, 1995.

ASATO, T.; KUMEDA, Y.; KAWAI, T.; SHIBATA, T.; ODA, H.; HARUKI, K.; NAKAZAWA, H.; KOZAKI, S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology and Infection*, v. 130, p. 33-40, 2003.

ASSUMPCÃO, E. G.; PICCOLI-VALLE, R. H.; HIRSCH, D.; ABREU, L. R. Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijo prato. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, n. 3, 2003.

ÁVILA, C. R.; GALLO, C. R. Pesquisa de *Salmonella* spp em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo “Minas Frescal” comercializados no município de Piracicaba – SP. *Scientia Agricola*, v. 53, p. 159-163, 1996.

AZNAR, R.; ALARCÓN, B. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. *Journal of Applied Microbiology*, v. 95, p. 958-966, 2003.

BALTER, S.; BENIN, A.; PINTO, S. W. L.; TEIXEIRA, L. M.; ALVIM, G. G.; LUNA, E.; JACKSON, C. K.; LACLAIRE, L.; ELLIOTT, J. A.; FACKLAM, R. R.; SCHUCHAT, A. Epidemic nephritis in Nova Serrana, Brazil. *The Lancet*, v. 355, p. 1776-1780, 2000.

BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: MURRAY, P. R.; BARRON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Ed). *Manual of clinical microbiology*. 8. ed. Washington: ASM Press, 2003. v. 1. p. 384 – 404.

BARROS, P. C. O. G.; NOGUEIRA, L. C.; RODRIGUEZ, E. M.; CHIAPPINI, C. C. J. Evaluation of the microbiological quality of Minas Frescal cheese sold in the municipally of Rio de Janeiro, RJ. *Revista Higiene Alimentar*, v. 18, n. 122, p. 57-61, 2004.

BARROW, G. I.; FELTHAM, R. K. A. (Ed.). *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1993, 331 p.

BAUDART, J.; LEMARCHAND, K.; BRISABOIS, A.; LEBARON, P. Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p. 1544-1552, 2000.

BEARS, R. E.; GIRARD, K. F. The effect of pasteurization on *Listeria monocytogenes*. *Canadian Journal Microbiology*, v. 4, p. 55-61, 1958.

BECKER, K.; ROTH, R.; PETERS, G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes and toxin shock syndrome toxin 1 gene. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, p. 2548-2553, 1998.

- BERGDOLL, M. S. *Staphylococcus aureus*. In: *Foodborne bacterial pathogens*. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 463 – 523.
- BETTS, G. D. Controlling *E. coli* O157:H7. *Nutrition & Food Science*, v. 30, n. 4, p. 183-186, 2000.
- BEUTIN, L.; MONTENEGRO, M. A.; ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; PRADA, J.; ZIMMERMAN, S.; STEPHAN, R. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 27, p. 2559-2564, 1989.
- BILLE, J.; ROCOURT, J.; SWAMINATHAN, B. *Listeria* and *Erysipelothrix*. In: MURRAY, P. R.; BARRON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Ed). *Manual of clinical microbiology*. 8. ed. Washington: ASM Press, 2003. v. 1. 1212 p.
- BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; BLANCO, J.; GONZALEZ E.A.; MORA, A.; PRADO, C.; FERNANDEZ, L.; RIO, M.; RAMOS, J.; ALONSO, M. P. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other verotoxin-producing *E. coli* in health cattle. *Epidemiology and Infection*, v. 117, p. 215-257, 1996.
- BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; GONZALEZ E.A.; MORA, A.; JANSEN, W.; GOMES, T. A. T.; ZERBINI, F.; YANO, T.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; BLANCO, J. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H:serotypes: relationship with toxic phenotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, p. 2958-2963, 1997.
- BOGGS, J. D.; WHITWAN, R. E.; HALE, L. M.; BRISCOE, R. P.; KAHN, S. E.; MacCORMACK, J. N.; MAILLARD, J. M.; GRAYSON, J. D.; SIGMON, K. S.; REARDON, J. W.; SAAH, J. R. Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese – North Caroline, October, 2000 – January, 2001. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 50, p., 1117-1118, 2001.
- BOOR, K. J. Fluid dairy product quality and safety: looking to the future. *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. 1-11, 2001.
- BOOTH, J. M. Progress in the control of mastitis. In: INTERNATIONAL MASTITIS SEMINAR, 3., 1995, Tel Aviv. *Proceedings...* Tel Aviv: International Dairy Federation, 1995. v. 2, p. 3-10.
- BOPP, C. A.; BRENNER, F. W.; FIELDS, P. I.; WELLS, J. G.; STROCKBINE, N. A. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: MURRAY, P. R.; BARRON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Ed). *Manual of clinical microbiology*. 8. ed. Washington: ASM Press, 2003. v. 1. 1212 p.
- BORDER, P. M.; HOWARD, J. J.; PLASTOW, G. S.; SIGGENS, K. W. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. *Letters of Applied Microbiology*, v. 11, p. 158-162, 1990.
- BORREGO, J.; CASTRO, D.; JIMENEZ-NOTARIO, M.; LUQUE, A.; MARTINEZ-MANZANARES, E.; RODRIGUEZ-AVIAL, C.; PILAZO, J. J. Comparison of epidemiology markers of *Salmonella* strains isolated from different sources in Spain.

Journal of Clinical Microbiology, v. 30, p. 3058-3064, 1992.

BORUCKI, M. K.; REYNOLDS, J.; GAY, C. C.; MCELWAIN, K. L.; KIM, S. H.; KNOWLES, D. P.; HU, J. Dairy farm reservoir of *Listeria monocytogenes* sporadic and epidemic strains. *Journal of Food Protection*, v. 67, p. 2496-2499, 2004.

BOURGEOIS, C. M.; MESCLE, J. F.; ZUCCA, J. *Microbiologia alimentaria*. Zaragoza: Acribia, S. A., 1994, 437 p.

BOYCE, M. D.; SWERDLOW, D. L.; GRIFFIN, P. M. *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic-uremic syndrome. *New England Journal of Medicine*, v. 333, n. 6, p. 364-368, 1995.

BRABES, K. C. S. *Identificação e capacidade de adesão de Staphylococcus spp isolados de manipuladores, superfícies e ar de ambiente de uma indústria de laticínios*. 2005. 81p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

BRADSHAW, J. G.; PEELER, J. T.; CORWIN, J. J.; HUNT, J. M.; TIERNEY, J. T.; LARKIN, E. P.; TWEDT, R. M. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in milk. *Journal of Food Protection*, v. 48, n. 9, p. 743-745, 1985.

BRADSHAW, J. G.; PEELER, J. T.; CORWIN, J. J.; BARNETT, J. E.; TWEDT, R. M. Thermal resistance of disease associated *Salmonella* Typhimurium in milk. *Journal of Food Protection*, v. 50, p. 95, 1987.

BRAMLEY, A. J.; CULLOR, J. S.; ERSKINE, R. J.; FOX, L. K.; HARMON, R. J.; HOGAN, J. S. et al. *Current Concepts of Bovine Mastitis*. 4. ed. Madison: National Mastitis Council, 1996. 64 p.

BRANCO, M. A. A. C. *Incidência de Listeria monocytogenes em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente*. 2002. 63p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico para inspeção sanitária de alimentos. Portaria n. 1428 de 26 de novembro de 1993. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 1993. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01rda.htm>> Acesso em: 27 nov 2006.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria n. 146 de 07 de março de 1996. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 1996.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria n. 364 de 04 de setembro de 1997. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos elaboradores/industrializadores de produtos de origem animal. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 1997.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria n. 46 de 10 de fevereiro de 1998. Manual genérico de procedimentos para APPCC em indústrias de produtos de origem animal. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 1998.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Resolução RDC n. 12 de 02 de janeiro de 2001. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 2001. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01rda.htm>> Acesso em: 27 nov 2006.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa n. 51 de 18 de setembro de 2002. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 2002.

BRICIO, S. M. L.; SILVA, C. G.; FINGER, R. M. Bacteriological quality of pasteurized type C milk produced in the state of Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 12, n. 1-3, p. 124-126, 2005.

BRIGIDO, B. M.; FREITAS, V. P. S.; MAZON, E. M. A.; PISANI, B.; PRNADI, M. A. G.; PASSOS, M. H. C. R. "Minas Frescal" cheese: evaluation of quality and its observance of Brazilian Guidelines. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 63, n. 2, p. 177-185, 2004.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos

leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, p. 129-135, 1999.

BUCHANAN, R. L.; STAHL, H. G.; BENCIVENGO, M. M.; DEL CORRAL, F. Comparison of lithium chloride-phenylethanol-moxalactam and modified Vogel Jonson agares for detection of *Listeria* spp in seafood. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 55, p. 599-603, 1989.

BULA, C. J.; BILLE, J. GLAUSER, M. P. An epidemic of foodborne listeriosis in western Switzerland: description of 57 cases involving adults. *Clinical Infectious Diseases*, v. 20, p. 66-72, 1995.

BUYONG, N.; KOK, J. LUCHANSKY, J. B. Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, p. 4842-4845, 1998.

CÂMARA, S. A. V.; AMARAL, G. B.; MULLER, M. T.; SILVEIRA, K. C. S.; ALMEIDA, T. N.; MEDEIRO, C. F. Microbiological evaluation of fresh handmade "Minas" cheese, for sale in the municipal market of Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Revista Higiene Alimentar*, v. 16, n. 101, p. 32-36, 2002.

CARDOSO, H. F. T.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 52, n. 1, 2000.

CARDOSO, L.; ARAÚJO, W. M. C. Quality parameters in commercialized cheeses in the Federal District during the 1997-2001 period. *Revista Higiene Alimentar*, v. 18, n. 123, p. 49-53, 2004.

CARMO, L. S. *Produção e purificação das enterotoxinas estafilocócicas A, B, C e D*. 1997. 177p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CARMO, L. S.; BERGDOLL, M. S. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brazil). *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 21, p. 320-323, 1990.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; ANUNCIACÃO, L. L. C.; BERGDOLL, M. S. Staphylococcal food poisoning in Minas Gerais State (Brazil). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 47, n. 2, p.113-122, 1995.

CARMO, L. S.; VIERIA, C.; REIS, J.; DARC, P. *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis present in food implicated in food poisoning. *Revista de Microbiologia*, v. 227, p. 122-125, 1996.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A.; FARIA, M. E.; PENA, E. C.; JETT, M.; HENEINE, L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology*, v. 19, p. 9-14, 2002.

CARNEIRO, L. A. M.; LINS, M. C.; GARCIA, F. R. A.; SILVA, A. P. S.; MAULLER, G. B.; ROSA, A. C. P.; ANDRADE, J. R. C.; FREITAS-

ALMEIDA, A. C.; QUEIROZ, M. L. P. Phenotypic and genotypic characterisation of *Escherichia coli* strains serogrouped as enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from pasteurised milk. *International Journal of Food Microbiology*, v. 108, n. 1, p. 15-21, 2006.

CARVALHO, J. D. G. *Avaliação da qualidade de queijos tipo Minas Frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializados em Campinas – SP*. 2003. 107p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CASAROTI, 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 Latino Americanos de Nutricion*, v. 44, n. 3, p. 158-163, 1994.

CHALKER, R. B.; BLASER, M. J. A review of human salmonellosis: III. Magnitude of *Salmonella* infection in the United States. *Reviews of Infectious Diseases*, v. 10, p. 111, 1988.

CHAPMAN, P. A.; WRIGHT, D. J.; HIGGINS, R. Untreated milk as a source of verotoxigenic *Escherichia coli* O157. *Veterinary Record*, v. 133, p. 171-172, 1993.

CHESNEY. P. J. Clinical aspects and spectrum of illness of toxic shock syndrome: overview. *Reviews of Infectious Diseases*, v. 11, p. 51-57, 1989.

CHIANG, Y. C.; LIAO, W. W.; FAN, C. M.; PAI, W. Y.; CHIOU, C. S.; TSEN, H. Y. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology*, v. 121, n. 1, p. 66-73, 2008.

CODY, S. H.; ABBOTT, S. L.; MARFIN, A. A.; SCHULZ, B.; WAGNER, P.; ROBBINS, K.; MOHLE-BOETANI, J. C.; VUGIA, D. J.; Two outbreaks of multidrug resistant *Salmonella* serotype Typhimurium DT 104 infections linked to raw-milk cheese in northern California. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 281, n. 19, p. 1805-1810, 1999.

COIA, J. E. Clinical, microbiology and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. *Immunology and Medical Microbiology*, v. 20, p. 01-09, 1998.

COIA, J. E.; JOHNSTON, Y.; STEERS, N. J.; HANSON, M. F. A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in raw meats, raw cow's milk and raw-milk cheeses in south-east Scotland. *International Journal of Food Microbiology*, v. 66, p. 63-69, 2001.

CONCIANI, D. L. *Avaliação do leite pasteurizado tipo C no estado de Mato Grosso do Sul*. Profissionalizante. 2006. 77p. (Especialização em Produção Agroindustrial) – Universidade para o desenvolvimento do Estado e da região do Pantanal, Campo Grande.

CORBIA, A. C. G. Estudo da prevalência sobre alguns patógenos de importância em saúde pública em queijos tipo “Minas Frescal”. 2000. 115p. Dissertação (Mestrado

em Medicina Veterinária) –Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

CORBIA, A. C. G.; NASCIMENTO, M. G. F.; OLIVERIA, C. Z. F.; NASCIMENTO, E. R. Análise bacteriológica para *Salmonella* spp. em queijo tipo Minas Frescal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. 20., 1999, Salvador. *Anais...* Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999. p. 387. Resumo.

CORBIA, A. C. G.; NASCIMENTO, M. G. F.; OLIVERIA, C. Z. F.; LIGNON, G. B.; NASCIMENTO, E. R. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em queijo tipo Minas Frescal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. 20., 1999, Salvador. *Anais...* Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999. p. 387. Resumo.

CORBIA, A. C. G.; NASCIMENTO, M. G. F.; OLIVEIRA, C. Z. F.; NASCIMENTO, E. R. *Staphylococcus aureus*: importância para a saúde pública e aspectos epidemiológicos. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 15p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 114).

CORBIA, A. C. G.; NASCIMENTO, M. G. F.; NASCIMENTO, E. R.; LIGNON, G. B. Research on *Listeria monocytogenes* and total plate count in Minas soft cheese. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 23, n. 2, p. 72-75, 2001.

CORBIA, A. C. G.; NASCIMENTO, M. G. F.; NASCIMENTO, E. R.; OLIVEIRA, C. Z. F.; LIGNON, G. B. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in Minas soft cheese and avaluation of culture media used in its isolation. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 24, n. 3, p. 122-126, 2002.

- CORDANO, A. M.; ROCOUT, J. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. *International Journal of Food Microbiology*, v. 70, n. 2, p. 175-178, 2001.
- CORDEIRO, C. A. M.; CARLOS, L. A.; MARTINS, M. L. L. Microbiological quality of grade C pasteurised milk from small processing factories in Campos dos Goitagazes, RJ. *Revista Higiene Alimentar*, v. 16, n. 92 / 93, p. 41-44, 2002.
- CURTS, G. D. W.; MITCHELL, R. G.; KING, A. F.; GRIFFIN, E. J. A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 8, p. 95-98, 1989.
- DALTON, C. B.; AUSTIN, C. C.; SOBEL, J.; HAYES, P. S.; BIBB, W. F.; GRAVES, L. M. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *New England Journal of Medicine*, v. 336, p. 100-105, 1997.
- DALY, P.; COLLIER, T.; DOYLE, S. PCR-ELISA detection of *Escherichia coli* in milk. *Letters in Applied Microbiology*, v. 34, p. 222-226, 2002.
- D'AOUST, J. Y. *Salmonella*. In: DOYLE, M. P. (Ed.). *Foodborne bacterial pathogens*. New York: INC, 1989. p. 327-446.
- D'AOUST, J. Y. *Salmonella* species. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). *Food Microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington: ASM Press, 1997. p. 129-158 (Cap 8).
- D'AOUST, J. Y.; WARBURTON, D. W.; SEWELL, A. M. *Salmonella typhimurium* phage-tyoe 10 from Cheddar cheese implicated in a major Canadian foodborne outbreak. *Journal of Food Protection*, v. 48, p. 1062-1066, 1985.
- DE BUYSER, M. L. D.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries. *International Journal of Food Microbiology*, v. 67, n. 1, p. 1-17, 2001.
- DEISINGH, A. K.; THOMPSON, M. Strategies for the detection of *Escherichia coli* O157:h7 in foods. *Journal of Applied Microbiology*, v. 96, p. 419-429, 2004.
- DESTRO, M. T. *Isolamento de Listeria spp. e estudo de sua ocorrência em carnes, leite e derivados*. 1990. 73p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- DESTRO, M. T.; SERRANO, A. M.; KABUKI, D. Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. *Food Control*, v. 2, n. 2, p. 110-112, 1991.
- DESTRO, M. T.; SERRANO, A. M.; KABUKI, D. Y. Comparison of two plating media for the isolation of *Listeria* spp from some Brazilian dairy and meat products. *Revista de Microbiologia*, v. 23, n. 4, p. 256-259, 1992.
- DIAS, E. T. Surtos de toxinfecção alimentar provocados por queijos comercializados em Minas Gerais, no período de 1992 a 1994. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 8., 1995, Juiz de Fora.

