

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS A.C. SIMÕES – UNIDADE EDUCACIONAL VIÇOSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM INOVAÇÃO E
TECNOLOGIA INTEGRADAS À MEDICINA VETERINÁRIA PARA O
DESENVOLVIMENTO REGIONAL

ALISSON ROGÉRIO DOS SANTOS TORRES

**OCORRÊNCIA DE *LISTERIA* SPP. E ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS EM
QUEIJOS COALHO E MANTEIGA COMERCIALIZADOS FATIADOS NO
COMÉRCIO VAREJISTA DE ARAPIRACA-AL**

Viçosa - AL
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS A.C. SIMÕES – UNIDADE EDUCACIONAL VIÇOSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM INOVAÇÃO E
TECNOLOGIA INTEGRADAS À MEDICINA VETERINÁRIA PARA O
DESENVOLVIMENTO REGIONAL

Alisson Rogério dos Santos Torres

**OCORRÊNCIA DE *LISTERIA* SPP. E ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS EM
QUEIJOS COALHO E MANTEIGA COMERCIALIZADOS FATIADOS NO
COMÉRCIO VAREJISTA DE ARAPIRACA–AL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Inovação e Tecnologia Integradas à Medicina Veterinária para o Desenvolvimento Regional, linha de pesquisa em Desenvolvimento de técnicas e estratégias para o Agronegócio - Reprodução e Produção Animal, Unidade Educacional Viçosa, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Oscar Boaventura Neto

Viçosa - AL
2019

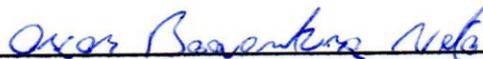
Folha de Aprovação

AUTOR: ALISSON ROGÉRIO DOS SANTOS TORRES

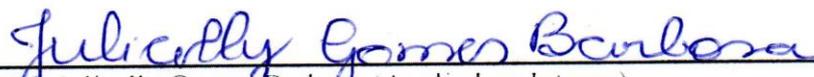
Ocorrência de *Listeria* spp. e aspectos microbiológicos em queijos coalho e manteiga comercializados fatiados no comércio varejista de Arapiraca – AL

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Inovação e Tecnologia Integradas à Medicina Veterinária para o Desenvolvimento Regional, Unidade Educacional Viçosa, Universidade Federal de Alagoas e aprovada no dia 09 de julho de 2019.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Oscar Boaventura Neto (Orientador)



Prof.^a. Dr.^a. Julicelly Gomes Barbosa (Avaliadora Interna)



Prof. Dr. Silvio Gomes de Sá (Avaliador Externo)

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Unidade Educacional Viçosa
Bibliotecária Responsável: Edvânia C. S. Gonçalves

T693o Torres, Alisson Rogério dos Santos

Ocorrência de *Listeria* spp. e aspectos microbiológicos em queijos coalho e manteiga comercializados fatiados no comércio varejista de Arapiraca–Al/ Alisson Rogério dos Santos Torres – 2019.

46 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias, Pólo Viçosa, 2018.

Orientação: Orientador: Prof. Dr. Oscar Boaventura Neto

Inclui bibliografia

1. Queijos 2. listeria spp. 3. Microbiologia I. Título

CDU:637.3

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a Deus, minha verdadeira fortaleza,
a minha família, que me ensinou valores importantes
para toda a vida, e aos professores que passaram
por minha vida, fundamentais em minha formação.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que é caminho, verdade e vida, por todas as graças e bênçãos recebidas. Até aqui o senhor me ajudou!

Aos meus pais, Rosângela Torres e Rogério Torres, por toda educação, apoio e incentivo em minha formação acadêmica.

Aos meus avós paternos, Manoel Lúcio (*in memorian*) e Terezinha Torres (*in memorian*) e aos meus avós maternos, Maria Lima (Vó Neve) e Sebastião (Vô Bastião), por todo afeto, amor e torcida por mim, muito obrigado;

A minha querida e adorável noiva, Laryssa Correia, por todo amor, carinho e compreensão nos momentos em que estive ausente para me dedicar aos estudos;

Ao Professor Dr. Oscar Boaventura Neto, pela orientação durante o mestrado. Obrigado, pela confiança, ensinamentos, paciência, atenção e amizade demonstrada ao longo dessa jornada;

Às Professoras Julicelly Gomes Barbosa e Karla Patrícia Chaves da Silva, pela amizade e valorosas contribuições que foram imprescindíveis para a realização desse trabalho;

A minha amiga e afilhada, Taynara Farias Teixeira Santana, por sua amizade e colaboração, fundamentais para o desenvolvimento dessa pesquisa;

Aos amigos de turma do mestrado, em especial, Artur Bibiano de Vasconcelos e Juliana Carla Cavalcanti Marques, que me acompanham desde a graduação, pelo companheirismo nessa trajetória;

Ao Programa de Pós-graduação em Inovação e Tecnologia Integradas a Medicina Veterinária para o Desenvolvimento Regional, pela oportunidade oferecida;

E a todos que de alguma forma contribuiu e participou desse momento da minha vida;

MUITO OBRIGADO!

EPÍGRAFE

"Agora estou prestes a ir pelo caminho de toda a terra. Vocês sabem, lá no fundo do coração e da alma, que nenhuma das boas promessas que o Senhor, o seu Deus, lhes fez deixou de cumprir-se. Todas se cumpriram; nenhuma delas falhou."

Josué 23:14

RESUMO

Listeria monocytogenes é destacado como sendo um patógeno bacteriano que causa doença grave em pessoas e animais, chamada listeriose. Em todo o mundo, estima-se que quase 90% dos casos humanos ocorrem após o consumo de alimentos contaminados. Objetivou-se verificar a ocorrência de *L. monocytogenes* e os aspectos microbiológicos nos queijos coalho e de manteiga comercializados fatiados no comércio varejista do município de Arapiraca - AL. Foram colhidas 60 amostras de queijos em estabelecimentos varejistas, entre agosto e dezembro de 2018. Foi realizada Pesquisa de Listeria spp., determinação do NMP de Coliformes a 45°C e contagens de Mesófilos e Psicotróficos. Detectou-se a presença de *Listeria monocytogenes* em duas amostras, que posteriormente foram confirmadas através de qPCR. Em relação ao NMP de Coliformes a 45°, 83,3% (25/30) das amostras de queijo coalho e 80% (24/30) das amostras de queijo manteiga encontravam-se acima do limite. As contagens de mesófilos em amostras de queijos manteiga variaram entre 1×10^3 e 6×10^5 e entre 1×10^3 e $1,24 \times 10^7$ UFC/g em queijos coalho. Os valores obtidos na análise de microrganismos psicotróficos variaram entre 1×10^3 e $3,4 \times 10^5$ em queijos coalho e entre 1×10^3 e 2×10^5 , em queijos manteiga. A *L. monocytogenes* ocorre em queijos coalhos comercializados fatiados em estabelecimentos varejistas de Arapiraca – AL e as condições higiênico-sanitárias inadequadas durante a cadeia produtiva desses queijos representam um risco à saúde pública.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*. Queijos fatiados. Comércio varejista.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is highlighted as being a bacterial pathogen that causes severe disease in people and animals, called listeriosis. Around the world, it is estimated that almost 90% of human processes were performed after consumption of contaminated food. The objective of this study was to verify the occurrence of *L. monocytogenes* and the microbiological aspects in the cheeses of the rennet and butter marketed sliced in the retail trade of the municipality of Arapiraca-AL. 60 cheese samples were collected in establishments Between August and December 2018. The research of *Listeria* spp., determination of the NMP of coliforms at 45 ° C, and Mesophilic and psytrotrophic counts were performed. The presence of *Listeria monocytogenes* was detected in two samples, which were subsequently confirmed by qPCR. In relation to the NMP of Coliformes at 45 °, 83.3% (25/30) of the samples of rennet cheese and 80% (24/30) of the samples of butter cheese were above the limit. The mesophilic counts in butter cheese samples ranged from 1×10^3 to 6×10^5 and between 1×10^3 and 1.24×10^7 CFU/g in Coalho cheeses. The values obtained in the analysis of psychrotrophic microorganisms ranged from 1×10^3 to 3.4×10^5 in cheeses and between 1×10^3 and 2×10^5 , in butter cheeses. *L. monocytogenes* occurs in cheeses sold sliced in stores of Arapiraca – AL and inadequate hygienic-sanitary conditions during the production chain of these cheeses represent a risk to public health.

Keywords: *Listeria monocytogenes*. Sliced cheeses. Retail trade.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência das espécies de *Listeria* encontradas em queijos coalho comercializados no município de Arapiraca – AL 27

Tabela 2 - Frequência das espécies de *Listeria* encontradas em queijos manteiga comercializados no município de Arapiraca – AL 29

Tabela 3 - Médias dos resultados das análises de coliformes a 45°C, microrganismos mesófilos e psicrotróficos em queijos coalho e manteiga, conforme o tipo de fiscalização 30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
µm	Micrômetro
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
Aw	Atividade de Água
BPF	Boas Práticas de Fabricação
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EPI	Equipamento de Proteção Individual
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
IN	Instrução Normativa
ISO	International Organization for Standardization
LLO	Listeriolisina O
LM	<i>Listeria monocytogenes</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NMP	Número Mais Provável
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
pH	Potencial Hidrogênionico
qPCR	Reação da Cadeia Polimerase em Tempo Real Qualitativo
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RTIQ	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
SIE	Serviço de Inspeção Estadual
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SIM	Serviço de Inspeção Municipal
SSI	Sem Selo de Inspeção
UE	União Europeia
UFC/g	Unidade Formadora de Colônia por grama

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. Queijos coalho e manteiga	12
2.2. Aspectos microbiológicos dos queijos	13
2.3. Gênero <i>Listeria</i>	14
2.4. <i>Listeria monocytogenes</i>	15
2.5. Listeriose	17
2.6. Surto de Listeriose	19
2.7. Legislação	20
3. ARTIGO	22
4. REFERÊNCIAS	36
5. ANEXOS	44

1. INTRODUÇÃO

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's) são motivo de grande preocupação de saúde pública global. Sua ocorrência é favorecida pela ingestão de alimentos e/ou água contaminados. Os sintomas dependem do tipo de patógeno, sendo os mais comuns vômitos, náuseas, dores abdominais e diarreia. O período de incubação varia conforme o agente etiológico, mas usualmente é curto, variando de 1 a 7 dias. O tratamento das DTA's depende da sintomatologia, mas em geral, trata-se de doença autolimitada, por isso o baseia-se em medidas de suporte para evitar a desidratação e óbito (BRASIL, 2019).

Nos Estados Unidos da América, em 2016, houve 24.029 casos de DTA, com 5.512 hospitalizações e 96 mortes (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013). No Brasil, foram reportados 12.503 casos de (surtos) DTA's, entre os anos de 2010 e 2017, com 236.403 hospitalizações e 182 mortes (BRASIL, 2018).

Nesse cenário, *Listeria monocytogenes* é destacado como sendo um patógeno bacteriano que causa doença grave em pessoas e animais, chamada listeriose. Em todo o mundo, estima-se que quase 90% dos casos humanos ocorrem após o consumo de alimentos contaminados. Os alimentos mais frequentemente implicados, tanto em surtos como em casos esporádicos, são os queijos, salsichas, leite não pasteurizado, produtos lácteos, saladas e produtos prontos refrigerados (CARTWRIGHT, et al. 2013).

Os casos de listeriose em animais estão diretamente relacionadas com a ingestão de silagem contaminada. Isto deve-se ao fato de a silagem estar indevidamente armazenada, proporcionando um meio favorável ao crescimento da bactéria. A doença apresenta-se através de três formas: a forma encefálica, a septicêmica e a abortiva. Os sinais clínicos variam de acordo com o animal, podendo este apresentar hipertermia, prostração, inapetência, anorexia e a presença de sinais neurológicos que diferem dependendo da localização das lesões provocadas pela *L. monocytogenes* no SNC. (STECKLER et al., 2017; DHAMA et al., 2015; FENTAHUN, 2012)

Por apresentar natureza ubíqua, *L. monocytogenes* pode se estabelecer em ambientes diversificados, tendo sido recuperada inclusive tanto em ambientes domésticos, tais como superfícies de cozinhas e refrigeradores, como em plantas de fabricação e embalagem, instalações de distribuição e armazenamento. Além disso, a capacidade de sobreviver por longos períodos em temperaturas de refrigeração e de congelamento, torna esse patógeno responsável pelo aumento dos riscos de contaminação de alimentos (LEONG et al. 2017; WIECKZOREC e OZEK, 2017).

Um fator relevante que contribui para a multiplicação dos microrganismos em queijos é a prática de fatiar esse alimento, muito praticada por estabelecimentos varejistas. O fatiamento eleva o risco de contaminação, devido às condições de higiene durante a manipulação e ao contato com superfícies higienizadas de forma inadequada (FAI et al., 2011).

Desse modo, objetivou-se realizar uma revisão de literatura acerca das características dos queijos coalhos e manteiga, bem como sobre os aspectos microbiológicos com ênfase em *L. monocytogenes* e fatores de risco para a contaminação desses produtos, relacionando-os com os impactos gerados à saúde pública.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Queijos coalho e Manteiga

O consumo de produtos artesanais, como os queijos, é uma tradição em muitos estados brasileiros e está ligado à cultura regional. O modo de produção e as propriedades do leite estão relacionados com a qualidade dos queijos, assim, esses produtos refletem o território em que são fabricados. (ZAFFARI et al., 2007; PAQUEREAU et al., 2016).

De acordo com Dantas (2013), os queijos coalho e manteiga são considerados patrimônios da população nordestina, com grande importância no contexto sociocultural e econômico da região. Devido à simples tecnologia aplicada na elaboração desses queijos, esses produtos são fabricados em larga escala e fazem parte das refeições diárias da população. Sendo assim, o estímulo ao consumo desse produto significa proteger uma cultura e a singularidade de seu ambiente histórico e cultural.