Anais... Juiz de Fora: Instituto de Laticínios Cândido Tostes, p. 143-144, 1995.

DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ, L.; FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J. F.; BRIONES, V.; BLANCO-CANCELO, J. L.; SUÁREZ-FERNÁNDEZ, G. Assessment of different selective agar media for enumeration and isolation of *Listeria* from dairy products. *Journal of Dairy Research*, v. 55, p. 579-583, 1988.

DONNELLY, C. W. Concerns of microbial pathogens in association with dairy foods. *Journal of Dairy Science*, v. 73, p. 1656-1661, 1990.

DONNELLY, C. W. Detection and isolation of *Listeria monocytogenes* from food samples: implications of sublethal injury. *Journal of AOAC International*, v. 85, p. 495-500, 2002.

DONNELLY, C. W.; BAIGENT, G. J. Method for flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 52, p. 689-695, 1986.

DORN, C. R. *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 206, n. 10, p. 1583-1585, 1995.

DOWENS, F. P.; ITO K. (Ed.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. 450 p.

DOYLE, M. P. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *International*

Journal of Food Microbiology, v. 12, p. 289-302, 1991.

DOYLE, M. P.; SCHOENI, J. L. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 48, p. 855-856, 1984.

DOYLE, M. P.; SCHOENI, J. L. Selective enrichment procedure for isolation of *Listeria monocytogenes* from faecal and biologic specimens. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 51, p. 1127-1129, 1986.

DOYLE, M. P. Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. *Food Technology*, v. 42, p. 169-171, 1988.

DOYLE, M. P.; ZHAO, T.; MENG, J.; ZHAO, S. *Escherichia coli* O157:H7. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). *Food Microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington: ASM Press, 1997. p. 171-191.

DUARTE, A. *Estudo da ocorrência de Escherichia coli Enterotoxigênica (ETEC) e "Shiga-toxin-producing" Escherichia coli (STEC) em produtos de laticínios*. 1999. 90p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Departamento de Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

DUARTE, G.; VAZ-VELHO, M.; CAPELL, C.; GIBBS, P. Efficiency of four secondary enrichment protocols in differentiation and isolation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* from smoked fish processing

- chains. *Journal of Food Protection*, v. 15, p. 163-168, 1999.
- DUNCAN, S. E.; HACKNEY, C. R. Relevance of *Escherichia coli* O157:H7 to the dairy industry. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, v. 14, n. 11, p. 656-660, 1994.
- EFFAT, B. A.; IBRAHIM, G. A.; DABIZA, N. M. A. Influence of temperature, sodium chloride, pH and some food preservatives on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. *Egyptian Journal of Food Science*, v. 29, n. 2, p. 197-213, 2001.
- ERKMEN, O. Growth of *Listeria monocytogenes* during manufacture and storage of Colby cheese. *Journal of Food Protection*, v. 58, p. 1201-1205, 1995.
- FARAH, S. M. S. S.; SILVA, L. R.; CASTILHOS, L.; KATO, M. A. M. F.; RAMOS, I. I.; VAZ, T. M. I.; IRINO, K. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle, Paraná, Brazil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. 22., 2003, Florianópolis. *Anais...* Florianópolis: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003. Resumo (MV093).
- FARBER, J. M.; SANDERS, G. W.; SPEIRS, J. I. D'AOUST, J. Y.; EMMONS, D. B. McKELLAR, R. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in inoculated and naturally contaminated raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, v. 7, p. 277-286, 1988.
- FARBER, J. M.; SANDERS, G. W.; MALCOLM, S. A. The presence of *Listeria* spp. in raw milk in Ontario. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 34, p. 95-100, 1988.
- FARBER, J. M.; SANDERS, G. W.; SPEIRS, J. I. Growth of *Listeria monocytogenes* in naturally-contaminated raw milk. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, v. 23, n. 3, p. 252-254, 1990.
- FARBER, J. M.; COATES, E. D. F.; BEAUSOLEIL, N.; FOURNIER, J. Feeding trials of *Listeria monocytogenes* with a nonhuman primate model. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, p. 2606-2608, 1991.
- FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, v. 55, p. 476-511, 1991.
- FARMER III, J. J. *Enterobacteriaceae*: introduction and identification. In: MURRAY, P. R.; BARRON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Ed). *Manual of clinical microbiology*. 8. ed. Washington: ASM Press, 2003. v. 1. 1212 p.
- FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, supl., p. 162-165, 2003.
- FERNANDEZ, A. T. Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos na cidade do Rio de Janeiro. *Revista Higiene Alimentar*, v. 17, n. 111, p. 58-63, 2003.

FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J. F.; DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ, L.; VÁZQUEZ-BOLAND, J. A.; BLANCO-CANCELO, J. L.; SUÁREZ-FERNÁNDEZ, G. *Listeria monocytogenes* dans le lait pasteurisé. *Canadian Journal Microbiology*, v. 32, p. 149-150, 1986.

FIGUEIREDO, E. A. T. *Ocorrência do gênero Listeria e avaliação da diversidade genética de Listeria monocytogenes através da Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) e sua distribuição em linha de processamento de leite pasteurizado tipo "C"*. 2000. 100p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biomédica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FLEMING, D. W.; COCHI, S. L.; MacDONALD, K. L.; BRONDUM, J.; HAYES, P. S.; PLIKAYTIS, B. D.; HOLMES, M. B.; AUDURIER, A.; BROOME, C. V.; REINGOLD, A. L. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New England Journal of Medicine*, v. 312, p. 404-407, 1985.

FLORENTINO, E. S.; MARTINS, R. S. Características microbiológicas do "queijo de coalho" produzido no Estado da Paraíba. *Revista Higiene Alimentar*, v. 13, n. 59, p. 43-48, 1999.

FLUIT, A. C.; TORENSMA, R.; VISSER, M. J. C.; AARSMAN, C. J. M.; POPPELIER, M. J. J. G.; KELLER, B. H. I.; KLAPWIJK, P.; VERHOEF, J. Detection of *Listeria monocytogenes* in cheese with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, p. 1289-1293, 1993.

FODE-VAUGHAN, K. A.; MAKI, J. S.; BENSON, J. A.; COLLINS, M. L. P. Direct PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, v. 37, p. 239-243, 2003.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). World Health Organization. Codex Alimentarius Commission. Proposed draft code of hygienic practice for milk and milk products (at step 3 of the procedure). In: JOINT FAO/WHO STANDARDS PROGRAMME. *Codex committee on food hygiene*, Washington: FAO/WHO, 1999.

FORSYTHE, S. J. *Microbiologia da segurança alimentar*. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.

FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. 182 p.

FRATAMICO, P. M.; DENG, M. Y. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in foods by multiplex PCR. *Journal of Food Protection*, supplement, 129, 1995.

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

GARCIA, P. M. Avaliação de um método de reação em cadeia da polimerase (PCR) na detecção de *Escherichia coli* O157:H7 em leite. 2006. 103p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GARRIDO, N. S.; MORAIS, J. M.; BRIGANTI, R. C.; OLIVEIRA, M. A.; BERGAMINI, S. A. V.; FÁVARO, R. M. D. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de leite pasteurizado proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto/SP. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 2, p. 141-146, 2001.

GELLIN, B. G.; BROOME, C. V. Listeriosis. *Journal of the American Medical Association*, v. 261, p. 1313, 1989.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. *Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos*. São Paulo: Varela, 2003. 655 p.

GITTER, M.; BRADLEY, R.; BLAMPIED, P. H. *Listeria monocytogenes* infection in bovine mastitis. *The Veterinary Record*, v. 25, p. 390-393, 1980.

GLASS, K. A.; LOELFELHOTZ, J. M.; FORD, J. P.; DOYLE, M. P. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, p. 2513-2516, 1992.

GONZALEZ, A. G. M. COUTINHO, C. A. S.; CERQUEIRA, A. M. F.; GUTH, B. E. C.; SOUZA, R. M.; LIBERAL, M. H. T.; POMBO, C. R. JOAQUIM, R. M.; ANDRADE, J. R. C. Virulence markers of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157:H7 and non-O157 isolated from healthy cattle in Rio de Janeiro state, Brazil. . In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. 21., 2001, Foz do Iguaçu. *Anais...* Foz do Iguaçu: Sociedade

Brasileira de Microbiologia, 2001. p. 104. Resumo.

GONZÁLEZ-GARCIA, E. A. Animal health and foodborne pathogens: enterohaemorrhagic O157:H7 strains and other pathogenic *Escherichia coli* virotypes (EPEC, ETEC, EIEC, EHEC). *Journal of Veterinary Sciences*, v. 5, n. 2, p. 103-115, 2002.

GOULET, V.; JACQUET, C.; VAILLANT, V.; REBIERE, I.; MOURET, E.; LORENTE, C.; MAILLOTE, E.; STAINER, F.; ROCOURT, J. Listeriosis from consumption of raw-milk cheese. *The Lancet*, v. 345, p. 1581-1582, 1995.

GOVARIS, A.; KOIDIS, P.; PAPTAEODOROU, K. Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 in sour milk, cows' milk yogurt and ewes' milk yogurt. *Journal of Dairy Research*, v. 69, p. 655-660, 2002.

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

GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemorrhagic uremic syndrome. *Epidemiologic Reviews*, v. 13, p. 60-98, 1991.

GUSMÃO, V. V.; GONÇALVES, T. M. V.; HOFFMAN, F. L. Microbiological quality of pasteurized milk types A, B and C obtained from commercial outlets in the region of São José do Rio Preto, SP. *Revista*

Higiene Alimentar, v. 19, n. 137, p. 95, 2005.

HANCOCK, D. D.; BESSER, T. E.; KINSEL, M. L.; TARR, P. I.; RICE, D. H.; PAROS, M. G. The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State. *Epidemiology and Infection*, v. 113, p. 199-207, 1994.

HASSAN, L. MOHAMMED, H. O.; McDONOUGH, P. L. Farm-management and milking practices associated with the presence of *Listeria monocytogenes* in New York state dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 51, n. 1-2, p. 63-73, 2001.

HATA, E.; KATSUDA, K.; KOBAYASHI, H.; OGAWA, T.; ENDÔ, T.; EGUCHI, M. Characteristics and epidemiologic genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitic milk in Hokkaido, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 68, n. 2, p. 165-170, 2006.

HAYES, P. S.; GRAVES, L. M.; SWAMINATHAN, B.; AJELLO, G. W.; MALCOLM, G. B.; WEAVER, R. E.; RANSOM, R.; DEEVER, K.; PLIKAYTIO, B. D.; SCHUCHAT, A.; WENGER, J. D.; PINNER, R. W.; BROOME, C. V. The *Listeria* study group. Comparison of three selective enrichment methods. *Journal of Food Protection*, v. 55, n. 12, p. 952-959, 1992.

HEESCHEN, W. H. Bacteriological quality of raw milk: legal requirements and payment systems – situation in the EU and IDF member countries. In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION SYMPOSIUM ON BACTERIOLOGICAL QUALITY OF

RAW MILK, 1996, Wolfpassing. *Proceedings...* Brussels: International Dairy Federation, 1996. p. 1-18.

HILL, W. F. The polymerase chain reaction: applications for detection of foodborne pathogens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 36, p. 123-173, 1996.

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*, v. 95, n. 5, 2000.

HORTON, L. R. Risk analysis and the law: international law, the World Trade Organization, Codex Alimentarius and national legislation. *Food Additives and Contaminants*, v. 18, p. 1057-1067, 2001.

HSU, S. C.; TSEN, H. Y. PCR primers designed from malic acid dehydrogenase gene and their use for detection of *Escherichia coli* in water and milk samples. *International Journal of Food Microbiology*, v. 64, p. 01-11, 2001.

HU, Y.; ZHANG, Q.; MEITZLER, J. C. Rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faeces by a multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology*, v. 87, p. 867-876, 1999.

HUBBERT, W. T.; HAGSTAD, H. V.; SPANGLER, E.; HINTON, M. H.; HUGHES, K. L. *Food safety and quality assurance*. 2. ed. Ames: Iowa State University, 1996. 305 p.

HUDSON, J. A.; LAKE, R. J.; SAVILL, M. G.; SCHOLLES, P.; McCORMICK, R. E.

Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in ham samples using immunomagnetic separation followed by polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*, v. 90, p. 614-621, 2001.

HUI, Y. H.; PIERSON, M. D.; GORHAM, J. R. *Foodborne disease handbook*. 2. ed., v.1. New York: Marcel Dekker, 2001. 642p.

HURD, S.; PHAN, Q.; HADLER, J. Multistate outbreak of listeriosis – United States, 2000. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 49, p. 1129-1130, 2000.

IARIA, S. T.; FURLANETTO, S. M.; CAMPOS, M. L. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* nas fossas nasais de manipuladores de alimentos em hospitais, São Paulo, 1976. *Revista de Saúde Pública*, v. 14, p. 93-100, 1980.

INGHAM, S. C.; LARSON, A.; SMUKOWSKI, M.; HOUCK, K.; JOHNSON, F. A.; JOHNSON, M.; BISHOP, R. Potencial uses of microbiological testing, cheese plant HACCP and quality assurance systems. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, v. 17, p. 774-780, 1997.

INGHAM, S. C.; SU, Y. C.; SPANGENBERG, D. S. Survival of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese brines. *International Journal of Food Microbiology*, v. 61, p. 73-79, 2000.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS (ICMSF). *Characteristics of microbial pathogens*. London: Blackie Academic & Professional, 1996. 513p.

INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS (IFT). *Bacteria associated with foodborne diseases*. Chicago: IFT, 2004. 25 p.

IRINO, K.; KATO, M. A. M. F.; VAZ, T. M. I.; SOUZA, M. A. C.; CRUZ, A. S.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M.; GUTH, B. E. Serotypes and virulence properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, São Paulo, Brazil. . In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. 22., 2003, Florianópolis. *Anais...* Florianópolis: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003. Resumo (MV015).

IVERSEN, C.; DRUGGAN, P.; FORSYTHE, S. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *International Journal of Food Microbiology*, v. 96, p. 133-139, 2005.

JABLONSKI, L. M.; BOHACH, G. A. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed). *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington: ASM Press, 1997. p. 353-375. (Cap. 19).

JAMES, S. M.; FANNIN, S. L.; AGEE, B. A.; HULL, B.; PARKER, E.; VOGT, J.; RUN, G.; WILLIAMS, J.; LIEB, L.; PRENDERGAST, T.; WERNER, S. B.; CHIN, J. Listeriosis outbreak associated with Mexican-style cheese – California. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 34, p. 357-359, 1985.

JAY, J. M. *Microbiologia moderna de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, S. A., 1994, 804 p.

JAY, J. M. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. *Food Control*, v. 7, n. 4/5, p. 209-214, 1996.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. Foodborne listeriosis In:_____. *Modern food microbiology*. 7. ed. Nova York: Springer Science Business Media, Inc., 2005. Cap. 25, p. 591 – 618.

JAYARAO, B. M.; HENNING, D. R. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. 2157-2162, 2001.