Queijo de coalho é um alimento típico brasileiro, produzido a partir de leite cru ou pasteurizado na Região Nordeste há mais de 150 anos. Tem como principais características o sabor ligeiramente salgado e ácido e sua resistência ao calor sem derreter, dessa forma permite a preparação do “popular” queijo assado. O queijo de Coalho é produzido principalmente nos estados do nordeste do Brasil: Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Alagoas. Esse queijo tem uma participação considerável na economia, na qual é importante na composição da renda dos fornecedores de leite, principalmente daqueles que não têm acesso a unidades de processamento de leite (QUEIROGA et al., 2013; SILVA et al., 2012; PAQUEREAU et al., 2016).

O queijo de manteiga surgiu no período da colonização dos sertões, sendo, portanto, um produto genuinamente brasileiro, no entanto, com influências de outras culturas (VENTURA, 1987). Entende-se por Queijo de Manteiga “o produto obtido mediante coagulação do leite com emprego de ácidos orgânicos de grau alimentício, cuja massa é submetida à dessoragem, lavagem e fusão, com acréscimo exclusivamente de manteiga de garrafa ou manteiga da terra ou manteiga do sertão” (BRASIL, 2001).

O queijo de manteiga apresenta como características sensoriais, consistência macia, tendendo à untuosidade, textura fechada, semi-friável, podendo conter gotículas de gordura líquida no seu interior. A cor é amarelo-palha, proveniente da manteiga de garrafa. O sabor é pouco acentuado, lembrando a manteiga de garrafa, levemente ácido, podendo ser salgado ou

não. A crosta é fina, sem trincas. Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de Queijo de Manteiga, o produto é caracterizado por conter um teor de gordura nos sólidos totais variando entre 25% e 55%, devendo apresentar um teor máximo de umidade de 54,9% (BRASIL, 2001).

Apesar de existirem poucos estudos sobre o queijo de manteiga, a maioria demonstra uma grande variação em relação a sua composição, principalmente em relação à gordura, umidade e extrato seco, os quais são parâmetros fundamentais utilizados na classificação deste queijo. No estado do Rio Grande do Norte, por exemplo, a qualidade do leite usado na fabricação informal de queijos artesanais não é considerada de boa qualidade e de acordo com Medeiros et al. (2017), em vinte e quatro por cento deste leite há suspeita de fraude, o que também influencia nos parâmetros pesquisados no queijo de manteiga.

2.2 Aspectos microbiológicos dos queijos

Os queijos artesanais são alimentos muito manipulados e, por esse motivo, passíveis de contaminação, especialmente de origem bacteriológica. Essa condição é agravada pelo uso do leite cru, principalmente quando não há emprego de boas práticas ou não são maturados por período suficiente. A pesquisa bacteriológica permite, muitas vezes, entender as condições sob as quais um produto foi produzido, sendo fundamental na produção de alimentos seguros e na garantia da saúde do consumidor (PINTO, 2009).

A contaminação microbiana de queijos merece atenção ao considerar que bactérias patogênicas são comumente encontradas em derivados lácteos. Vários estudos indicam a contaminação de queijos por microrganismos patogênicos, tais como: *E. coli* e *L. monocytogenes* (ARAÚJO et al., 2017; FOX et al., 2017).

Os queijos são muitas vezes considerados fontes de infecção, especialmente os queijos frescos e artesanais (FEITOSA et al., 2003). Eles podem ser facilmente contaminados entre o processo de ordenha e sua chegada ao mercado de varejo, mesmo quando um tratamento térmico ou um processo de pasteurização são realizados nos estágios iniciais de produção. Com isso, os consumidores ficam suscetíveis a doenças transmitidas por alimentos. Estas doenças são causadas principalmente por *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* patogênica e, menos frequentemente, *Listeria monocytogenes* (DE BUYSER et al., 2001; KOUSTA et al., 2010).

A presença de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo é bastante preocupante, devido as suas características psicrotróficas, resistência à alta concentração de sal e capacidade para sobreviver e crescer em alimentos refrigerados, de forma aeróbica e anaeróbia, em uma ampla gama de pH, que varia de 4,6 a 9,4 (BRASILEIRO et al. 2016; DU et al., 2017).

Os alimentos que são consumidos sem tratamento térmico adicional são as principais fontes de surtos de listeriose. A principal via de contaminação para *L. monocytogenes* é através da contaminação cruzada entre equipamentos e alimentos durante o processamento, pois a bactéria possui a capacidade de persistir em nichos ambientais, como rachaduras em equipamentos, os quais conferem proteção contra a rotina de higienização (MORETRO et al., 2017).

2.3 Gênero *Listeria*

O gênero *Listeria* spp. já possui pelo menos 17 espécies identificadas (ORSI E WIEDMANN, 2016), classificado quanto à morfologia em bacilos curtos (0,4 a 0,5 μm de diâmetro e 0,5 a 2 μm de comprimento), composto por microrganismos anaeróbios facultativos, gram-positivos, catalase-positivos, produtores de ácido lático a partir da glicose e de outros açúcares, móvel quando cultivada a 25°C e pouco imóvel a 37°C, não formador de esporos, psicrotrófico, que apresentam ampla distribuição em amostras alimentares, ambientais e clínicas (TAO et al., 2017).

Devido a essa condição ubiquitária e à tolerância a severas condições ambientais, a *Listeria* pode contaminar alimentos em múltiplos pontos durante as etapas de fabricação e distribuição. Sua capacidade de crescer também em temperaturas de refrigeração eleva o risco de contaminação cruzada dos alimentos refrigerados, sendo os alimentos prontos para consumo, como carnes, aves e laticínios os principais veículos para a transmissão (LIU et al., 2015).

Até a década de 40, *L. monocytogenes* era a única espécie reconhecida do gênero *Listeria*. Pouco antes da década de 1990, já tinham descritas, ao total, seis espécies – *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. grayi* - denominadas como os gêneros “clássicos” de *Listeria* spp., isoladas de alimentos. As espécies isoladas variavam de acordo com o tipo de alimento e a metodologia de detecção utilizada, embora *L. innocua* e *L. monocytogenes* serem as mais frequentemente isoladas (BARRE et al., 2016).

Dentre as 17 espécies de *Listeria*, apenas *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são consideradas patogênicas. *L. monocytogenes* é patogênica para o homem e, é o agente causador da listeriose, uma das mais severas infecções alimentares. Essa infecção alimentar aparece como a terceira principal causa de óbitos entre DTA's nos Estados Unidos. Os casos de doenças e surtos causados por este microrganismo têm um impacto econômico considerável para a sociedade e para indústria de alimentos (IVANEK et al., 2004; ORSI; WIEDMANN, 2016; AMAJOURD et al., 2017).

2.4 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes diferencia-se de outros patógenos causadores de doenças de origem alimentar pela capacidade de se multiplicar em uma ampla faixa de temperatura, de 0 a 45 °C, e de pH, de 4,1 a 9,6, podendo sobreviver nos alimentos por um longo período de tempo; também tem a capacidade de se multiplicar em altas concentrações de sal (NaCl), 10 %, e de sobreviver em concentrações ainda maiores; além de crescer em condições de atividade de água (aw) de 0,90 a 0,97. (FRIEDLY et al., 2008).