JENSEN, A.; FREDERIKSEN, W.; GERNER-SMIDT, P. Risk factors for listeriosis in Denmark, 1989-1990. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, v. 26, p. 171-178, 1994.

JERSEK, B.; TCHERNEVA, E.; RIJSENS, N.; HERMAN, L. Repetitive element sequence-based PCR for species and strain discrimination in the genus *Listeria*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 23, p. 55-60, 1996.

JOHNSON, F. A.; NELSON, J. H.; JOHNSON, M. Microbiological safety of cheese made from heat-treated milk, part II. *Journal of Food Protection*, v. 53, p. 519-540, 1990.

JOHNSON, W. M.; TYLER, S. D.; EWAN, E. P.; ASHTON, F. E.; POLLARD, D. R.; ROZEE, K. R. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxin shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, p. 426-430, 1991.

KABUKI, D. Y. *Rastreamento de Listeria monocytogenes em indústrias processadoras de queijo frescal tipo latino, nos estados unidos da América, empregando a subtipagem molecular*. 2004. 145p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

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*, v. 91, n. 2, p. 167-174, 2004.

KOO, K.; JAYKUS, L. A. Detection of *Listeria monocytogenes* from a Model Food by Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based PCR with an Asymmetric Fluorogenic Probe Set. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 2, p. 1032-1088, 2003.

KUNTZ, T. B.; KUNTZ, S. T. Enterohemorrhagic E. coli infection. *Primary Care Update Ob/Gyns*, v. 6, n. 6, p. 192-196, 1999.

LAI, K. K. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children and adults. *Medicine*, v. 80, p. 113-122, 2001.

LAILLER, R.; GRIMONT, F.; JONES, Y.; SANDERS, P.; BRISABOIS, A. Subtyping of Salmonella Typhimurium by pulsed-field gel electrophoresis and comparisons with phage types and resistance types. *Pathologie et Biologie*, v. 50, p. 361-368, 2002.

- LAMAITA, H. C.; CREQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Contagem de *Staphylococcus* sp e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 57, n. 5, 2005.
- LANGE, C.; CARDOSO, M.; SENCZEK, D.; SCHWARZ, S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Veterinary Microbiology*, v. 67, p. 127-141, 1999.
- LANGE, C.; PERES, N. D.; ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; GARCIA, P. M.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Identificação de *Listeria monocytogenes* pela reação em cadeia da polimerase. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS. 22., 2005, Juiz de Fora. *Anais...* Juiz de Fora: Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 2005. p. 150-153.
- LARSON, A. F.; JOHNSON, F. A.; NELSON, J. H. Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial cheese brines. *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 1860-1868, 1999.
- LECLERC, V.; DUFOUR, B.; LOMBARD, B.; GAUCHARD, F.; GARIN-BASTUJI, B.; SALVAT, G.; BRISABOIS, A.; POUMEYROL, M.; DE BUYSER, M. L.; GNANOU-BESSE, N.; LAHELLEC, C. Pathogens in meat and milk products: surveillance and impact on human health in France. *Livestock Production Science*, v. 76, n. 2, p. 195-202, 2002.
- LEITE JÚNIOR, A. F. S.; FLORENTINO, E. R.; OLIVEIRA, E. B. D. de; TORRANO, A. D. M. Qualidade microbiológica do “queijo de coalho” comercializado a temperatura ambiente ou sob refrigeração, em Campina Grande - PB. *Revista Higiene Alimentar*, v.14, n. 73, p. 53-59, 2000.
- LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetic and Molecular Research*, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.
- LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *Journal of Infectious Diseases*, v. 155, p. 377-389, 1987.
- LI, W. C.; CHIANG, C. S.; CHIU, N. C. Characterization of group D1 non-typhoid *Salmonella* isolates by serotyping and pulsed field gel electrophoresis. *Acta Paediatrica Taiwan*, v. 40, p. 430-433, 1999.
- LIEBANA, E.; GARCIA-MIGURA, L.; CLOUTING, C.; CASSAR, C. A.; CLIFTON-HADLEY, F. A.; LINDSAY, E. A.; THRELFALL, E. J.; CHAPPELL, S. A.; DAVIES, R. H. Investigation of the genetic diversity among isolates of *Salmonella enterica* serovar Dublin from animals and humans from England, Wales and Ireland. *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, p. 732-744, 2002.
- LIEWEN, M. B.; PLANTZ, M. W. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Nebraska. *Journal of Food Protection*, v. 51, p. 840-841, 1988.
- LIEBISCH B; SCHWARZ, S. Molecular typing *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis isolates. *Journal of*

Medical Microbiology, v. 44. p. 52-59, 1996.

LING, M. L.; GOH, K. T.; WANG, G. C. Y.; NEO, K. S.; CHUA, T. An outbreak of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium, DT104 linked to dried anchovy in Singapore. *Epidemiology and Infection*, v. 128, p. 1-5, 2002.

LINNAN, M. J.; MASCOLA, L.; MANTELL, C.; BERCROFT, D.; DOVE, B.; FARMER, K.; TONKIN, S.; YEASTS, N.; STAMP, R.; MICKLESON, K. Epidemic perinatal listeriosis. *Pediatric Infectious Diseases*, v. 3, p. 30-34, 1984.

LINNAN, M. J.; MASCOLA, L.; DONG LOU, X.; GOULET, V.; MAY, S.; SALINEM, C.; HIRD, D. W.; YONEKURA, M. L.; HAYES, P.; WEAVER, R.; AUDURIER, A.; PLIKAYTIS, B. D.; FANNIN, S. L.; KLEKS, A.; BROOME, C. V. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *New England Journal of Medicine*, v. 319, p. 823-828, 1988.

LIOR, H. C. *E. coli* O157:H7 and verotoxigenic *E. coli*. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, v. 13, n. 10, p. 592, 1993.

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. *Ciência Rural*, v. 31, n. 6, p. 1063-1067, 2001.

LOVETT, J. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in dairy products. *Journal Association of Official Analytical Chemists*, v. 71, p. 658-660, 1988.

LOVETT, J.; FRANCIS, D. W.; HUNT, J. M. *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence, and pathogenicity. *Journal of Food Protection*, v. 50, n. 3, p. 188-192, 1987.

LOW, J. C.; DONACHIE, W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Veterinary Journal*, v. 153, p. 09-29, 1997.

LUPPENS, Z. B. I.; REIJ, M. W.; VAN DER HEIJDEN, R. W. L.; ROMBOUTS, F. M.; ABEE, T. Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 9, p. 4194-4200, 2002.

LYYTIKÄINEN, O.; AUTIO, T.; RUTTU, P.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; MIETTINEN, M.; HATAKKA, M.; MIKKOLA, J.; ANTTILA, V. J.; JOHANSSON, T.; RENTALA, L.; AALTO, T.; KORKEALA, H.; SIITONEN, A. An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. *Journal of Infectious Diseases*, v. 181, p. 1838-1841, 2000.

MACEDO, R. E. F.; PFLANZER JÚNIOR, S. B. Evaluation of the microbiological quality of type C pasteurized milk marketed in the metropolitan region of Curitiba, PR. *Revista Higiene Alimentar*, v. 19, n. 128, p. 103-108, 2005.

MACKEY, B. M.; BRATCHELL, N. The heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 9, p. 89-94, 1989.

MANHANI, M. R. *Desempenho da metodologia para isolamento e contagem de Escherichia coli O157:H7 em leite e queijo e sua ocorrência em queijo Minas Frescal produzidos comercialmente*. 2000. 89p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MANNA, S. K.; BRAHMANE, M. P.; DAS, R.; MANNA-CHADANA; BATABYAL, S. Detecção of *Escherichia coli* O157 in foods of animal origin by culture and multiplex polymerase chain reaction. *Journal of Food Science and Technology*, v. 46, n. 1, p. 77-79, 2006.

MANZANO, M.; COCOLIN, L.; CANTONI, C.; COMI, G. A rapide method for the identification and partial serotyping of *Listeria monocytogenes* in food by PCR and restriction enzyme analysis. *International Journal of Food Microbiology*, v. 42, n. 3, p. 207-212, 1998.

MARSHALL, R. T. (Ed.). *Standard methods for the examination of dairy products*. 16. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1992. 546 p.

MASLOW, J.; MULLIGAN, M. E. Epidemiologic typing systems. *Infectious Control Hospital Epidemiology*, v. 17, p. 595-604, 1996.

MASSA, S. ALTIERI, C.; QUARANTA, V.; DE PACE, R. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in yoghurt during preparation and storage at 4 °C. *Letters in Applied Microbiology*, v. 24, p. 347-350, 1997.

MARTIN, R. S.; SUMARAH, R. K.; MacDONALD, M. A. A synthetic based medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. *Clinical and Investigative Medicine*, v. 7, p. 233-237, 1984.

MATSUNAGA, T.; KAMATA, S.; KIKIICHI, N. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. *Journal of Medical Science*, v. 55, p. 297-300, 1993.

McGAUGHLIN, J. *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 63, p. 01-11, 1987.

McKILLIP, J. L.; JAYKUS, L. A.; DRAKE, M. A. A comparison of methods for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 from artificially-contaminated dairy products using PCR. *Journal of Applied Microbiology*, v. 89, p. 49-55, 2000.

McLAUHLIN, J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control*, v. 7, p. 187-193, 1996.

McLAUHLIN, J. The pathogenicity of *Listeria monocytogenes*: a public health perspective. *Reviews in Medical Microbiology*, v. 8, p. 01-14, 1997.

McLAUHLIN, J.; HALL, S. M.; VELANI, S. K.; GILBERT, R. J. Human listeriosis and paté: a possible association. *British Medical Journal*, v. 303, p. 773-775, 1991.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAAIG, L. F.; BRESEE, J. S.;

- SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, v. 5, p. 607-625, 1999.
- MEAD, P. S.; GRIFFIN, P. M. *Escherichia coli* O157:H7. *The Lancet*, v. 352, p. 1207-1212, 1998.
- MECHIE, S. C.; CHAPMAN, P. A.; SIDDONS, C. A. A fifteen month study of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd. *Epidemiology and Infection*, v. 188, p. 17-25, 1997.
- MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for the detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin, and methicillin resistance. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, p. 1032-1041, 2000.
- MEREGHETTI, L.; LANOTTE, P.; SAVOYE-MARCZUK, V.; MARQUET VAN DER MEE, N.; AUDURIER, A.; QUENTIN, R. Combined ribotyping and random multiprimer DNA analysis to probe the population structure of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 6, p. 2849-2857, 2002.
- MEYRAND, A.; VERNOZY-ROZAND, C. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in different cheeses. *Revue Medicine Veterinaire*, v. 150, n. 7, p. 601-616, 1999.
- MICHELIN, A. F. Surto de intoxicação alimentar estafilocócica no município de Birigüi, São Paulo. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 65, n. 1, p. 46-49, 2006.
- MILLER, M. A.; PAIGE, J. C. Other food borne infections. *Veterinary Clinics of North America*, v. 14, n. 1, p. 71-89, 1998.
- MORAES, C. R.; FUENTEFRIA, A. M.; ZAFFARI, C. B.; CONTE, M.; ROCHA, J. P. A. V.; SPANAMBERG, A.; VALENTE, P.; CORÇÃO, G.; COSTA, M. Qualidade microbiológica de leite cru produzido em cinco municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 33, n. 3, p. 259-264, 2005.
- MORGAN, G. M.; NEWMAN, C. P.; PALMER, S. R. First recognized community outbreak of hemorrhagic colitis due to verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the UK. *Epidemiology and Infection*, v. 101, p. 83-91, 1988.
- MORGAN, G. M.; NEWMAN, C. P.; HUTCHINSON, D. N.; WALKER, A. M.; ROWE, B.; MAJID, F. Verotoxin producing *Escherichia coli* infections associated with the consumption of yogurt. *Epidemiology and Infection*, v. 111, p. 181-187, 1993.
- MOREIRA, C. N.; PEREIRA, M. A.; BROD, C. S.; RODRIGUES, D. P.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in southern Brazil. *Veterinary Microbiology*, v. 93, p. 179-183, 2003.
- MURIAMA, P. M. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. *Journal of Food Protection*, v. 59, p. 54-63, 1996.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. *Medical microbiology*. 3. ed. Mosby-Year Book, 1998, p. 175 – 188.

MUYTJENS, H. L.; ROELOFS-WILLMENSE, H.; JASPER, G. H. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 26, p. 743-746, 1988.

NICHOLS, G.; GREENWOOD, M.; LOUVOIS, J. The microbiological quality of soft cheese. *PHLS Microbiology Digest*, v. 13, n. 2, p. 68-75, 1997.

NICOLAU, E. S. *Avaliação das condições higiênico-sanitárias de indústrias de laticínios produtoras de queijo tipo mussarela na região de Goiânia-GO, com ênfase para o Staphylococcus aureus*. 2000. 191p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

NORTON, D. M.; McCAMEY, M. A.; GALL, K. L.; SCARLET, J. M.; BOOR, K. J.; WIEDMANN, M. Molecular studies on the ecology of *Listeria monocytogenes* in smoked fish processing in industry. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 1, p. 198-205, 2001.

NOTERMANS, S. H. W.; DUFRENNE, J.; LEIMESTER-WACHTER, M.; DOMANN, E.; CHAKRABORTY, T. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, p. 2666-2670, 1991.

NUNES, E. L. C.; SANTOS, K. R. N.; MONDINO, P. J. J.; BASTOS, M. C. F.; GIAMBIAGI-DE-MARVAL, M. Detection of ileS-2 gene encoding mupirocin resistance in methicillin-resistant

Staphylococcus aureus by multiplex PCR. *Diagnostic Microbiology Infectious Diseases*, v. 34, p. 77-81, 1999.

OKSÜZ, O.; ARICI, M.; KURULTAY, S.; GÜMUS, T. Incidence of *Escherichia coli* O157 in raw milk and white pickled cheese manufactured from raw milk in Turkey. *Food Control*, v. 15, n. 6, p. 453-456, 2004.

OLIVEIRA, A. N. *Bactérias do gênero Listeria em leite e derivados no comércio varejista de Goiânia, GO*. 1993. 60p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

OLIVER, S. P.; JAYARAO, B. M.; ALMEIDA, R. A. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 2, n. 2, p. 115-129, 2005.

OLSEN, S. J.; YING, M.; DAVIS, M. F.; DEASY, M.; HOLLAND, B.; LAMPIESTRO, L.; BAYSINGER, M.; SASSANO, F.; POLK, L. D.; GORMLEY, B.; HUNG, M. J.; PILOT, K.; ORSINI, M.; VAN DUYN, S.; RANKIN, S.; GENESE, C.; BRESNITZ, E. A.; SMUCKER, J.; MOLL, M.; SOBEL, J. Multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium infection from milk contaminated after pasteurization. *Emerging Infectious Diseases*, v. 10, n. 5, p. 932-935, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). *Food safety*. Report by the Director-General. Washington: WHO/OMS, 1999. 9 p.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). *Foodborne diseases, emerging*. World Health Organization, Janeiro de 2002a. Disponível em: <www.who.int/mediacentre/factsheets/fs124/en>. Acesso em: 27 nov. 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). *Food safety and foodborne illness*. World Health Organization, Janeiro de 2002b. Disponível em: <www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en>. Acesso em: 27 nov. 2006.

OUTBREAK of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheeses curds – Wisconsin, June 1998. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 49, n. 40, p. 911-913, 2000.

ÖZTURKOGTU, S.; GÜRAKAN, C.; ALPAS, H. Behaviour and control of *Listeria innocua* during manufacture and storage of Turkish white cheese. *European Food Research and Technology*, v. 222, p. 614-621, 2006.

PADILHA, M. R. F.; FERNANDES, Z. F.; LEAL, T. C. A.; LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M. P. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 34, n. 2, 2001.

PARK, S. I.; SPAHR, U.; JEMMI, T.; SALMAN, M. D. Risk factors for *L. monocytogenes* contamination of dairy products in Switzerland, 1990-1999. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 53, n. 1, p. 55-65, 2002.

PARSONNET, J.; MODERN, P. A.; GIACOBBE, K. D.; Effect of tampon composition on production of toxic shock syndrome toxin-1 by *Staphylococcus aureus* in vitro. *Journal of Infectious Diseases*, v. 173, p. 98-103, 1996.