A característica psicrotrófica desse patógeno é possível devido um prolongamento da fase lag em temperaturas de refrigeração e da integridade celular, onde o sistema de transporte energético resistente ao frio estimula o metabolismo sob baixas temperaturas, propiciando altas concentrações de substratos intracelulares (MANTILLA et al., 2007). O congelamento a -18°C e descongelamentos sucessivos não são capazes de inativar essa espécie (COLE et al., 1990; SCHUCHAT et al., 1991; JAY, LOESSNER & GOLDEN, 2005).

O fatiamento eleva o risco de contaminação, devido às condições de higiene durante a manipulação e ao contato com superfícies higienizadas de forma inadequada (FAI et al., 2011). Para Luber et al. (2011), a etapa de fatiamento deve ser considerada um ponto crítico de controle, pois submete produtos que atendem a uma expressiva parcela da população, como os produtos fatiados em supermercados, à manipulação excessiva e ao risco de contaminação cruzada, na mesma ordem do ambiente industrial. Além disso, produtos fatiados geralmente não são tratados termicamente após a comercialização, sendo destinados ao pronto consumo.

Atualmente, já são conhecidos treze sorotipos de *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7), sendo essa heterogeneidade antigênica relacionada com o grande número de hospedeiros nos quais o agente é capaz de se multiplicar (JAY,

LOESSNER & GOLDEN, 2005). Todos os sorotipos de *L. monocytogenes* possuem potencial de causar listeriose em humanos (LOTFOLLAHI et al., 2017), no entanto, os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b estão envolvidos em mais de 95% dos casos (FARBER & PETERKIN, 1991; ROCOURT, 1996; CHAE & SCHRAFT, 2000; WIEDMANN et al., 2002; DOUMITH et al., 2004a; HAIN et al., 2007; LIU et al., 2007; PORT & FREITAG, 2007; SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007). Entre esses três sorotipos, as cepas do sorotipo 4b são associadas a mais de 50% dos casos da doença em todo o mundo (BORUCKI et al., 2003). Esta predominância sugere uma melhor adaptação aos tecidos dos hospedeiros mamíferos do que o sorotipo 1/2 (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001), que por sua vez é mais relacionado com alimentos e ambientes industriais (BORUCKI et al., 2003).

Ao longo do seu processo evolutivo, *L. monocytogenes* adquiriu uma variedade de fatores de virulência que lhe permitem viver em diferentes ambientes na forma livre, na forma de biofilmes ou na forma intracelular nas células do hospedeiro (CAMARGO et al., 2016).

Sua patogenicidade está concentrada em sua habilidade de sobreviver e multiplicar-se em células fagocitárias dos hospedeiros. A *L. monocytogenes* produz protuberâncias nas células adjacentes e entra no citoplasma para repetir o ciclo onde escapa do vacúolo e se multiplica (CRUZ et al., 2008), por ser um patógeno intracelular facultativo, capaz de crescer em macrófagos, células epiteliais e fibroblastos. Todas as cepas virulentas produzem uma hemolisina, a listeriolisina O (LLO), que tem relação genética com a estreptomicina O e a pneumolisina. Após a ruptura das membranas dos lisossomas, as enzimas são liberadas e provocam a destruição dos macrófagos e monócitos (MANTILLA et al., 2007).

Além da liberação das células bacterianas no citoplasma celular, por meio da formação de poros na membrana dos vacúolos, as LLO são as proteínas responsáveis pela atividade hemolítica em isolados virulentos, cuja ação pode ser evidenciada ao redor das colônias quando cultivadas em ágar sangue. É uma hemolisina, formadoras de poros colesterol-dependentes, sendo necessária para a sobrevivência e proliferação de *L. monocytogenes* dentro de macrófagos e fagócitos, e é considerada o principal fator de virulência do patógeno (VAZQUEZ-BOLAND et al., 1989; COSSART, 2002).

A hemólise é uma importante característica, que poderá ser diretamente relacionada com a patogenicidade da Listeria, as *Listeria* spp não hemolíticas são praticamente consideradas não patogênicas (COURTIEU, 1991). A hemólise é o principal fator de virulência de *L. monocytogenes*, outras duas espécies de *L. seeligeri* e *L. ivanovii*, são β -hemólise, sendo que a espécie não-patogênica (*L. seeligeri*) forma um estreito halo de

hemólise, similar ao de *L. monocytogenes*, já a *L. ivanovii* produz um halo muito maior (KONEMAN et al, 2001). Vale ressaltar que tem sido observado que todas as amostras de *Listeria* patogênica são hemolíticas, mas nem toda *Listeria* hemolítica é patogênica. (HOF; ROCOURT, 1992).

L. monocytogenes tem sido considerada como um patógeno de mais de 50 mamíferos, incluindo humanos, aves silvestres, peixes e crustáceos, caracterizando que a transmissão zoonótica é relevante. Não pode ser descartada a possibilidade de animais e humanos saudáveis serem portadores da bactéria (JAY, 2005).

2.5 Listeriose

A maioria dos casos de listeriose em humanos é de origem alimentar, sendo que os alimentos prontos para o consumo representam os alimentos de maior risco na transmissão (FAO/WHO, 2004; SCALLAN et. al., 2011). Em adultos saudáveis, as infecções com *L. monocytogenes* são raras e tipicamente causam uma doença gastrointestinal relativamente leve (RYSER & MARTH, 2007), sendo o período médio de incubação de 24 horas. Nestes casos, os sintomas são diarreia, febre, dor abdominal, dor de cabeça e mialgias, entretanto, a maioria dos pacientes recuperam-se sem a necessidade de tratamento com antibióticos (SWAMINATHAN & GERNERSMIDT, 2007).

Caso o sistema imune não seja capaz de controlar de forma eficiente a infecção, a multiplicação persiste e a infecção pode atingir a corrente sanguínea e os linfonodos. Após a chegada na corrente sanguínea, a maioria das bactérias atingem o fígado e o baço, onde ocorre a replicação no interior dos macrófagos. Se não houver uma resposta imune eficaz, o microrganismo pode atingir o cérebro e a placenta (VERA et al., 2013).

Vários fatores podem contribuir para o desenvolvimento de listeriose em humanos, como o número de células bacterianas ingeridas, a imunidade do hospedeiro e o potencial de virulência de cada cepa (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001). A doença pode ser caracterizada por três síndromes: gastroenterite febril; listeriose maternofoetal/neonatal; bacteremia com ou sem acometimento do sistema nervoso central (CAMARGO et al., 2016).

Existem duas formas de listeriose associadas com *L. monocytogenes*: não invasiva e invasiva. A forma não invasiva é a mais branda e se apresenta como uma gripe e ou uma doença gastrointestinal autolimitada, caracterizada pelo desenvolvimento de febre, diarreia,

náusea, vômito, dor de cabeça e mialgia; ocorre dentro de 12 a 24 horas após a exposição (NEWELL et al.,2010).

Já a forma invasiva, que acomete normalmente os indivíduos imunocomprometidos, idosos, gestantes e neonatos, caracteriza-se por uma alta taxa de letalidade, cuja taxa média varia entre 20 a 30% e a mais elevada taxa de internação hospitalar (90%) entre todos os agentes patogênicos de origem alimentar (LEONG et al., 2017). Uma vez ingeridas, *L. monocytogenes* invadem o epitélio gastrointestinal, passam para a corrente sanguínea, podendo infectar órgãos como fígado, baço e sistema linfático. Pode atravessar a barreira da placenta e infectar o feto, levando a parto prematuro, natimortos e ou abortos. A natureza invasiva desse microrganismo leva a condições fatais, como sepse, encefalites e meningites. Podem incluir outras infecções como endocardite, peritonite, pneumonia e osteomielite (LUBER et al., 2011).