PELISSER, M. R.; MENDES, S. D. C.; SUTHERLAND, A. D.; BATISTA, C. R. V. Detection of *Listeria* species in refrigerated chicken carcasses using clearview™ and a modified conventional culture method. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 32, n. 2, 2001.

PENG, H.; SHELEF, L. A. Rapid detection of low levels of *Listeria* in foods and next-day confirmation of *L. monocytogenes*. *Journal of Microbiology Methods*, v. 41, n. 2, p. 113-120, 2000.

PEREIRA, M. L.; GASTELOIS, M. C. A.; BASTOS, E. M. A. F.; CAIAFFA, W. T.; FALEIRO, E. S. C. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo Minas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, n. 5, 1999.

PEREIRA, M. L.; PEREIRA, J. L.; SERRANO, A. M. Estafilococos e alimentos: possibilidades de disseminação através do portador humano e animal. *Revista Higiene Alimentar*, v. 13, p. 48-55, 1999.

PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; PEREIRA, J. L. Comportamento de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas, em alimentos experimentalmente inoculados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 21, n. 2, p. 171-175, 2001.

- PERESI, J. T. M.; GRACIANO, R. A. S.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; LIMA, S. I.; RIBEIRO, A. K.; CARVALHO, I. S.; LIMA, M. Fresh hand-made and manufactured Minas Frescal cheese: microscopic and microbiological examination, and antimicrobial sensitivity testing. *Revista Higiene Alimentar*, v. 15, n. 83, p. 63-70, 2001.
- PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; TEIXEIRA, I. S. C.; LIMA, S. I.; CARNICEL, F. A.; HOFFMANN, F. L. Surto de doenças transmitidas por alimentos contaminados por *Staphylococcus aureus*, ocorridos no período de dezembro de 2001 a abril de 2003, na região de São José do Rio Preto – SP. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 63, n. 2, p. 232-237, 2004.
- PICOLI, S. U.; BESSA, M. C.; CASTAGNA, S. M. F.; GOTTARDI, C. P. T.; SCHMIDT, V.; CARDOSO, M. Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo frescal de leite de cabra em laticínios. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 1, 2006.
- PIGATTO, C. P.; FARAH, S. M. S. S.; RODRIGUEZ, M. C.; SILVA, L. R.; LORIA, G.; CALOMENO, M. A. *Escherichia coli* O157:H7 em bezerros leiteiros de propriedades da região sudeste do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. 22., 2003, Florianópolis. *Anais...* Florianópolis: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003. Resumo (MV167).
- PIMENTA, F. C.; FURLANETTO, S. M. P.; MAYER, L. W.; TIMENETSKY, J.; SANTOS, M. A. A. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from foods. *Revista de Microbiologia*, v. 30, n. 4, 1999.
- PINI, P. N.; GILBERT, R. J. A comparison of two procedures for the isolation of *Listeria monocytogenes* from raw chickens and soft cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, v. 7, p. 331-337, 1988.
- PINTO, M.; BURRI, S.; MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; GIBBS, P. A. Comparison of Oxford agar, PALCAM and *Listeria monocytogenes* Blood Agar for recovery *L. monocytogenes* from foods and environmental samples. *Food Control*, v. 12, n. 8, p. 511-514, 2001.
- PITCHER, D. G.; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, v. 8, p. 151-156, 1989.
- PITT, W. M.; HARDEN, T. J.; HULL, R. R. *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. *The Australian Journal of Dairy Technology*, v. 54, n. 1, p. 49-65, abr., 1999.
- PRADO, E. H. R. B.; TRISTÃO, L. C. S.; GOMES, M. J. P.; CERQUEIRA, A. M. F.; GUTH, B. E. C.; ANDRADE, J. R. C. Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) gene sequences in health cattle from Rio Grande do Sul state, Brazil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. 21., 2001, Foz do Iguaçu. *Anais...* Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2001. p. 96. Resumo.
- PRITCHARD, T. J.; DONNELLY, C. W. Combined secondary enrichment of primary

enrichment broths increases *Listeria* detection. *Journal of Food Protection*, v. 62, p. 532-535, 1999.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. K.; CARTER, G. R. *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Mosby, 2000. 648 p.

RADDI, M. S. M. G. M.; LEITE, C. Q. F.; MENDONÇA, C. P. *Staphylococcus aureus*: portadores entre manipuladores de alimentos. *Revista de Saúde Pública*, v. 22, p. 36-40, 1988.

RAGHUBEER, E. V.; MATCHES, J. R. Temperature range for growth of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and selected coliforms in *E. coli* medium. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, p. 803-805, 1990.

RAHN, K.; DE GRANDIS, S. A. ; CLARKE, R. C. ; McEWEN, S. A. ; GALAN, J. E.; GINOCCHIO, C. ; CURTISS III, R.; GYLES, C. L. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol. Cell. Probes*, v.6, p.271-279, 1992.

RAHN, K.; RENWICK, S. A.; JOHNSON, R. P.; WILSON, J. B.; CLARKE, R. C.; ALVES, D.; McEWEN, S.; LIOR, H.; SPIKA, J. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle and the dairy farm environment. *Epidemiology and Infection*, v. 119, p. 251-259, 1997.

RAPINI, L. S.; TEIXEIRA, J. P.; MARTINS, N. E.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas

de *Staphylococcus* sp isoladas de queijo tipo coalho. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 56, n. 1, 2004.

RAPINI, L.S.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; VERAS, J. F.; SOUZA, M. R. Presença de *Staphylococcus* spp produtores de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico em manipuladores de queijo de cabra. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 57, n. 6, 2005.

RASMUSSEN, M. A.; CASEY, T. A. Environmental and food safety aspects of *Escherichia coli* O157:H7 infections in cattle. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 27, n. 2, p. 57-73, 2001.

RATNAM, S. MARCH, S. B.; AHMED, R.; BEZANSON, G. S.; KASATIYA, S. Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 26, p. 2006-2012, 1988.

REILLY, W. J. *Escherichia coli* O157 in Scotland – an overview. *SCHIEH*, v. 97, n. 13, p. 04-05, 1997.

RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R. *Microbiologia prática: roteiro e manual*. São Paulo: Atheneu, 1998. 112 p.

RIJPENS, N.; HERMAN, L. Comparison of selective and nonselective primary enrichments for the detection of *Listeria monocytogenes* in cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, p. 15-22, 2004.

RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D.; McGEE, H. B.;

WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; HEBERT, R. J.; OLSCOTT, E. S.; JOHNSON, L. M.; HARGRETT, N. T.; BLAKE, P. A.; COHEN, M. L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England Journal of Medicine*, v. 308, p. 60-83, 1983.

ROCHA, J. A. K. *Estudo da presença de Listeria monocytogenes e Bacillus cereus em indústria processadora de queijo Minas Frescal*. 2005. 73p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006.

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

RODRIGUES, D. A.; FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T. Evaluation of the efficiency of threes selective agars for *L. monocytogenes* isolation. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, suppl., 2003.

RODRIGUES, K. L.; MOREIRA, A. N.; ALMEIDA, A. T. S.; CHIOCHETTA, D.; RODRIGUES, M. J.; BROD, C. S.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. *Ciência Rural*, v. 34, n. 1, 2004.

RODRIGUEZ, L. D.; FERNANDEZ, G. S.; FERNANDEZ, J.; GARAYZABEL, F.; FERRI, E. R. New methodology for isolation of *Listeria* microorganisms from heavily contaminated environments. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 47, p. 1188, 1984.

ROHRBACH, R. W.; DRAUGHON, F. A.; DAVIDSON, P. M.; OLIVER, S. P. Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella* in bulk tank milk: risk factors and risk of human exposure. *Journal of Food Protection*, v. 55, p. 93-97, 1992.

ROSENOW, E. M.; MARTH, E. H. Growth of *Listeria monocytogenes* in skim, whole and chocolate milk, and in whipping cream during incubation at 4, 8, 13, 21 and 35 °C. *Journal of Food Protection*, v. 50, n. 6, p. 452-459, 1987.

ROSSI, B. S. *Ocorrência de Escherichia coli em queijo tipo Minas frescal comercializado na cidade de Araguaína, TO*. 2004. 56p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal.

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

RYAN, C. A.; NICKELS, N. T.; HARGRETT-BEAN, N. T.; POTTER, M. F.; ENDO, T.; MAYER, L.; LANGKOP, C. W.; GIBSON, L.; McDONALD, R. C.; KENNEY, R. T.; PUHR, N. D.; McDONNELL, P. J.; MARTIN, R. J.;

COHEN, M. L.; BLAKE, P. A. Massive outbreak of antimicrobial-resistant salmonellosis traced to pasteurized milk. *Journal of the American Medical Association*, v. 258, p. 3269-3274, 1987.

SÁ, M. A. R. Perfil microbiológico do queijo Minas Frescal comercializado no município de Uberlândia – MG. *Revista Higiene Alimentar*, v. 17, n. 104-105, p. 169-170, 2003.

SABIONI, J. G.; MAIA, A. R. P. Correlação entre a produção de *Staphylococcus aureus* e a atividade de termonuclease em queijo Minas Frescal. *Revista Higiene Alimentar*, v. 12, n. 54, p. 13-17, 1998.

SABIONI, J. G.; HIROOKA, E. Y.; SOUZA, M. L. R. Intoxicação alimentar por queijo minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 458-461, 1988.

SABIONI, J. G. Intoxicação estafilocócica causada por queijo tipo minas em Ouro Preto (MG), 1992. *Higiene Alimentar*, v. 8, n. 33 p. 22-23, 1994.

SABIONI, J. G.; MAIA, A. R. P. Correlação entre a população de *Staphylococcus aureus* e a atividade de termonuclease, em queijos Minas-frescal. *Revista Higiene Alimentar*, v. 12, p. 48-50, 1998.

SALTIJERAL, J. A.; ALVAREZ, V. B.; GARCIA, B. Presence of *Listeria monocytogenes* in Mexican cheeses. *Journal of Food Safety*, v.19, n. 4, p. 241-247, 1999.

SANDVANG, D.; JENSEN, L. B.; BAGGESEN, D. L.; BALODA, S. B. Persistence of a *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clone in Danish pig production units and farmhouse environment studied by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). *Microbiology Letters*, v. 187, p. 21-25, 2000.

SANT'ANA, A. S.; AZEREDO, D. R. P. Comparação entre o sistema Petrifilm RSA® e a metodologia convencional para a enumeração de estafilococos coagulase positiva em alimentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 3, 2005.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; MORAES, L. B.; TAMANINI, R.; SILVA, W. P. Estafilococos: morfologia das colônias, produção de coagulase e enterotoxina a, em amostras isoladas de leite cru refrigerado. *Ciências Agrárias*, v. 27, n. 4, p. 639-646, 2006.

SANTOS, D. A. *O papel do manipulador de alimentos em surtos de intoxicação alimentar causados por espécies de Staphylococcus aureus ocorridos em quatro cidades do Estado de Minas Gerais, Brasil*. 2003. 85p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SANTOS, W. L. M. Avaliação microbiológica de saladas cruas e cozidas servidas em restaurantes industriais da cidade de Belo Horizonte. *Revista Higiene Alimentar*, v. 11, n. 40, p. 26-30, 1997.

SÃO PAULO, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE). *Manual das doenças*

transmitidas por alimentos: Staphylococcus aureus / intoxicação alimentar. São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br>>. Acesso em: 21 Out 2007.

SCHEU, P. M.; BERGHOF, K.; STAHL, U. Detection of pathogenic and spoilage microorganisms in food with the polymerase chain reaction. *Food Microbiology*, v. 15, p. 13-31, 1998.

SCHLECH, W. F.; LAVIGNE, P. M.; BORTOLUSSI, R. A.; ALLEN, A. C.; HALDANE, E. V.; WORT, A. J.; HIGHTOWER, A. W.; JOHNSON, S. E.; KING, S. H.; NICHOLLS, E. S.; BROOME, C. V. Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. *New England Journal of Medicine*, v. 308, p. 203-206, 1983.

SCHMITZ, F. J.; STEIERT, M.; HOFMANN, B.; VERHOEF, J.; HADDING, U.; HEINZ, H. P.; KÖHRER, K. Development of a multiplex-PCR for direct detection of genes for enterotoxin B and C, and toxin shock syndrome toxin-1 in *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Medical Microbiology*, v. 47, p. 335-340, 1998.

SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C. V. Epidemiology of human listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 4, p. 169-183, 1991.

SENA, M. J. *Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema de lactoperoxidase de Staphylococcus spp isolados de queijos coalho comercializados em Recife*. 2000. 75p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária,

Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SHIMAMURA, Y.; KIDOKORO, S.; MURATA, M. Survey and properties of *Staphylococcus aureus* isolated from japanese-style desserts. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 70, n. 7, p. 1571-1577, 2006.

SILVA, I. M. M.; ALMEIDA, R. C. C.; ALMEIDA, P. F.; FONSECA, V. M. Presença de *Listeria* spp. no processamento de queijo Minas Frescal em um laticínio da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. 20., 1999, Salvador. *Anais...* Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999a. p. 369. Resumo.

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*, v. 81, p. 241-248, 2003.

SILVA, M. C. C. *Ocorrência de Listeria spp. em embutidos cárneos artesanais comercializados no mercado varejista da cidade de Contagem, MG*. 1996. 76p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SILVA, M. C. C.; CASTRO, C. C. G. Ocorrência de surto de toxinfecção alimentar causada por queijo tipo minas In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 8., 1995, Juiz de Fora. *Anais...* Juiz de Fora: Instituto de Laticínios Cândido Tostes, p. 145-147, 1995.

SILVA, M. C. D. *Listeria monocytogenes* em queijos: ocorrência, avaliação de métodos para detecção e caracterização das cepas isoladas. 1997. 117p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

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

SILVA, M. C. D.; VILARDI, T. C. C.; TIBANA, A. Avaliação de métodos para detecção de *Listeria* em queijos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 18, n. 2, 1998b.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Livraria Varela, 1997. 137 p.

SILVA, N. Z.; CUNHA, A. S.; LINS, M. C.; CARNEIRO, L. A. M.; ALMEIDA, A. C. F.; QUEIROZ, M. L. P. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurised milk in Brazil. *Revista de Saúde Pública*, v. 35, n. 4, p. 375-379, 2001.

SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M.; DESTRO, M. T. Isolamento de *S. aureus* em leite e em outras fontes em propriedades leiteiras da região sul do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. 20., 1999, Salvador. *Anais...* Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999b. p. 369. Resumo.

SILVA, W. P.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M. Biochemical characteristics of typical and

atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilian dairy farms. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, n. 2, p. 103-103, 2000.

SILVA, W. P.; CARRO-TCHERA, S.; MONKS-JANSEN, M.; EUCARES-VON-LAER, A.; LIMA, A. S.; MAGALHÃES-MATA, M. *Listeria monocytogenes* en quesos two minas producidos artesanalmente y comercializados in Pelotas city, Brazil. *Alimentaria*, v. 41, n. 359, p. 57-60, 2004a.

SILVA, W. P.; LIMA, A. S.; GANDRA, E. A.; ARAÚJO, M. R.; MACEDO, M. R. P.; DUVAL, E. H. *Listeria* spp. in the processing of fresh sausagens in slaughterhouses from Pelotas, RS, Brazil. *Ciência Rural*, v. 34, n. 3, p. 911-916, 2004b.

SILVA JÚNIOR, E. A. *Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Serviços de Alimentação*. São Paulo: Livraria Varela, 2005. 623 p.

SLADE, P. J.; COLLINS-THOMPSON, D. L. Incidence of *Listeria* species in Ontario raw milk. *Canadian Institute of Food Science and Technology*, v. 21, p. 425-429, 1988.