Em casos de meningite listérica, a taxa de mortalidade pode chegar a 70%, já quando causa septicemia a taxa de mortalidade é de 50% e em infecções perinatais neonatais é acima de 80%. As infecções também podem ocorrer sem a presença de sintomas, resultando na excreção fecal de *L. monocytogenes* (FORSYTHE, 2013). Apresentações mais raras neste grupo, incluem meningoencefalite e encefalite, em conjunto com as infecções focais, dentre elas endocardite, pneumonia, peritonite e formação de abscessos (MCLAUHLIN et al., 2004).

Em adultos mais velhos, geralmente com mais de 50 anos de idade, e indivíduos imunocomprometidos, a listeriose invasiva geralmente apresenta tropismo pelo sistema nervoso central, cursando com septicemia, meningite, meningoencefalite, romboencefalite e abscessos cerebrais (DISSON & LECUIT, 2012).

O período de incubação da listeriose, desde a exposição até o aparecimento da sintomatologia, é muito variável, podendo ocorrer de 1 a 90 dias, o que torna a identificação do patógeno e o rastreamento da fonte de alimentos contaminados de difícil detecção. A dose infectante de *L. monocytogenes* para humanos não está claramente estabelecida, podendo variar de acordo com as condições imunitárias do hospedeiro e à variabilidade na virulência do patógeno. Outra dificuldade de se estabelecer a dose infectante está no fato do longo período de incubação da doença e nesse tempo poder haver multiplicação, morte ou injúria do microrganismo no alimento incriminado ou até não haver mais o alimento disponível para pesquisa do patógeno (MARTINS; LEAL GERMANO, 2011).

2.6 Surtos de Listeriose

Surto de Listeriose estão comumente associados ao consumo de produtos alimentares prontos para o consumo, como por exemplo, o queijo e embutidos cárneos (HEIMAN et al., 2016), por outro lado, a contaminação dos alimentos com este patógeno pode resultar na sobrevivência e crescimento do microrganismo durante o armazenamento, mesmo em temperaturas de refrigeração devido à sua natureza psicrófila (NASSAU et al., 2017).

O primeiro surto de listeriose de origem alimentar, registrado e documentado, foi na América do Norte em 1981, no Canadá. O surto envolveu a ingestão de salada contendo repolho contaminado pelo adubo utilizado proveniente de ovinos, o que resultou em 41 pessoas acometidas e 11 mortes (SCHLECH III et al., 1983).

No ano de 2015, Food and Drug Administration (FDA) listou mais de 25 casos de listeriose devidos a alimentos prontos para o consumo contaminados com *L. monocytogenes* nos Estados Unidos (LUCHANESKY et al., 2017). Na maioria dos países da União Europeia, os casos de listeriose são de notificação obrigatória. As infecções por *L. monocytogenes* são relatadas na população idosa na faixa etária entre 64 e 84 anos. De acordo com o Regulamento 2073/2005, a tolerância permitida de um valor menor ou igual a 100 unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) aplica-se durante toda a vida de prateleira dos alimentos no mercado (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2015).

No Brasil, as informações sobre as doenças causadas pela ingestão de alimentos contaminados por micro-organismos com potencial patogênico são bastante escassas. Há uma grande deficiência no diagnóstico clínico e na notificação de casos e surtos de listeriose alimentar, o que se reflete na inexistência de relatos oficiais por parte das autoridades sanitárias resultando na falta de dados que ilustrem a magnitude da listeriose no país (CRUZ, MARTINEZ & DESTRO, 2008). Apesar da deficiência na descrição de surtos de listeriose de origem alimentar no país, são frequentes os trabalhos relatando a presença de *L. monocytogenes* em alimentos variados e no ambiente industrial (CAMARGO et al., 2014; BYRNE et al., 2016; SILVA et al., 2016; IGLESIAS et al., 2017; OXARAN et al., 2017; SCHÄFER et al., 2017).

2.7 Legislação

Os países diferem em sua legislação em relação a presença de *L. monocytogenes* em alimentos. Alguns deles, como os Estados Unidos, segue uma política de tolerância zero sobre a presença desse patógeno em alimentos prontos para consumo (GELBÍCOVÁ & KARPÍSKOVÁ, 2009). No entanto, em 2008, a Food and Drug Administration (FDA) publicou um Guia de Política de Conformidade que propõe uma tolerância de 100 Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/g em alimentos prontos para o consumo que não suportam a multiplicação de *Listeria* spp. (FDA, 2008). Nos Estados-Membros da União Europeia (UE), o Regulamento nº 34 2073/2005 permite uma contagem de até 100 UFC/g nos alimentos prontos para o consumo, sendo este limite considerado seguro para os consumidores (UE, 2005).

No Brasil, o queijo é o único tipo de alimento que possui padrão em relação *L. monocytogenes*. A Portaria 146/1996 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 1996) e a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001) estabelece os requisitos microbiológicos para queijos e determina que os produtos de umidade acima de 46% devem ser isentos desse patógeno.

Resolução RDC nº 216 (BRASIL, 2004), estabelece procedimentos de boas práticas para serviços de alimentação a fim de garantir as condições higiênico-sanitárias do alimento preparado. Essa legislação define serviços de alimentação, estabelecimentos que realizam, entre outras atividades, o fracionamento, armazenamento e exposição à venda e define como alimento preparado os alimentos manipulados e preparados em serviços de alimentação, expostos à venda embalados ou não. Esta resolução determina medidas com o intuito de minimizar o risco de contaminação cruzada, como evitar o contato direto ou indireto entre alimentos crus, semi-preparados; lavagem e antissepsia das mãos dos manipuladores antes do manuseio do alimento preparado; as matérias primas e os ingredientes devem ser expostos à temperatura ambiente somente pelo tempo mínimo necessário para o fatiamento e quando as matérias-primas e os ingredientes não forem utilizados em sua totalidade, devem ser adequadamente acondicionados e identificados com, no mínimo, as seguintes informações: designação do produto, data de fracionamento e prazo de validade após a abertura ou retirada da embalagem original.

Um ponto importante a se considerar na Resolução RDC nº 216 (BRASIL, 2004), é a informação do prazo máximo de consumo do alimento preparado e sob refrigeração a

temperatura de 4°C, ou inferior, deve ser de 5 dias. Quando forem utilizadas temperaturas superiores a 4°C e inferiores a 5°C, o prazo de consumo deve ser reduzido, de forma a garantir as condições higiênico-sanitárias do alimento.

Em relação à validade, segundo a Instrução Normativa nº 22 (BRASIL,2005), a validade e as informações sobre conservação doméstica são de responsabilidade da empresa; onde devem constar nos rótulos das embalagens de produtos de origem animal, que exijam condições especiais para a sua conservação, deve ser incluída uma legenda com caracteres bem legíveis, indicando as precauções necessárias para manter as características normais, devendo ser indicadas as temperaturas máxima e mínima para a conservação do produto e o tempo que o fabricante, produtor ou fracionador garante sua durabilidade nessas condições. O mesmo dispositivo é aplicado para produtos de origem animal que pode se alterar depois de abertas suas embalagens originais como é o caso das peças inteiras de queijos fracionadas nos supermercados.