SOUZA, R. A. *Incidência de L. monocytogenes em queijo tipo coalho artesanal comercializado a temperatura ambiente em Fortaleza - CE*. 2002. 78p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

- STRAUB, J. A.; HERTEL, C.; HAMMES, W. P. A 23S rDNA-targeted Polymerase Chain Reaction – based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *Journal of Food Protection*, v. 62, n. 10, p. 1150-1156, 1999.
- SU, Y. C.; WONG, A. C. L. Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. *Journal of Food Protection*, v. 60, n. 2, p. 195-202, 1997.
- TAMAPARU, S.; McKILLIP, J. DRAKE, M. Development of a polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. *Journal of Food Protection*, v. 64, p. 664-668, 2001.
- TAPPERO, J. W.; SCHUCHAT, A.; DEEVER, K. A.; MASCOLA, L.; WENGER, J. D. Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States. Effectiveness of prevention efforts? The listeriosis Study Group. *Journal of the American Medical Association*, v. 273, p. 1118-1122, 1995.
- TINOCO, A. L. A.; COELHO, M. S. L.; PINTO, P. S. A.; NOVATO, M. R. R. BEZ, F.; BARCELLOS, R. M. C. A comparative microbiological study of pasteurised milk at establishments subjected to federal inspection and at farms. *Revista Higiene Alimentar*, v. 16, n. 96, p. 88-93, 2002.
- TOMPKIN, R. B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *Journal of Food Protection*, v. 65, n. 4, p. 709-725, 2002.
- TONDO, E. C.; GUIMARÃES, M. C. M.; HENRIQUES, J. A. P.; AYUB, M. A. Z. Assessing and analysing contamination of a dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 12, p. 1108-1114, 2000.
- TRABULSI, L. R.; ALTETHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. *Microbiologia*. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2002. 587 p.
- UPTON, P.; COIA, J. E. Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurized milk supply. *The Lancet*, v. 344, p. 1015, 1994.
- VAN ACKER, J.; DE SMET, F.; MUYLDERMANS, G; BOUGATEF, A.; NAESSENS, A.; LAUWERS, S. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, p. 293-297, 2001.
- VERAS, J. F.; SANTOS, D. A.; CARMO, L. S. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas Gerais, Brasil. *Revista Higiene Alimentar*, v. 17, p. 218, 2003.
- VERAS, J. F.; CARMO, L. S.; TONG, L. C.; SHUPP, J. W.; CUMMINGS, C.; SANTOS, D. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CANTINI, A.; NICOLI, J. R.; MARTI, J. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*, 2008. (IN PRESS).

VIEIRA, M.A.S.V. *Controle de Listeria monocytogenes Scott A em queijo Minas Frescal através de tratamento termoquímico*. 2000. 85p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

VIEIRA, S. D. *Características microbiológicas de queijo tipo Minas Frescal, produzido artesanalmente e comercializado na região de Araguaína, Tocantins*. 2001. 65p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal.

VILLAR, R. G.; MACEK, M. D.; SIMONS, S.; HAYES, P. S.; GOLDOFT, M. J.; LEWIS, J. H.; ROWAN, L. L.; HURSH, D.; PATNODE, M.; MEAD, P. S.. Investigation of multidrug-resistant *Salmonella* serotype Typhimurium DT 104 infections linked to raw-milk cheese in Washington State USA. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 281, n. 19, p. 1811-1816, 1999.

VITAS, A. I.; AGUADO, V.; GARCIA-JALON, I. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *International Journal of Food Microbiology*, v. 90, n. 3, p. 349-356, 2004.

WACHSMUTH, J. K.; SPARLING, P. H.; BARRETT, T. J.; POTTER, M. E. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the United States. *Immunology and Medical Microbiology*, v. 18, p. 233-239, 1997.

WALKER, L. R. *Salmonella dublin* infection in cattle in California. In: ANNUAL CONVENTION OF

AMERICAN ASSOCIATION OF BOVINE PRACTITIONERS, 1995. *Proceedings...*American Association of Bovine Practitioners, 1995. p. 8-9.

WANG, G.; ZHAO, T.; DOYLE, M. P. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 7, p. 2567-2570, 1996.

WANG, G.; ZHAO, T.; DOYLE, M. P. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized and pasteurized milk. *Journal of Food Protection*, v. 60, n. 6, p. 610-613, 1997.

WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, v. 16, p. 41-46, 1988.

WEAGANT, S. D.; BRYANT, J. L.; BARK, D. H. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in mayonnaise and mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. *Journal of Food Protection*, v. 57, p. 629, 1994.

WEDDESKOPP, A.; STROGER, U.; LIND, P. *Salmonella dublin* in Danish Dairy Herds: frequency of change to positive serological status in bulk tank milk ELISA in relation to serostatus of neighbouring farms. *Acta Veterinaria Scandinavica*, n. 42, p. 295-302, 2001.

WELLS, J. G.; SHIPMAN, L. D.; GREENE, K. D. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, p. 985-989, 1991.

YANG S J; PARK K Y; KIM S H; NO M K; BESSER T E; YOO H S; KIM S H; LEE B K; PARK Y H. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. *Veterinary Microbiology*. V.86, p.295-301, 2002.

YU, L. S. L.; PRASAI, R. K.; FUNG, D. Y. C. Most probable numbers of *Listeria* species in raw meats detected by selective mobility enrichment. *Journal of Food Protection*, v. 58, n. 9, p. 943-945, 1995.

ZENG, H.; ZHANG, X.; ZHEN, S.; FANG, W. Multiplex PCR identification of *Listeria monocytogenes* isolates from milk and milk-

processing environments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 86, n. 3, p. 367-371, 2006.

ZHAO, T.; DOYLE, M. P.; SHERE, J.; GARBER, L. Prevalence os enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p. 1290-1293, 1995.

ZOTTOLA, E. A.; YESSI, T. L.; AJAO, D. B.; ROBERTS, R. F. Utilization of cheddar cheese containing nisin as an antimicrobial agent in other foods. *International Journal of Food Microbiology*, v. 24, p. 227-238, 1994.

CAPÍTULO 2. Estudo da ocorrência de *Listeria monocytogenes* em indústria processadora de queijo Minas Frescal

1 INTRODUÇÃO

Durante o processo de produção, elaboração, transporte, armazenamento e distribuição, qualquer alimento está sujeito à contaminação por bactérias patogênicas. O leite e seus derivados, por sua riqueza nutritiva, constituem excelentes meios de cultura para o desenvolvimento de diversos microrganismos, sendo veículos de transmissão de importantes zoonoses e de patógenos responsáveis por doenças transmitidas por alimentos para o homem (Frazier, 1993). Diversos microrganismos patogênicos podem ser encontrados contaminando o leite e derivados, entre eles *Listeria monocytogenes* (Riedel, 1992). Contribuem para este estudo um maior conhecimento deste patógeno nos seus aspectos epidemiológicos, clínicos e

laboratoriais (Fraser e Sperber, 1988; Hayes et al., 1992).

No Brasil, em muitos casos, o leite é obtido sob condições higiênico-sanitárias deficientes e, em consequência, pode representar riscos à saúde da população (Cerqueira e Leite, 1995). Em relação ao leite e seus derivados, os cuidados higiênicos para evitar a contaminação devem ser iniciados desde a ordenha e continuar até a obtenção do produto final.

Listeria monocytogenes é um cocobacilo Gram-positivo, não-esporulado, não-produtor de ácidos, aeróbio e anaeróbio facultativo, de ampla distribuição ambiental, com caráter ubiqüitário, tendo sido isolado de águas residuárias de indústrias de

laticínios e de abatedouros, de solos, insetos, adubos orgânicos e em fezes de animais e inclusive de humanos (Mims et al., 1995; Nojimoto et al., 1997). Pode também ser isolada em diversos produtos alimentícios, sejam crus ou após tratamentos térmicos ou químicos (Pereira e Rocourt, 1993; Franco e Landgraf, 1996).

L. monocytogenes é patogênico para o homem e diversos animais, sua ampla distribuição ambiental é favorecida pela sua capacidade de se desenvolver entre 0 °C e 44 °C e, embora sua faixa ótima seja entre 30 °C e 37 °C, pode sobreviver em alimentos congelados. Tolerância a pH extremos de 5 a 9, baixa atividade de água e concentrações de cloreto de sódio de 10% e até superiores. Este conjunto de características faz com que *L. monocytogenes* seja um patógeno emergente de grande importância na área de alimentos e explica o destaque que este microrganismo vem ocupando nos últimos anos no controle de qualidade na indústria de alimentos pelas dificuldades de sua eliminação e pela possibilidade de causar uma doença grave no consumidor (Nojimoto et al., 1994; Landgraf, 1997).

A literatura é abundante em relatos da presença de *L. monocytogenes* em alimentos, seja nas matérias-primas, durante a produção e / ou durante o processamento ou nos produtos já acabados em exposição nas prateleiras do comércio varejista. No Brasil, existem vários registros da presença deste patógeno em leite e derivados (Destro et al., 1991; Moura et al., 1993; Furlanetto et al., 1996; Silva, 1997; Silva et al., 1998). A grande frequência de listeriose veiculada por queijos evidencia a importância desse alimento e de outros derivados do leite na cadeia epidemiológica de transmissão de *L. monocytogenes*.

Os queijos vêm sendo responsáveis por vários surtos de toxinfecção alimentar, nos quais vários patógenos já estiveram

envolvidos, inclusive *L. monocytogenes* (Linnan et al., 1988; Schuchat et al., 1992).

O queijo Minas Frescal é um produto que tem ampla aceitação comercial e bastante popular na alimentação da população brasileira, na maioria das regiões do país (Loguércio e Aleixo, 2001; Almeida Filho et al., 2002; Câmara et al., 2002; Cardoso e Araújo, 2004; Roos, 2005). Este é produzido a partir de leite pasteurizado e caracteriza-se por alta umidade, baixo pH (5,1 a 5,6) e 1 a 6% de cloreto de sódio (Freitas et al., 1993) e possui 43% a 55% de umidade e deve ser consumido rapidamente, pois possui curta vida de prateleira, de 10 a 15 dias (Furtado, 1999; Gonzalez, 2000). Na sua fabricação, utiliza-se normalmente a renina, remove-se o soro, realiza-se a moldagem e a salga (Araújo et al., 2002). O queijo Minas Frescal apresenta grande susceptibilidade a contaminações microbianas, que podem ocorrer a partir do leite utilizado como matéria-prima, ou por contaminações cruzadas durante ou após o processamento. As contaminações aliadas às alterações decorrentes podem, em poucos dias, tornar o queijo inaceitável ou até mesmo impróprio para o consumo (Rocha et al., 2006).

A legislação brasileira que estabelece os padrões microbiológicos para produtos alimentícios expostos à venda, a RDC número de 12 do Ministério da Saúde - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2001) e o Regulamento Técnico Geral para fixação dos requisitos microbiológicos de queijos do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1996), prevêm, para queijos de alta umidade, como é o caso do queijo Minas Frescal, ausência de *L. monocytogenes*. Nos Estados Unidos, o Ministério da Agricultura (USDA) fixou também tolerância zero para esta bactéria em suprimentos alimentícios de um modo geral (Johnson et al., 1990).

A importância de *L. monocytogenes* como patógeno causador de grave toxinfecção

alimentar, a falta de notificações de casos de listeriose no Brasil e, em particular, os associados ao consumo de queijos, tornam importante a pesquisa de *L. monocytogenes*. Apesar do risco apresentado pela *L. monocytogenes* em produtos lácteos, existem poucos estudos sobre a incidência deste microrganismo em pontos na linha de processamento de queijos no Brasil. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a qualidade microbiológica de queijos Minas Frescal produzidos por um laticínio na cidade de Rio Pomba, Minas Gerais, quanto à presença de *L. monocytogenes* tanto na matéria-prima quanto ao longo da linha de produção deste laticínio, visando detectar pontos de contaminação dos queijos produzidos, bem como eliminar a presença deste patógeno na indústria em estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O queijo Minas Frescal é um queijo branco, semelhante ao “*queso blanco*” fabricado em outros países da América Latina, sendo um dos queijos mais populares produzidos no Brasil. Apresenta como matéria-prima o leite pasteurizado e sua principal característica que atrai o consumidor é o seu sabor ligeiramente ácido e rico. Queijos brancos, macios e frescos, os quais são submetidos a um mínimo de processamento antes do envase, são altamente perecíveis e possuem curta vida de prateleira, mesmo sob refrigeração. Como *Listeria monocytogenes* é um microrganismo psicotrófico e consegue crescer em baixas temperaturas, a proliferação deste patógeno em queijos pode ocorrer (Silva et al., 2003).

Listeria monocytogenes é um patógeno que pode contaminar leite e derivados (Menendez et al., 1997). Surto de listeriose resultados do consumo de derivados lácteos contaminados por *L. monocytogenes* têm levado a estudos sobre o comportamento

deste microrganismo durante o processamento e subsequente estocagem dos produtos lácteos. De particular importância são os estudos de como o leite, incluindo aquele usado para a produção de queijos e outros derivados lácteos fermentados, pode servir de veículo primário para a transmissão deste patógeno (Rosenow e Marth, 1987).

Listeria monocytogenes é inativada sob condições normais de pasteurização, entretanto problemas podem advir de contaminação pós-pasteurização (Schaack e Marth, 1988). Esta bactéria pode contaminar os queijos durante vários estádios do processamento. Os diversos ambientes em laticínios permitem o alojamento deste microrganismo em vários sítios de colonização. Qualquer patógeno presente no leite cru pode potencialmente permanecer no ambiente de laticínios produtores de queijos (Cotton e White, 1992). Figueiredo (2000), Catão e Ceballos (2001) investigaram a ocorrência do gênero *Listeria* na linha de processamento de leite pasteurizado e detectaram amostras positivas para este patógeno no leite cru, leite pasteurizado e no ambiente industrial.

A taxa de prevalência de *L. monocytogenes* no leite varia muito entre os diversos estudos e pode ser influenciada por vários fatores, tais como região geográfica, estação do ano, tamanho da fazenda, número de animais na propriedade e manejo sanitário (Rohrbach et al., 1992).

A ocorrência de *Listeria* spp. em pontos críticos de controle e no ambiente de processamento de queijo Minas Frescal em dois laticínios na Bahia foi determinada por Silva et al. (2003). Neste estudo, os autores observaram que na fabricação deste tipo de queijo, os pontos críticos de controle incluem a recepção do leite cru, a pasteurização, a coagulação e a estocagem do produto acabado. Em uma das fábricas, *L. monocytogenes* foi isolada das amostras de leite cru (16,7%) e das amostras do chão da sala de refrigeração dos queijos (14,3%).

Dois sorotipos, 4b e 1/2a, foram observados entre as amostras de *L. monocytogenes* isoladas, os quais são frequentemente envolvidos em surtos e casos esporádicos de listeriose.

Kells e Gilmour (2004) também monitoraram, durante um ano, dois laticínios na Irlanda. A incidência de *Listeria* nos equipamentos foi de 18,8% (6,3% *L. monocytogenes*), no ambiente foi de 54,7% (40,6% *L. monocytogenes*) e no leite cru 44,4% (22,2% *L. monocytogenes*).

Rocha (2005) também realizou um estudo sobre a presença de *L. monocytogenes* em indústria processadora de queijo Minas Frescal. Analisaram-se amostras de queijos Minas Frescal, de superfície do ambiente após o processamento dos produtos, além de amostras de leite cru e pasteurizado. Neste estudo, não se isolou *L. monocytogenes*. No entanto, a ocorrência e disseminação de quatro outras espécies do gênero (*L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimerii* e *L. grayi*) nos vários pontos da linha de produção indicam a potencialidade da *L. monocytogenes* vir a ocorrer.

Hofer et al. (2000) fizeram um levantamento das espécies de *Listeria* e seus sorotipos mais prevalentes no Brasil. Estes pesquisadores caracterizaram as espécies e sorotipos de 3.112 amostras de *Listeria* isoladas de diferentes fontes e de diferentes regiões do País. *L. monocytogenes* foi representada por dez sorotipos, sendo o 4b (352 – 11,3%) o mais prevalente, seguido por 1/2a (162 – 5,2%) e 1/2b (148 – 4,7%).

Ultimamente, técnicas moleculares têm sido utilizadas para detecção de *L. monocytogenes* em alimentos, sobretudo em produtos lácteos. Zeng et al. (2006) utilizaram e aprovaram uma técnica de PCR para detecção deste patógeno no leite. A eletroforese de campo pulsado (PFGE) também já foi atestada para tipificar *L. monocytogenes* (Borucki et al., 2003).