3. ARTIGO

**OCORRÊNCIA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM QUEIJOS COALHO E
MANTEIGA COMERCIALIZADOS FATIADOS NO COMÉRCIO VAREJISTA DE
ARAPIRACA-AL**

**(submetido à revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia –
Qualis A2)**

OCORRÊNCIA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM QUEIJOS COALHO E MANTEIGA COMERCIALIZADOS FATIADOS NO COMÉRCIO VAREJISTA DE ARAPIRACA-AL

OCCURRENCE OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN CHEESES COALHO AND BUTTER MARKETED SLICED IN THE RETAIL TRADE OF ARAPIRACA – AL

Alisson Rogério dos Santos Torres¹; Taynara Farias Teixeira de Santana¹; Karla Patrícia Chaves²; Julicelly Gomes Barbosa Macêdo²; Sílvio Gomes de Sá²; Oscar Boaventura Neto²

¹Mestrando (a) em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Alagoas – Unidade Educacional Viçosa - AL

²Professor (a) Adjunto (a) do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Alagoas – Unidade Educacional Viçosa - AL

Resumo

Objetivou-se verificar a ocorrência de *L. monocytogenes*, bem como caracterizar o perfil microbiológico de queijos coalho e de manteiga comercializados fatiados no comércio varejista do município de Arapiraca - AL. Foram colhidas 60 amostras de queijos em estabelecimentos varejistas, entre agosto e dezembro de 2018. Foram realizadas Pesquisa de *Listeria* spp., Determinação do NMP de Coliformes a 45°C e Contagens de Mesófilos e Psicotróficos. Detectou-se a presença de *Listeria monocytogenes* em duas amostras, posteriormente confirmadas através de qPCR. Em relação ao NMP de Coliformes a 45°, 83,3% (25/30) das amostras de queijo coalho e 80% (24/30) das amostras de queijo manteiga encontravam-se acima do limite. As contagens de mesófilos em amostras de queijos manteiga variaram entre 1×10^3 e 6×10^5 e entre 1×10^3 e $1,24 \times 10^7$ UFC/g em queijos coalho. Os valores obtidos na análise de microrganismos psicotróficos variaram entre 1×10^3 e $3,4 \times 10^5$ em queijos coalho e entre 1×10^3 e 2×10^5 , em queijos manteiga. A *L. monocytogenes* ocorre em queijos coalhos comercializados fatiados em estabelecimentos varejistas de Arapiraca – AL e as condições higiênico-sanitárias inadequadas durante a cadeia produtiva desses queijos representam um risco à saúde pública.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*; queijos fatiados; comércio varejista

Abstract

The objective of this study was to verify the occurrence of *L. monocytogenes*, as well as to characterize the microbiological profile of sliced cheeses and of butter marketed in the retail trade of the municipality of Arapiraca-AL. 60 cheese samples were collected in Establishments between August and December 2018. The research of *Listeria* spp., determination of the NMP of coliforms at 45°C, and Mesophilic and psychrotrophic counts were performed. The presence of *Listeria monocytogenes* was detected in two samples, subsequently confirmed by qPCR. In relation to the NMP of Coliformes at 45 °, 83.3% (25/30) of the samples of rennet cheese and 80% (24/30) of the samples of butter cheese were above the limit. The mesophilic counts in butter cheese samples ranged from 1×10^3 to 6×10^5 and between 1×10^3 and 1.24×10^7 CFU/g in Coalho cheeses. The values obtained in the analysis of psychrotrophic microorganisms ranged from 1×10^3 to 3.4×10^5 in cheeses and between 1×10^3 and 2×10^5 , in butter cheeses. *L. monocytogenes* occurs in cheeses sold sliced in stores of Arapiraca – AL and inadequate hygienic-sanitary conditions during the production chain of these cheeses represent a risk to public health.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; Sliced cheeses; Retail trade

Introdução

Os queijos coalho e manteiga são considerados patrimônios da população nordestina, com grande importância no contexto sociocultural e econômico da região. Devido à simples tecnologia aplicada na elaboração desses queijos, esses produtos são fabricados em larga escala e fazem parte das refeições diárias da população. Sendo assim, o consumo desse produto significa proteger uma cultura e a singularidade de seu ambiente histórico (DANTAS, 2013).

A contaminação microbiana de queijos merece atenção ao considerar que bactérias patogênicas são comumente encontradas em derivados lácteos. Vários estudos indicam a contaminação de queijos por microrganismos patogênicos, tais como: *S. aureus*, *E. coli* e *L. monocytogenes* (LM) (ARAÚJO et al., 2017). Segundo Chavada *et al.*, (2014), LM pode causar desde doenças gastrointestinais auto limitantes em pacientes comprometidos imunologicamente, como também meningite, septicemia e aborto. Nesses casos observa-se uma doença febril leve, que pode se agravar dependendo da idade gestacional no momento da infecção (MADJUNKOV, M.; CHAUDHRY, S.; ITO, S., 2017).

Surtos de Listeriose estão comumente associados ao consumo de produtos alimentares prontos para o consumo, como por exemplo, o queijo e embutidos cárneos (HEIMAN *et al.*, 2016), por outro lado, a contaminação dos alimentos com este patógeno pode resultar na sobrevivência e crescimento do microrganismo durante o armazenamento, mesmo em temperaturas de refrigeração devido à sua natureza psicrotrófica (NASSAU *et al.*, 2017).

Em nível mundial, a contaminação por LM em queijos vem sendo discutida por Lahou e Uyttendaele (2017) e Nassau *et al.* (2017). Esses autores demonstram que essa bactéria possui um potencial de crescimento interno em queijos, e estudam formas de combate com endolisinas para inativá-la. No Brasil, Oxaran *et al.*, (2017) e Prates *et al.* (2017), apontam o microrganismo como um importante patógeno em queijos de média umidade (46-54,9%) (BRASIL, 1996).

Na região nordeste do Brasil os estudos referentes à LM em queijos coalho e queijos manteiga são escassos, porém, a forma de produção e comercialização adotadas por alguns produtores e comerciantes desses queijos apresentam indícios de possíveis contaminações por este microrganismo, tais como: falta de conhecimento sobre boas práticas de fabricação, condições de exposição para venda do produto e o hábito de fatiá-lo.

Desse modo, objetivou-se verificar a ocorrência de *L. monocytogenes*, bem como caracterizar o perfil microbiológico de queijos coalho e de manteiga comercializados fatiados no comércio varejista do município de Arapiraca - AL.

Material e Métodos

Foram colhidas aleatoriamente 60 amostras de queijos, sendo 30 de queijo coalho e 30 de queijo manteiga, em estabelecimentos comerciais varejistas, tais como: padarias, mercadinhos e feiras-livres, do município de Arapiraca, estado de Alagoas, entre agosto e dezembro de 2018. Todas as amostras foram fatiadas no estabelecimento comercial e acondicionadas em bandejas de poliestireno cobertas por filme de PVC.