Para prevenir a presença de *L. monocytogenes* em indústrias produtoras de queijos é importante a adoção de boas práticas agropecuárias, boas práticas de fabricação e aplicação de conceitos de programas de controle de qualidade total na indústria de laticínios (Silva et al., 2003).

O aumento do número de pessoas altamente susceptíveis à *L. monocytogenes* associado à alta prevalência do patógeno em alimentos torna necessária a adoção de medidas de controle, prevenção e redução do risco de listeriose. Para tanto, é necessário estabelecer procedimentos de controle em diferentes pontos na cadeia de produção de alimentos, e aumentar a amostragem durante o processamento e a distribuição dos alimentos (Vitas et al., 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 O laticínio estudado

O laticínio estudado neste trabalho localizava-se em um sítio na zona rural da cidade de Rio Pombo, Minas Gerais, a qual se distancia 72 quilômetros de Juiz de Fora e 250 quilômetros de Belo Horizonte. O sítio possuía 13 alqueires e 25 vacas mestiças (Holandês x Zebu), sendo 22 vacas em lactação. A produção diária de leite era de cerca de 400 litros, sendo 18 litros / dia a média de produção por vaca. Toda esta produção era destinada ao laticínio. A ordenha era do tipo mecânica, balde ao pé, duas vezes ao dia: a primeira ordenha era realizada às quatro horas, e a segunda era realizada às 15 horas. No manejo de ordenha, não era realizado nenhum teste diário para a detecção de vacas com mastite, porém, de acordo com relatos do proprietário, a incidência desta enfermidade no rebanho é baixa.

O sítio era de propriedade e gerenciado pela família proprietária do laticínio, que morava no local, e possuía mais três funcionários na lida com os animais. A alimentação dos animais era feita com capim elefante e cana-de-açúcar, havendo suplementação com concentrado para as vacas em lactação. No período de seca (maio a outubro), as vacas recebiam suplementação com silagem de milho.

O laticínio localizava-se na propriedade rural descrita acima, a uma distância de 50 metros do curral. Nele, trabalhavam dois funcionários: a queijeira, esposa do proprietário, e uma ajudante. A maior produção, cerca de dois terços, era de queijo Minas Frescal, porém o laticínio ainda fabricava queijo Minas Padrão, Mussarela (em barra e palito) e ricota. Toda a produção era comercializada em duas feiras livres de Juiz de Fora e em duas padarias da cidade. O laticínio era submetido à inspeção estadual (Instituto Mineiro de Agropecuária – IMA). A água utilizada no laticínio era proveniente de poço artesiano e não submetida a qualquer tipo de tratamento físico ou químico.

Este laticínio foi selecionado para o estudo, pois foi o único que apresentou amostras de queijo Minas Frescal positivas (4/5) para *L. monocytogenes* no estudo descrito no capítulo 1 desta tese.

O processamento do queijo Minas Frescal era realizado como descrito por Silva et al. (2003) com poucas modificações (Figura 1).

O leite era dispensado em um tanque de aço inox de camisa dupla e sofria pasteurização lenta (63 °C, 30 minutos). Após a pasteurização, o leite era resfriado a 32 °C no mesmo tanque, onde eram adicionados o cloreto de cálcio (20 g / 100 litros de leite) e a renina (1%). Essa mistura permanecia a 35 °C por 40 minutos para promover a coagulação da massa. A massa era cortada, com o auxílio de uma lira, em cubos de aproximadamente 2 cm de lado. Em seguida, a massa era retirada do tanque, com auxílio de um coador de plástico, e colocada em formas pequenas (10 cm de diâmetro) ou em formas grandes (15 cm de diâmetro) sem dessorador. A salga superficial era realizada em cada lado dos queijos (aproximadamente 0,75% m/m de cloreto de sódio em cada lado). Logo após a salga, os queijos enformados eram colocados em tabuleiros de alumínio, que eram armazenados em três refrigeradores horizontais e mantidos a 4 °C por 18 a 24 horas, com o intuito de aumentar a firmeza dos queijos. As formas eram removidas no dia seguinte da fabricação e dispensadas na mesma pia utilizada no dia anterior como apoio para a enformagem dos queijos. Dessa forma, o excesso de soro dos queijos era drenado e os queijos eram embalados em sacos plásticos de 18 cm x 24 cm (queijo pequeno, de aproximadamente 400 g) e de 20 cm x 30 cm (queijo grande, de aproximadamente 800 g). Após a embalagem, os queijos voltavam a ser armazenados nos refrigeradores horizontais por mais 24 horas ou eram transportados diretamente para o mercado.

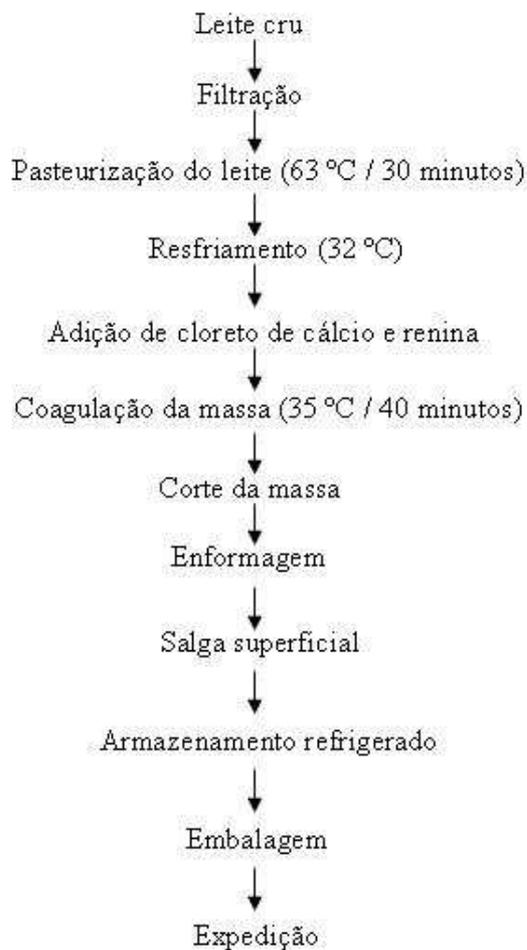


Figura 1. Fluxograma de fabricação de queijo Minas Frescal no laticínio estudado.

3.2 Procedimentos de amostragem na indústria

Após contato com a direção do laticínio, realizou-se um estudo de caso com a finalidade de identificar a provável fonte de contaminação do queijo Minas Frescal a

partir da recepção da matéria-prima e da linha de processamento.

Foram feitas cinco visitas ao laticínio estudado, as datas e as finalidades de cada visita estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Número, data e finalidades das visitas realizadas no laticínio estudado

Visita	Data	Finalidade
1	10 de outubro de 2005	Isolar <i>L. monocytogenes</i>
2	1º de dezembro de 2005	Verificar a eliminação
3	27 de março de 2006	Verificar a eliminação
4	16 de junho de 2006	Verificar a eliminação

A obtenção de amostras para análise microbiológica foi conduzida de acordo com Marshall (1992). Foram coletadas 33 amostras da sala de ordenha, ambiente e linha de processamento do queijo Minas Frescal, as quais estão listadas abaixo.

1. Placa de Petri, contendo o meio de cultura Palcam, em exposição, aberta, por 30 minutos no ambiente da sala de fabricação dos queijos;
2. Placa de Petri contendo meio de cultura Oxford em exposição, aberta, por 30 minutos no ambiente da sala de fabricação dos queijos;
3. Placa de Petri, contendo o meio de cultura Palcam, em exposição, aberta, por 30 minutos no ambiente da sala de estocagem dos queijos;
4. Placa de Petri contendo meio de cultura Oxford em exposição, aberta, por 30 minutos no ambiente da sala de estocagem dos queijos;
5. *Swab* de teteira da ordenhadeira mecânica;
6. *Swab* de latão de leite contendo manteiga estocado em temperatura ambiente;
7. *Swab* de latões de leite limpos e vazios;
8. *Swab* do filtro de leite cru;
9. *Swab* das mãos da queijeira;
10. *Swab* do tanque de pasteurização e coagulação do leite;
11. *Swab* de balde utilizado para transporte da massa do queijo do tanque de coagulação para as formas;
12. *Swab* do coador de massa de queijo;
13. *Swab* de formas grandes de queijo;
14. *Swab* de formas pequenas de queijo;
15. *Swab* do primeiro refrigerador horizontal de estocagem de queijos;
16. *Swab* do segundo refrigerador horizontal de estocagem de queijos;
17. *Swab* do terceiro refrigerador horizontal de estocagem de queijos;
18. *Swab* das paredes do laticínio;
19. *Swab* do chão do laticínio;

20. *Swab* da pia da sala de fabricação dos queijos – local onde eram enformados os queijos;

21. *Swab* da pia da sala de estocagem dos queijos;

22. Água residual de lavagem de latões;

23. Água utilizada para lavagem das mãos da queijeira armazenada em caixa plástica;

24. Água das torneiras das pias do laticínio;

25. Leite cru;

26. Soro presente na bandeja de alumínio onde os queijos inicialmente permaneciam enformados;

27. Soro residual presente na pia da sala de fabricação – local onde os queijos eram enformados;

28. Soro residual presente dentro dos refrigeradores horizontais de estocagem dos queijos – coletado no ralo do refrigerador horizontal;

29. Amostra de queijo Minas Frescal 1;

30. Amostra de queijo Minas Frescal 2;

31. Amostra de queijo Minas Frescal 3;

32. Amostra de queijo Minas Frescal 4;

33. Amostra de queijo Minas Frescal 5.

A coleta com *swabs* foi realizada atritando-se cada *swab* em quatro áreas de 40 cm² em cada um dos pontos amostrados listados anteriormente. Os *swabs* foram colocados em tubos contendo 10 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e conservados sob refrigeração até a chegada ao laboratório.

No caso das amostras líquidas, como soro e águas, foram coletados volumes de 300 mL com o auxílio de coletores de aço inoxidável estéreis e colocados em frasco estéreis, os quais foram conservados sob refrigeração até a chegada ao laboratório. As amostras de queijo Minas Frescal foram mantidas em sua embalagem original e conservadas sob refrigeração até o laboratório.

3.3 Procedimentos laboratoriais para isolamento, identificação e enumeração de *Listeria monocytogenes*

3.3.1 Isolamento de *L. monocytogenes* a partir de amostras coletadas no ambiente e na linha de processamento de queijo Minas Frescal

A parte laboratorial do trabalho foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, Minas Gerais, e as análises microbiológicas foram realizadas de acordo com Marshall (1992), conforme descrito na seção 3.2.2 do capítulo 1 desta tese.

A técnica de PCR foi utilizada para detecção e confirmação dos isolados obtidos no laticínio, conforme descrito na seção 3.3 do capítulo 1 desta tese.

3.3.2 Enumeração de *L. monocytogenes* em queijo Minas Frescal

Foi realizada a contagem de *L. monocytogenes* nos cinco queijos amostrados na primeira visita realizada ao laticínio em estudo, em outubro de 2005, como descrito no item 3.2.

Vinte e cinco gramas de cada amostra de queijo foram transferidas para um saco plástico estéril contendo 225 mL de citrato de sódio 2%. Após homogeneização por dois minutos em temperatura ambiente, em um homogeneizador de amostras do tipo *stomacher*, foram realizadas, para cada amostra de queijos, diluições seriadas em uma série de tubos contendo 9 mL de citrato de sódio a 2%. Foram utilizadas as seguintes diluições: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} .

Depois de realizadas as diluições, cada tubo foi agitado em Vortex e semeado em placas

de Petri contendo o meio de cultura Oxford, incubando-se as placas a 35 °C, por 48 horas. Foram utilizadas três placas por diluição: em duas placas já contendo meio de cultura solidificado foram dispensados 0,3 mL da diluição em cada e em outra placa também já contendo o meio de cultura foram dispensados 0,4 mL, totalizando doze placas de Oxford por amostra de queijo. Para a adequada distribuição da diluição no meio de cultura, esta foi espalhada com alça de Drigalski sobre o meio.

Após 48 horas de incubação das placas de Oxford, observou-se o crescimento de colônias típicas de *Listeria* nesse meio de cultura, as quais se apresentam enegrecidas. Foi, então, realizada a contagem de colônias típicas com o auxílio de uma lupa (limite de detecção = ≤ 10 UFC por 25 g de queijo).

3.3.3 Sorotipagem e Eletroforese em campo pulsado (PFGE)

Esta parte experimental foi realizada, em colaboração, no *Microbial Food Safety Research Unit*, localizado no *Eastern Regional Research Center (ERRC) (Agricultural Research Service - USDA)*, em Wyndmoor, Pennsylvania, Estados Unidos.

A subtipagem molecular foi conduzida utilizando-se a enzima AscI (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA), de acordo com o protocolo padronizado do Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC Pulse-Net) e como descrito por Gilbreth et al. (2005).

3.4 Procedimentos de eliminação do microrganismo e monitoramento do laticínio

Para confirmar a eliminação de *L. monocytogenes* da planta do laticínio, este

foi monitorado durante o período de um ano. Neste período, foram realizadas cinco visitas no laticínio. Na primeira visita foram amostrados os pontos descritos no item 3.2. No dia dessa primeira visita, o laticínio foi interditado pelo serviço de inspeção estadual e, nos dois meses subsequentes, uma série de procedimentos de limpeza e desinfecção e reforma de instalações foram conduzidos, a fim de eliminar a presença do microrganismo e atender às exigências do Serviço de Inspeção Estadual.

3.4.1 Procedimentos de limpeza, desinfecção e reforma das instalações do laticínio

O primeiro procedimento de limpeza foi realizado no dia da primeira visita ao laticínio, dia 10 de outubro de 2005. Toda matéria orgânica foi retirada das instalações do laticínio e apenas o chão foi lavado com água quente e cloro concentrado, deixando este agir por 24 horas.

O segundo procedimento de limpeza foi realizado no dia 30 de outubro de 2005 e todas as instalações e equipamentos do laticínio (chão, paredes, pias, tanques de fabricação, formas, refrigeradores horizontais) foram lavados com cloro concentrado (500 ppm), o qual foi deixado agir por uma hora, mais detergente alcalino clorado e água quente. Durante o mês de novembro de 2005, houve reformas das instalações do laticínio e novos equipamentos foram adquiridos. A listagem das reformas e aquisições está descrita abaixo.

1. Fechamento de uma porta secundária de acesso direto à sala de fabricação dos queijos;
2. Troca da porta de entrada principal do laticínio, pois estava enferrujada;

3. Pintura das paredes internas (tinta a óleo, lavável) e das paredes externas (tinta comum);

4. Na entrada do laticínio, colocação de pia nova para lavagem de mãos, dispensador de sabonete e toalha de papel, lavador de botas, revestimento de cerâmica no piso e paredes, e tapete sanitário;

5. Piso de cerâmica no interior de todo o laticínio (era cimento liso);

6. Troca das telas das janelas;

7. Construção de óculo de alumínio de expedição de queijos na sala de estocagem desses;

8. Aquisição de prensa para queijos;

9. Aquisição de bomba para leite (transporte do leite da área externa para o interior do laticínio) e tanque pequeno com filtro;

10. Aquisição de formas próprias para queijos;

11. Aquisição de mesa inox para enformagem dos queijos;

12. Revestimento com cerâmica do piso na área do filtro para o leite;

13. Aumento da altura das janelas;

14. Reforma de dois refrigeradores horizontais mais antigos;

15. Aumento (20 cm) da altura do revestimento de cerâmica da sala de fabricação de queijos.

O valor total estimado da reforma e aquisição de novos equipamentos e utensílios foi de R\$ 11.000,00.

Após o término das obras, realizou-se um terceiro procedimento de limpeza, no dia 29 de novembro de 2005, que incluiu a lavagem, com água morna, cloro concentrado e detergente, do piso, paredes, equipamentos e utensílios do laticínio.

No dia 30 de novembro de 2005, foi realizado o último procedimento de limpeza com o laticínio ainda interditado. Houve novamente higienização de toda a instalação com água morna, detergente e cloro, as

formas de queijos ficaram mergulhadas no tanque de fabricação em solução de cloro, e os refrigeradores horizontais foram limpos com álcool 70°.

3.4.2 Procedimentos de monitoramento do laticínio

Como dito anteriormente foram realizadas mais quatro visitas ao laticínio em estudo, no período de um ano, para verificar a eliminação de *L. monocytogenes*.

A primeira visita foi descrita no item 3.2 e teve como objetivo identificar os pontos do ambiente e da linha de produção do queijo

1. *Swab* de teteira da ordenhadeira mecânica;
2. *Swab* de latões de leite limpos e vazios;
3. *Swab* do tanque de pasteurização do leite e coagulação;
4. *Swab* de formas grandes de queijo;
5. *Swab* de formas pequenas de queijo;
6. *Swab* do primeiro refrigerador horizontal de estocagem de queijos;
7. *Swab* do segundo refrigerador horizontal de estocagem de queijos;
8. *Swab* do terceiro refrigerador horizontal de estocagem de queijos;
9. *Swab* das paredes do laticínio;
10. *Swab* do chão do laticínio;
11. *Swab* da pia da sala de fabricação dos queijos – local onde eram enformados os queijos;
12. *Swab* da pia da sala de estocagem dos queijos;
13. *Swab* da mesa de aço inox recém-adquirida para a enformagem dos queijos.

De cada um dos refrigeradores horizontais, foram coletados cinco *swabs*: um do refrigerador horizontal como um todo, outro somente da parte interna, outro da parte externa, outro da tampa e um último *swab* do ralo.

Minas Frescal contaminados com o patógeno. As demais visitas foram realizadas após o período de reforma das instalações e dos procedimentos de limpeza descritos no item anterior, com o intuito de averiguar a eliminação de *L. monocytogenes* do laticínio em questão.

A segunda visita ao laticínio foi realizada no dia 1º de dezembro de 2005, logo após o término da reforma das instalações e do último procedimento de limpeza. Na ocasião desta segunda visita, o laticínio ainda encontrava-se interditado pelo Serviço de Inspeção Estadual e, portanto, não havia produção. Dessa forma, os seguintes pontos foram amostrados.

As terceira, quarta e quinta visitas foram realizadas, respectivamente, nos dias 27 de março de 2006, 26 de junho de 2006 e 16 de outubro de 2006. Foram coletadas amostras do ambiente e da linha de processamento do queijo Minas Frescal. Em cada uma dessas três visitas, foram realizados os controles empregando-se:

1. Placa de Petri, contendo o meio de cultura Palcam, em exposição, aberta, por 30 minutos no ambiente da sala de fabricação dos queijos;
2. Placa de Petri contendo meio de cultura Oxford em exposição, aberta, por 30 minutos no ambiente da sala de fabricação dos queijos;
3. Placa de Petri, contendo o meio de cultura Palcam, em exposição, aberta, por 30 minutos no ambiente da sala de estocagem dos queijos;
4. Placa de Petri contendo meio de cultura Oxford em exposição, aberta, por 30 minutos no ambiente da sala de estocagem dos queijos;
5. *Swab* de teteira da ordenhadeira mecânica;

6. *Swab* de latões de leite limpos e vazios;
7. *Swab* do tanque de pasteurização do leite e coagulação;
8. *Swab* do balde utilizado para transporte da massa do queijo do tanque de coagulação para as formas;
9. *Swab* do coador de massa de queijo;
10. *Swab* da mesa de aço inox utilizada para enformagem de queijos;
11. *Swab* de formas grandes de queijo;
12. *Swab* de formas pequenas de queijo;
13. *Swab* da balança utilizada para pesagem dos queijos;
14. *Swab* do primeiro refrigerador horizontal de estocagem de queijos;
15. *Swab* do segundo refrigerador horizontal de estocagem de queijos;
16. *Swab* do terceiro refrigerador horizontal de estocagem de queijos;
17. *Swab* das paredes do laticínio;
18. *Swab* do chão do laticínio;
19. *Swab* da pia da sala de fabricação dos queijos – local onde eram enformados os queijos;
20. *Swab* da pia da sala de estocagem dos queijos;
21. Água residual de lavagem de latões;
22. Água utilizada para lavagem dos utensílios armazenada em caixa plástica;
23. Água das torneiras das pias do laticínio;
24. Leite cru;
25. Massa de queijo coletada direto do tanque de fabricação;
26. Soro residual presente na mesa de aço inox – local onde os queijos eram enformados;

27. Soro residual presente dentro dos refrigeradores horizontais de estocagem dos queijos – coletado no ralo do refrigerador horizontal;
28. Amostra de queijo Minas Frescal 1;
29. Amostra de queijo Minas Frescal 2;
30. Amostra de queijo Minas Frescal 3;
31. Amostra de queijo Minas Frescal 4;
32. Amostra de queijo Minas Frescal 5.

De cada um dos refrigeradores horizontais, cinco *swabs* continuaram sendo coletados: um do refrigerador horizontal como um todo, outro somente da parte interna, outro da parte externa, outro da tampa e um último *swab* do ralo.

Os *swabs* foram triturados em quatro áreas de 40 cm² cada em cada um dos pontos amostrados listados anteriormente. Esses *swabs* foram, então, colocados em tubos contendo 10 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e conservados sob refrigeração até a chegada ao laboratório. Já as amostras líquidas, tais como o soro e as águas (cerca de 300 mL de cada) foram coletadas de suas origens com o auxílio de coletores de aço inox estéreis e colocadas em frasco estéreis, os quais foram conservados sob refrigeração até o laboratório. Finalmente, as amostras de queijo Minas Frescal foram mantidas na embalagem original e também conservadas sob refrigeração até a chegada no laboratório.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ocorrência de *L. monocytogenes* no ambiente, na linha de processamento e em amostras de queijo Minas Frescal

De um total de 33 amostras coletadas do ambiente e da linha de processamento do queijo Minas Frescal, durante a primeira visita ao laticínio estudo, 14 foram positivas para *L. monocytogenes* (tabela 2).

Tabela 2. Amostras positivas e negativas para *L. monocytogenes* coletadas no ambiente e na linha de processamento de queijo Minas Frescal em um laticínio em Rio Pomba, MG – outubro de 2005

Material examinado	Isolamento de <i>L. monocytogenes</i>
Teteira da ordenhadeira	Negativo
Latões de leite	Negativo
Filtro de leite cru	Negativo
Tanque de pasteurização e coagulação	Negativo
Coador de massa	Negativo
Balde de massa	Negativo
Forma grande de queijo	Positivo
Forma pequena de queijo	Positivo
Pia da sala de fabricação de queijos	Negativo
Refrigerador horizontal 1	Positivo
Refrigerador horizontal 2	Positivo
Refrigerador horizontal 3	Positivo
Pia da sala de estocagem de queijos	Negativo
Piso	Positivo
Parede	Negativo
Água residual de latões	Negativo
Água de lavagem de mãos	Negativo
Soro da pia	Positivo
Leite cru	Negativo
Água	Negativo
Soro da bandeja com queijos	Positivo
Soro da saída do refrigerador horizontal	Positivo
Mãos da queijeira	Negativo
Latão com manteiga	Negativo
Placa de Petri do ambiente da sala de fabricação (Oxford)	Negativo
Placa de Petri do ambiente da sala de fabricação (Palcam)	Negativo
Placa de Petri do ambiente da sala de estocagem (Oxford)	Negativo
Placa de Petri do ambiente da sala de estocagem (Palcam)	Negativo

Amostra de queijo Minas Frescal 1	Positivo
Amostra de queijo Minas Frescal 2	Positivo
Amostra de queijo Minas Frescal 3	Positivo
Amostra de queijo Minas Frescal 4	Positivo
Amostra de queijo Minas Frescal 5	Positivo

Como é possível observar na tabela 1, nove amostras do ambiente e linha de processamento do queijo Minas Frescal foram positivas: formas pequenas e grandes de queijos, três refrigeradores horizontais, piso, soro coletado da pia, soro coletado da bandeja onde os queijos dessoravam e soro coletado da saída (ralo) do refrigerador horizontal de estocagem. Além dessas amostras, os cinco queijos coletados juntamente com as amostras de ambiente e da linha de processamento também foram positivos para *L. monocytogenes*. Considerando o fluxograma de fabricação do queijo Minas Frescal no laticínio estudado e a não detecção de *L. monocytogenes* no leite cru, massa do queijo e tanque de pasteurização e coagulação, estes resultados sugerem que os pontos em comum de contaminação de todas as amostras positivas seriam os refrigeradores horizontais utilizados para estocagem dos queijos. Como *L. monocytogenes* é um microrganismo psicrotrófico, possui habilidade de crescer e se multiplicar em temperaturas de refrigeração. A bactéria contaminou o refrigerador horizontal e neste local encontrou um ambiente propício para sua multiplicação (temperatura em torno de 4 °C, ausência de competidores), e todo o material que era armazenado nos refrigeradores horizontais se contaminava.

A origem da contaminação dos refrigeradores horizontais é difícil de ser determinada. *L. monocytogenes* já foi isolada de várias espécies animais, incluindo o homem, vegetais, água, serragem, silagem, material fecal, esgoto doméstico e industrial (Farber e Peterkin, 1991; Bille et al., 2003). Homem, animais domésticos e silvestres e o

ambiente são reservatórios naturais deste microrganismo (Donnelly, 1990). De acordo com os proprietários do laticínio, em certa ocasião anterior ao isolamento da bactéria, estes refrigeradores horizontais foram retirados do laticínio e utilizados para refrigeração de bebidas durante uma festa de aniversário na propriedade rural. É possível que naquele momento eles tenham se contaminado com o microrganismo e, quando retornaram para a indústria, a bactéria passou a contaminar o material ali armazenado.

Rebanhos leiteiros também podem ser considerados reservatórios de *L. monocytogenes* e esta bactéria pode causar mastite em vacas leiteiras (Gitter et al., 1980). Estudos realizados no Canadá e Estados Unidos demonstraram que *L. monocytogenes* pode ser encontrada no leite cru em taxas que variam de 1,3 a 5,4% (Lovett et al., 1987; Farber et al., 1988; Liewen e Plantz, 1988; Slade e Collins-Thompson, 1988; Hassan et al., 2001). Também foi demonstrado que vacas podem ser portadoras deste patógeno por mais de três anos, sem apresentarem qualquer sintoma ou qualquer alteração no leite. Entretanto, o leite cru produzido na fazenda apresentou resultado negativo para o patógeno e, portanto, provavelmente não foi a fonte de contaminação do ambiente do laticínio e da linha de processamento do queijo Minas Frescal.

A ocorrência de *L. monocytogenes* em pontos críticos de controle e no ambiente de processamento de queijo Minas Frescal em dois laticínios na Bahia foi determinada por Silva et al. (2003). Neste estudo, os autores

observaram que, na fabricação deste tipo de queijo, os pontos críticos de controle incluem a recepção do leite cru, a pasteurização, a coagulação e a estocagem do produto acabado. Em uma das fábricas, *L. monocytogenes* foi isolada das amostras de leite cru (16,7%) e das amostras do piso da sala de refrigeração dos queijos (14,3%). Um sorotipo, 1/2a, foi observado entre as amostras de *L. monocytogenes* isoladas, o qual é freqüentemente envolvido em surtos e casos esporádicos de listeriose.

Kells e Gilmour (2004) também monitoraram, durante um ano, dois laticínios, na Irlanda. A incidência de *L. monocytogenes* nos equipamentos foi de 6,3%, no ambiente foi de 40,6% e no leite cru de 22,2%. No presente estudo, a incidência do microrganismo diferiu daquela observada por Kells e Gilmour (2004): 50% nos equipamentos e utensílios, 40% no ambiente, e *L. monocytogenes* não foi isolada no leite cru.

Tabela 3. Enumeração de *L. monocytogenes* em cinco amostras de queijos Minas Frescal coletadas em um laticínio em Rio Pomba, MG, em outubro de 2005

Amostras de queijos Minas Frescal	Enumeração (UFC g ⁻¹)
1	3,0 x 10 ²
2	1,0 x 10 ³
3	1,9 x 10 ⁴
4	1,1 x 10 ³
5	3,0 x 10 ²

Como pode-se observar, todas as amostras de queijo apresentaram contagens acima de 10² UFC g⁻¹ e três amostras (60%) apresentaram valores superiores a 10³ UFC g⁻¹. Trabalhos sugerem que o número de *L. monocytogenes* em alimento contaminado capaz de causar surtos e casos esporádicos de listeriose é superior a 10² UFC g⁻¹, contudo doses infectantes inferiores a este valor não podem ser descartadas (Rocourt e Cossart, 1997). Rosenow e Marth (1987) afirmam que o valor mínimo de *L. monocytogenes* capaz de causar toxinfecção alimentar, é de 10³ UFC g⁻¹. Sendo assim, esses queijos podem ser classificados como

Por outro lado, Rocha (2005) também realizou um estudo da presença de *L. monocytogenes* em indústria processadora de queijo Minas Frescal. Foram analisados 20 queijos Minas Frescal, 120 amostras de superfície do ambiente após o processamento dos produtos, além de 10 amostras entre leite cru e pasteurizado. Neste estudo, não se isolou *L. monocytogenes*.

4.2 Enumeração de *L. monocytogenes* nas amostras de queijo Minas Frescal

Como dito anteriormente, 100% das amostras de queijo Minas Frescal coletadas na primeira visita foram positivas para *L. monocytogenes*. A tabela 3 demonstra a enumeração de *L. monocytogenes* em cada uma dessas amostras.

potencialmente capazes de causar listeriose em consumidores. Contudo, de acordo com a Secretaria Municipal de Saúde de Juiz de Fora e com a Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais (Comunicação pessoal), nenhum caso de listeriose foi notificado em Juiz de Fora no período de junho de 2005 a junho de 2006.

4.3 Caracterização sorológica e molecular (PFGE) dos microrganismos isolados de *L. monocytogenes*

Um total de 344 amostras de *L. monocytogenes* (5 a 20 isolados por amostra positiva) de amostras de queijos coletados no varejo e na indústria, do ambiente e da linha de processamento do queijo Minas Frescal foram caracterizadas. Todos os 344 isolados de *L. monocytogenes* apresentaram o mesmo pulsotipo e pertenciam ao sorotipo 1/2a. Dessa forma, somente um clone bacteriano estava presente no ambiente, utensílios e produto (Figura 2). Estes

resultados sugerem que houve somente um ponto de contaminação de *L. monocytogenes* no laticínio. Com base no cruzamento dos dados de isolamento de *L. monocytogenes* no ambiente de armazenamento e processamento dos queijos, e como o isolamento do patógeno somente ocorreu após a passagem dos queijos pelos freezers, sugere-se que a fonte de contaminação estava associada com o local de armazenamento dos queijos.

S 1 2 3 4 5 S 6 7 8 9 10 11 S 12 13 14 15 16 17 S 18 19 20 21 22 23 S 24 25 26 27 28 29 30

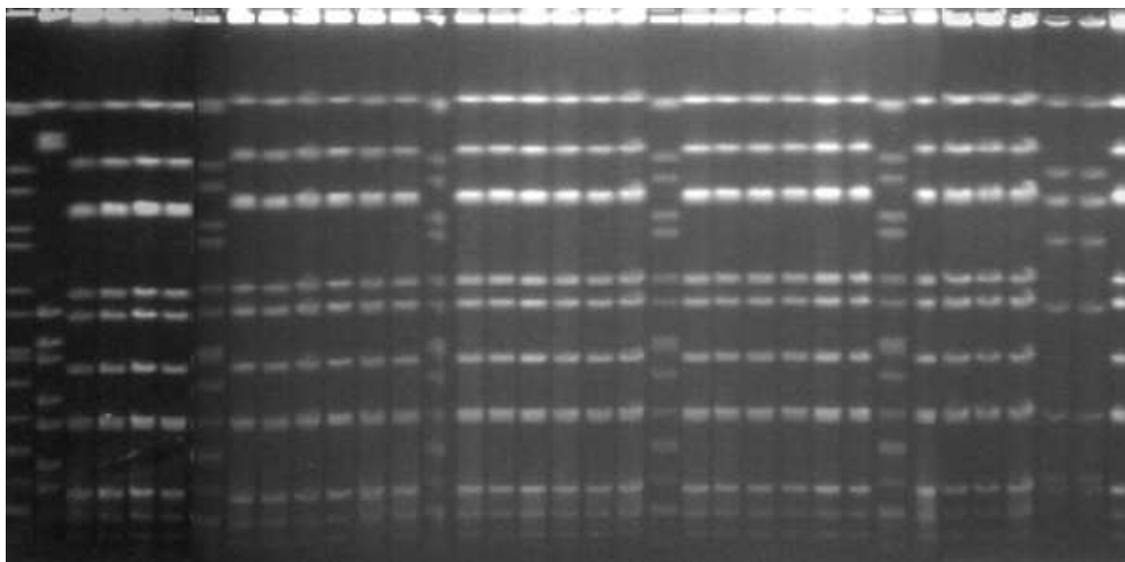


Figura 2. Montagem de vários géis de eletroforese em campo pulsado (PFGE) mostrando isolados de *L. monocytogenes* de queijos Minas Frescal coletados na indústria (1 – 4), de queijos coletados no varejo (5 – 13) e do ambiente do laticínio F (14 – 27 e 30). Colunas marcadas com a letra S correspondem ao controle (*Salmonella choleraesuis* ssp. *choleraesuis* ser Branderup). Colunas 28 e 29 mostram resultado negativo. Pode ser observado o mesmo perfil de bandas nos isolados de *L. monocytogenes*, evidenciando o mesmo genótipo.