Após a colheita, as amostras foram transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável para o Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Alagoas – Unidade Educacional Viçosa, onde foram analisadas. As primeiras avaliações realizadas antes das análises microbiológicas foram prazo de validade, a procedência e a condição de exposição para venda dos produtos.

No tocante as análises microbiológicas, utilizando 25g de cada amostra, foram realizadas: pesquisa de *Listeria* spp. e em caso de positividade, realizou-se também a pesquisa

para *L. monocytogenes*. Outros 25g de cada amostra foram utilizados para determinação do número mais provável de coliformes a 45°C, contagem de microrganismos mesófilos e psicrotróficos.

As amostras foram submetidas a pesquisa de *Listeria* spp. e confirmação de LM conforme os protocolos descritos na ISO 11290-1. Para o isolamento e caracterização das cepas de *Listeria* spp. foram utilizados métodos fenotípicos, tais como: coloração de gram, catalase, motilidade, β -hemólise e fermentação de açúcares (xilose e ramnose), originadas de amostras fatiadas no próprio estabelecimento comercial (ISO, 1996; ISO, 2004).

As amostras positivas para *L. monocytogenes* na série bioquímica foram enviadas ao Laboratório de Análises Veterinárias TECSA LTDA, em Belo Horizonte – MG para execução do método de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Qualitativo (qPCR).

Para a contagem de coliformes foi utilizada a técnica do Número Mais Provável (NMP), conforme protocolo recomendado por Silva *et al.* (2007). Para a contagem de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis e a enumeração de microrganismos psicrotróficos, seguiu-se a metodologia descrita por Silva *et al.* (2007).

Por fim, realizou-se análise estatística descritiva simples com as frequências quantificadas como sendo dentro ou fora dos padrões, que foram posteriormente, comparadas à literatura pertinente e com a legislação vigente.

Resultados e Discussão

As 60 amostras adquiridas provenientes do comércio varejista do município de Arapiraca – AL encontravam-se dentro do prazo de validade, segundo informações contidas no rótulo. Em relação à procedência dos queijos coalho 6,7% (2/30) apresentavam o selo do Serviço de Inspeção Federal (SIF), 33,3% (10/30) apresentavam o selo do Serviço de Inspeção Estadual (SIE) e 60% (18,30) não receberam qualquer tipo de inspeção. Entre os queijos manteiga, 10% (3/30) possuíam o selo SIF, 36,7% (11/30) o selo SIE e 53,3% (16/30) não receberam qualquer tipo de inspeção.

Ao verificar a condição de exposição de venda dos queijos, observou-se que em ambos 46,7% (14/30) estavam sob temperatura de refrigeração e 53,3% (16/30) estavam sendo comercializados sob temperatura ambiente.

Dentre as 30 amostras de queijo coalho colhidas, 23,3% (7/30) apresentaram resultado positivo para a contaminação por *Listeria* spp. Dessas, 28,5% (2/7) tiveram positividade confirmada através dos testes bioquímicos para *L. monocytogenes*. Em relação às amostras de

queijo manteiga, 6,7% (2/30) foram positivas para *Listeria* spp. As espécies de *Listeria* identificadas após os testes bioquímicos encontradas nos queijos coalhos analisados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Frequência das espécies de *Listeria* encontradas em queijos coalho comercializados no município de Arapiraca – AL.

Nº da amostra	Procedência	Exposição de venda (refrigeração)	Espécie
10	SSI	Temperatura ambiente	<i>L. monocytogenes</i>
23	SSI	Temperatura ambiente	<i>L. monocytogenes</i>
4	SIE	Refrigerado (1 a 8°C)	<i>L. welshimeri</i>
5	SSI	Temperatura ambiente	<i>L. welshimeri</i>
12	SSI	Refrigerado (1 a 8°C)	<i>L. innocua</i>
14	SSI	Temperatura ambiente	<i>L. innocua</i>
6	SSI	Refrigerado (1 a 8°C)	<i>L. ivanovii</i>

SSI = Sem Selo de Inspeção; SIE = Selo de Inspeção Estadual.

A partir do isolamento e da caracterização das cepas por testes bioquímicos, observou-se que *L. monocytogenes* (28,5%), *L. wilshimeri* (28,5%) e *L. innocua* (28,5%) apresentaram maior frequência seguidas por *L. ivanovii* (14,5%) em queijos coalho. Nos queijos manteiga as amostras positivas eram referentes a uma cepa de *L. innocua* e outra de *L. ivanovii*.

L. innocua (não patogênica) possui uma taxa de crescimento mais rápida do que a *L. monocytogenes* (patogênica), tanto durante o enriquecimento através do Caldo Fraser na fase inicial da análise, como durante o isolamento nas placas, tornando o isolamento de *L. monocytogenes* mais difícil (PARK, 2014), ou seja, a presença de *L. innocua* durante o isolamento pode inibir ou tornar mais lento o crescimento de *L. monocytogenes*.

Há relatos de infecções humanas causadas por *L. ivanovii* que produziram quadros de gastroenterite e bacteremia em pacientes imunossuprimidos (GUILLET, 2010). Com exceção da LM e de *L. ivanovii*, nenhuma das outras espécies isoladas são capazes de causar toxinfecções (KARLI *et al.*, 2014), mas sugerem uma possível contaminação da área de produção, utensílios, equipamentos e/ou mãos dos manipuladores (LEONG *et al.*, 2017).

Foram confirmadas as presenças de *L. monocytogenes* nas duas amostras submetidas à qPCR. Os iniciadores *L. monocytogenes* utilizados foram projetados para uso específico e exclusivo *in vitro* e não detecta outras espécies de *Listeria*. A técnica utilizada possui especificidade e sensibilidade superiores a 95% (ANEXO I).

Dos muitos métodos para detectar *L. monocytogenes* em alimentos, os métodos de cultura continuam sendo o padrão ouro para isolamento e identificação do patógeno

(GARRIDO *et al.*, 2013). Porém, métodos moleculares, como técnicas de PCR são recomendadas para detectar *L. monocytogenes* devido a sua alta sensibilidade, especificidade e rapidez para a detecção e identificação de *L. monocytogenes*. No entanto, a sensibilidade, especificidade e detecção da PCR são dependentes dos genes-alvo, extração de DNA procedimentos e seqüências iniciadoras utilizadas (CHEN *et al.*, 2017).

Não foram encontrados na literatura estudos que demonstrem casos de listerioses em humanos ocasionados por outras espécies de listeria, com exceção da *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*. Apesar disso, Rocha *et al.* (2017), relatam pela primeira vez que células trofoblásticas bovinas são susceptíveis à infecções causadas por *L. ivanovii* e *L. innocua*.

Lahou e Uyttendaele (2017), explicam que as oportunidades de contaminação pós-processamento de queijo podem ocorrer em estabelecimentos varejistas de varejo, seja durante o amadurecimento do queijo (até 14°C), durante o armazenamento e a exposição na refrigeração gabinete (até 7°C) ou durante o fatiamento, principalmente. Para isso, esses autores avaliaram o potencial de crescimento de *L. monocytogenes* em queijos e verificaram que o microrganismo consegue se desenvolver melhor na superfície de corte dos queijos que dentro.