O sorotipo 1/2a é o segundo sorotipo mais freqüente envolvido em casos de listeriose humana e é o sorotipo mais freqüentemente encontrado em produtos lácteos no Brasil (Hofer et al., 1984; 1999; 2000; 2006).

Hofer et al. (2000) também fizeram um levantamento das espécies de *Listeria* e seus sorotipos mais prevalentes no Brasil. Estes pesquisadores caracterizaram as espécies e sorotipos de amostras de *Listeria* isoladas de

diferentes fontes. *L. monocytogenes* foi representada por dez sorotipos, sendo o 4b o mais prevalente, seguido por 1/2a e 1/2b. Silva et al. (2003) também observaram dois sorotipos de *L. monocytogenes* no ambiente de processamento de queijo Minas Frescal, 4b e 1/2a, sendo um deles (1/2a) o mesmo encontrado no presente estudo.

4.4 Eliminação de *L. monocytogenes* e monitoramento do laticínio

Como descrito na seção Material e Métodos, item 3.4.1, após os procedimentos de limpeza, desinfecção e reforma de instalações, uma segunda visita foi realizada no laticínio em 1º de dezembro de 2005, com o intuito de verificar a eliminação do patógeno. Nessa ocasião, o laticínio estava fechado e a produção de queijo foi interrompida enquanto as reformas eram realizadas. Sendo assim, os seguintes pontos foram amostrados: teteira da ordenhadeira mecânica, latões de leite limpos e vazios, tanque de pasteurização do leite e coagulação, formas grandes e pequenas de queijo, três refrigeradores horizontais de estocagem dos queijos, paredes, chão, pia da sala de fabricação dos queijos – local onde eram enformados os queijos, pia da sala de estocagem dos queijos, mesa de aço inox recém adquirida para a enformagem dos queijos. Todos os pontos amostrados revelaram-se negativos para *L. monocytogenes*.

Objetivando confirmar a eliminação do microrganismo, outras três visitas foram realizadas no laticínio em 27 de março de 2006, 26 de junho de 2006 e 16 de outubro de 2006. Todos os pontos amostrados em cada uma das três visitas revelaram resultados negativos para *L. monocytogenes*. Estes resultados demonstram que é possível eliminar *L. monocytogenes* de um laticínio, adotando-se medidas higiênico-sanitárias adequadas e princípios das boas práticas de fabricação.

5 CONCLUSÕES

A partir do trabalho realizado, considerando-se os resultados obtidos bem como a literatura consultada, pode-se concluir que:

É possível eliminar *L. monocytogenes* de um laticínio, adotando-se medidas higiênico-sanitárias adequadas e princípios das boas práticas de fabricação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, P. F.; ALMEIDA, R. C. C. Métodos de detecção e mecanismos de virulência de *Listeria monocytogenes*. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 37, n. 2, p. 136-145, 2003.

ALMEIDA FILHO, E. S.; LINDNER, A. L.; ALMEIDA, D. S.; SIGARINE, C. O.; FERREIRA, M. B. Perfil microbiológico de queijo tipo Minas Frescal, de produção artesanal e inspecionada, comercializado no município de Cuiabá-MT. *Revista Higiene Alimentar*, v. 16, n. 92/93, p. 51-56, 2002.

ARAÚJO, V. S.; PAGLIARES, V. A.; QUEIROZ, M. L. P.; FREITAS-ALMEIDA, A. C. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, v. 92, n. 6, p. 1172-1177, 2002.

BILLE, J.; ROCOURT, J.; SWAMINATHAN, B. *Listeria* and *Erysipelothrix*. In: MURRAY, P. R.; BARRON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Ed). *Manual of clinical microbiology*. 8. ed. Washington: ASM Press, 2003. v. 1. 1212 p.

BORDER, P. M.; HOWARD, J. J.; PLASTOW, G. S.; SIGGENS, K. W. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain

reaction. *Letters of Applied Microbiology*, v. 11, p. 158-162, 1990.

BORUCKI, M. K.; KRUG, M. J.; MURAOKA, W. T.; CALL, D. R. Determination among *Listeria monocytogenes* isolates using a mixed genome DNA microarray. *Veterinary Microbiology*, v. 92, n. 4, p. 351-362, 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Regulamento técnico para inspeção sanitária de alimentos*. Portaria n. 1428 de 26 de novembro de 1993. Brasília, DF, 1993. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01rda.htm>> Acesso em: 27 nov 2006.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria n. 146 de 07 de março de 1996. *Regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos*. Brasília, DF, 1996.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria n. 46 de 10 de fevereiro de 1998. *Manual genérico de procedimentos para APPCC em indústrias de produtos de origem animal*. Brasília, DF, 1998.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos*. Resolução RDC n. 12 de 02 de janeiro de 2001. Brasília, DF, 2001. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01rda.htm>> Acesso em: 27 nov 2006.

CÂMARA, S. A. V.; AMARAL, G. B.; MULLER, M. T.; SILVEIRA, K. C. S.; ALMEIDA, T. N.; MEDEIRO, C. F. Microbiological evaluation of fresh handmade "Minas" cheese, for sale in the municipal market of Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Revista Higiene Alimentar*, v. 16, n. 101, p. 32-36, 2002.

CARDOSO, L.; ARAÚJO, W. M. C. Quality parameters in commercialized cheeses in the Federal District during the 1997-2001 period. *Revista Higiene Alimentar*, v. 18, n. 123, p. 49-53, 2004.

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*, v. 21, n. 3, p. 281-287, 2001.

CERQUEIRA, M. M. O. P.; LEITA, M. O. Doenças transmissíveis pelo leite e derivados. *Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG*, v. 13, 9. 39-62, 1995.

COTTON, L. N.; WHITE, C. H. *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella* in dairy plants environments. *Journal of Dairy Science*, v. 75, p. 51-57, 1992.

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

DONNELLY, C. W. Concerns of microbial pathogens in association with dairy foods.

Journal of Dairy Science, v. 73, p. 1656-1661, 1990.

FARBER, J. M.; SANDERS, G. W.; MALCOLM, S. A. The presence of *Listeria* spp. in raw milk in Ontario. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 34, p. 95-100, 1988.

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

FIGUEIREDO, E. A. T. *Ocorrência do gênero Listeria e avaliação da diversidade genética de Listeria monocytogenes através da Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) e sua distribuição em linha de processamento de leite pasteurizado tipo "C"*. 2000. 100p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biomédica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. 182 p.

FRASER, J. A.; SPERBER, W. H. Rapid detection of *Listeria* spp in food and environmental samples by esculin hidrolisis. *Journal of Food Protection*, v. 51, n. 10, p. 762-7765, 1988.

FRAZIER, W. C. *Microbiologia de los alimentos*. 4. ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 681 p.

FREITAS, A. C.; NUNES, M. P.; MILHOMEM, A. M.; RICCIARDI, I. D. Occurrence and characterization of

Aeromonas species in pasteurized milk and white cheese in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Food Protection*, v. 5, p. 62-65, 1993.

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

FURRER, B.; CANDRIAN, U.; HOEFELIN, C.; LUETHY, J. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments. *Journal of Applied Bacteriology*, v.70, p.372-379, 1991.

FURTADO, M. M. *Principais problemas dos queijos: causas e prevenção*. São Paulo: Fonte, 1999. 176 p.

GILBRETH, S. E.; CALL, J. E.; WALLACE, F. M.; SCOTT, V. N.; CHEN, Y.; LUCHANSKY, J. B. Relatedness of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from selected ready-to-eat foods and listeriosis patients in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, p. 8115-8122, 2005.

GITTER, M.; BRADLEY, R.; BLAMPIED, P. H. *Listeria monocytogenes* infection in bovine mastitis. *The Veterinary Record*, v. 25, p. 390-393, 1980.

GONZALEZ, A. G. M. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* strains isolated from soft white cheese and poultry in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Microbiology*, v. 17, n. 3, p. 321-328, 2000.

HASSAN, L. MOHAMMED, H. O.; McDONOUGH, P. L. Farm-management and milking practices associated with the presence of *Listeria monocytogenes* in New York state dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 51, n. 1-2, p. 63-73, 2001.

HAYES, P. S.; GRAVES, L. M.; SWAMINATHAN, B.; AJELLO, G. W.; MALCOLM, G. B.; WEAVER, R. E.; RANSOM, R.; DEEVER, K.; PLIKAYTIO, B. D.; SCHUCHAT, A.; WENGER, J. D.; PINNER, R. W.; BROOME, C. V. The *Listeria* study group. Comparison of three selective enrichment methods. *Journal of Food Protection*, v. 55, n. 12, p. 952-959, 1992.

HOFER, C. B.; MELLES, C. E. A.; HOFER, E. *Listeria monocytogenes* em pacientes pós-transplante renal. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 41, p. 375-377, 1999.

HOFER, E.; PESSOA, G. V. A.; MELLES, C. E. A. Listeriose humana: prevalência dos sorotipos de *Listeria monocytogenes* isolados no Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 44, p. 125-131, 1984.

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*, v. 95, n. 5, 2000.

HOFER, E.; REIS, C. M. F.; HOFFER, C. B. Serovars of *Listeria monocytogenes* and related species isolated from human clinical specimens. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, p. 32-37, 2006.

HU, Y.; ZHANG, Q.; MEITZLER, J. C. Rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faeces by a multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology*, v. 87, p. 867-876, 1999.

JOHNSON, J. L.; DOYLE, M. P. CASSENS, R. G. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp in meat and meat products. A review. *Journal of Food Protection*, v. 53, p. 81-91, 1990.

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*, v. 91, n. 2, p. 167-174, 2004.

LANDGRAF, M. Novos patógenos de interesse em alimentos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 31, n. 1, p. 05-07, 1997.

LANGE, C.; PERES, N. D.; ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; GARCIA, P. M.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Identificação de *Listeria monocytogenes* pela reação em cadeia da polimerase. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS. 22., 2005, Juiz de Fora. *Anais...* Juiz de Fora: Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 2005. p. 150-153.

LIEWEN, M. B.; PLANTZ, M. W. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Nebraska. *Journal of Food Protection*, v. 51, p. 840-841, 1988.

LINNAN, M. J.; MASCOLA, L.; DONG LOU, X.; GOULET, V.; MAY, S.;

SALINEM, C.; HIRD, D. W.; YONEKURA, M. L.; HAYES, P.; WEAVER, R.; AUDURIER, A.; PLIKAYTIS, B. D.; FANNIN, S. L.; KLEKS, A.; BROOME, C. V. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *New England Journal of Medicine*, v. 319, p. 823-828, 1988.

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. *Ciência Rural*, v. 31, n. 6, p. 1063-1067, 2001.

LOVETT, J. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in dairy products. *Journal Association of Official Analytical Chemists*, v. 71, p. 658-660, 1988.

LOVETT, J.; FRANCIS, D. W.; HUNT, J. M. *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence, and pathogenicity. *Journal of Food Protection*, v. 50, n. 3, p. 188-192, 1987.

MARSHALL, R. T. (Ed.). *Standard methods for the examination of dairy products*. 16. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1992. 546 p.

MENENDEZ, S.; GODINEZ, M. R.; RODRIGUEZ-OTERO, J. L.; CENTENO, J. A. Renoval of *Listeria* spp in a cheese factory. *Journal of Food Safety*, v. 17, p. 133-139, 1997.

MIMS, C. A.; PALYFAIR, J. H. L.; ROITT, I. M.; WILLIAMS, R. *Microbiologia médica*. São Paulo: Manole, 1995. 352 p.

MOURA, S. M.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M. Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, v. 19, p. 229-237, 1993.

NIEDERHAUSER, C.; HÖFELEIN, C.; LÜTHY, J.; KAUFMANN, U.; BÜHLER, H.P.; CANDRIAN, U. Comparison of "Gene-Probe" DNA probe and PCR for detection of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated soft cheese and semi-soft cheese. *Research in Microbiology*, v.144, p.47-54, 1993.

NOJIMOTO, I. T. I.; CENTENO, A. J.; YANAGUITA, R. M.; WATANABE, K.; KAMUMOTO, M.; MACHADO, M. R. Susceptibilidade aos antimicrobianos de *Listeria* spp isoladas de pacientes com aborto repetitivo. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 26, n. 3, p. 71-74, 1994.

NOJIMOTO, I. T. I.; SOUZA, S. R.; VALADÃO, L. M. Ocorrência de *Listeria* spp em crianças da cidade de Goiânia, Goiás. *RBCA*, v. 29, n. 2, p. 73-74, 1997.

PEREIRA, M. L.; ROCOURT, J. *Listeria monocytogenes* – uma revisão sobre aspectos taxonômicos, importância médica e em alimentos. *Revista Higiene Alimentar*, v. 7, n. 26, p. 05-12, 1993.

RIEDEL, G. *Controle sanitário dos alimentos*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1992. 320 p.

ROCHA, J. A. K. *Estudo da presença de Listeria monocytogenes e Bacillus cereus em indústria processadora de queijo Minas*

Frescal. 2005. 73p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006.

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

ROHRBACH, R. W.; DRAUGHON, F. A.; DAVIDSON, P. M.; OLIVER, S. P. Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella* in bulk tank milk: risk factors and risk of human exposure. *Journal of Food Protection*, v. 55, p. 93-97, 1992.

ROOS, T. B. Avaliação microbiológica de queijo colonial produzido na cidade de Três Passos, RS. *Revista Higiene Alimentar*, v. 19, n. 132, p. 94-96, 2005.

ROSENOW, F. M.; MARTH, F. H. *Listeria*, listeriosis and dairy foods: a review. *Cult Dairy Prod J*, p. 13-17, 1987.

SCHAACK, M. M.; MARTH, F. H. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in skim milk during fermentation with mesophilic lactic starter cultures. *Journal of Food Protection*, v. 01, p. 600, 1988.

SCHUCHAT, A.; DEEVER, K. A.; WENGER, J. D.; PLIKAYTIS, B. D.; MASCOLA, L.; PINNER, R. W. Role of foods in sporadic listeriosis. Case-control study of dietary risk factors. The *Listeria* Study Group. *Journal of the American Medical Association*, v. 267, p. 2041-2042, 1992.

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*, v. 81, p. 241-248, 2003.

SILVA, M. C. D. *Listeria monocytogenes* em queijos: ocorrência, avaliação de métodos para detecção e caracterização das cepas isoladas. 1997. 117p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

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

SLADE, P. J.; COLLINS-THOMPSON, D. L. Incidence of *Listeria* species in Ontario raw milk. *Canadian Institute of Food Science and Technology*, v. 21, p. 425-429, 1988.

VITAS, A. I.; AGUADO, V.; GARCIA-JALON, I. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *International Journal of Food Microbiology*, v. 90, n. 3, p. 349-356, 2004.

ZENG, H.; ZHANG, X.; ZHEN, S.; FANG, W. Multiplex PCR identification of *Listeria monocytogenes* isolates from milk and milk-processing environments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 86, n. 3, p. 367-371, 2006.