Prates *et al.* (2017), avaliando a qualidade e a segurança microbiológica na produção de queijos de média umidade (46%), coletaram 24 amostras entre matéria prima, swab das mãos dos manipuladores, e produto final em três laticínios situados na região sul do Rio Grande do Sul, com diferentes níveis de inspeção sanitária. Os resultados obtidos por esses autores não corroboram com a presente pesquisa visto que, não foi verificada a presença de *L. monocytogenes* nas amostras analisadas.

Oxaran *et al.* (2017), determinaram a incidência de *L. monocytogenes* em cinco laticínios e produtos de varejo nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil e observaram que apenas uma amostra (0,2%) foi positiva. Segundo os autores, esse resultado pode estar relacionado aos programas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) adotados pela indústria, atendendo às legislações sanitárias.

A presença de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo é bastante preocupante, pois devido as suas características psicrotróficas, resistência à alta concentração de sal e capacidade para sobreviver e crescer em temperaturas que podem variar entre 0 e 45°C, de forma aeróbica e anaeróbia, em uma ampla gama de pH, que varia de 4,6 a 9,4 (DU

et al., 2017), este microrganismo representa um sério problema de saúde pública, haja vista o risco de surtos de listerioses em potencial.

Para Moretro *et al.* (2017), os queijos são fontes de surtos de listeriose e a principal via de contaminação para *L. monocytogenes* é através da contaminação cruzada entre equipamentos e alimentos durante o processamento, pois a bactéria possui a capacidade de persistir em nichos ambientais, como rachaduras em equipamentos, os quais conferem proteção contra a rotina de higienização.

Não foram encontrados na literatura nacional e internacional trabalhos relacionados à pesquisa de *L. monocytogenes* em queijos manteiga. Em nosso estudo, 6,6% (2/30) das amostras foram positivas para pesquisa de *Listeria* spp. (Tabela 2), as quais após a caracterização por testes bioquímicos verificaram-se que se tratava de uma cepa de *L. innocua* e outra de *L. ivanovii*, ambas sem importância em alimentos (KARLI *et al.*, 2014).

Nº da amostra	Procedência	Exposição de venda (refrigeração)	Espécie
1	SIE	Temperatura ambiente	<i>L. innocua</i>
2	SSI	Temperatura ambiente	<i>L. ivanovii</i>

Tabela 2. Frequência das espécies de *Listeria* encontradas em queijos manteiga comercializados no município de Arapiraca – AL.

SSI = Sem Selo de Inspeção; SIE = Selo de Inspeção Estadual.

Nesse sentido, o presente resultado foi semelhante ao de Cuevas-González *et al.* (2017), que também verificaram ausência do microrganismos em amostras de queijo artesanal semelhante ao queijo manteiga em Sonora (México), corroborando assim com esta pesquisa. É válido salientar, que os próprios autores produziram os queijos analisados a fim de explorarem o seu processo de produção, composição química e qualidade microbiológica.

Por outro lado, Oxaran *et al.* (2017), ao determinarem a prevalência de *L. monocytogenes* na indústria de laticínios do sudeste e centro-oeste do Brasil, detectaram que 18,8% (3/16) amostras de queijos Mozzarella comercializados fatiados foram positivas para *L. monocytogenes*. Os autores sugerem uma possível contaminação cruzada do queijo por esse patógeno durante o fatiamento feito pelos estabelecimentos varejistas, pois não foi observada a presença do microrganismo nas amostras de queijo analisadas ao fim da produção na indústria.

No Brasil, a legislação vigente, através da Portaria 146/1996 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 1996) e a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001)

estabelece os requisitos microbiológicos para queijos e determina que os produtos de umidade acima de 46% devem ser isentos desse patógeno.

Observou-se um aumento do número de microrganismos coliformes a 45°C, mesófilos e psicotróficos em relação ao tipo sistema de fiscalização atribuído aos queijos, como apresentados na Tabela 3. Vale destacar que a contagem de todos os microrganismos analisados foi maior nos queijos que não dispunham de qualquer tipo de fiscalização sanitária em relação aos queijos inspecionados.

Tabela 3. Médias dos resultados das análises de coliformes a 45°C, microrganismos mesófilos e psicotróficos em queijos coalho e manteiga, conforme o tipo de fiscalização.

Tipos de Queijo	Microrganismos	SIF	SIE	SSI
Coalho	Coliformes a 45°C (NMP/g*)	$1,5 \times 10^2$	$3,8 \times 10^5$	6×10^5
	Mesófilos (UFC/g**)	1×10^3	$1,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$
	Psicotróficos (UFC/g**)	$1,3 \times 10^3$	1×10^4	7×10^4
Manteiga	Coliformes a 45°C (NMP/g*)	$1,5 \times 10^2$	$3,4 \times 10^5$	$6,4 \times 10^5$
	Mesófilos (UFC/g**)	$1,1 \times 10^3$	$8,7 \times 10^4$	$3,5 \times 10^5$
	Psicotróficos (UFC/g**)	$1,1 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4$	$4,1 \times 10^4$

*Número Mais Provável por grama

**Unidade Formadora de Colônia por grama

SIF = Serviço de Inspeção Federal

SIE = Serviço de Inspeção Estadual

SSI = Sem Selo de

Inspeção

No que se refere à determinação do Número Mais Provável de coliformes a 45°C em queijos coalho, observou-se uma variação entre $1,5 \times 10^2$ a valores $> 1,1 \times 10^6$ NMP/g tanto no queijo coalho como no queijo manteiga, havendo diferença apenas em suas médias que foram de $5,6 \times 10^5$ e $2,6 \times 10^5$, respectivamente.

De acordo com a legislação vigente RDC n°12 (BRASIL, 2001), que apresenta o limite de tolerância para coliformes a 45°C de $5,0 \times 10^3$ NMP/g de amostra, 83,3% (25/30) das amostras de queijo coalho e 80% (24/30) das amostras de queijo manteiga encontravam-se acima do limite.

Pinto *et al.* (2016), fizeram uma avaliação microbiológica de Queijo do Marajó tipo creme, um queijo com características semelhantes ao queijo manteiga, inclusive em sua tecnologia e não observaram contaminação por coliformes nas amostras analisadas. Os autores relacionam esse resultado ao atendimento as exigências do Programa de Qualidade e BPF.

Levando em consideração a presença ou ausência dos selos de inspeção no rótulo de ambos tipos de queijo e a exposição de venda desses produtos no momento da colheita das amostras, observou-se que os maiores valores de coliformes a 45°C e microrganismos

mesófilos foram encontrados em queijos que possivelmente não receberam qualquer tipo de fiscalização e estavam sendo comercializados em temperatura ambiente.

No tocante a contagem de microrganismos mesófilos em amostras de queijos coalho, foram observadas contagens entre 1×10^3 e $1,24 \times 10^7$ UFC/g, com média de 5×10^5 UFC/g. Evangelista-Barreto *et al.* (2016) avaliaram o queijo de coalho da cidade de Cruz das Almas-BA, e verificaram uma contagem média de mesófilos de $5,9 \times 10^8$ UFC/g, portanto mais elevada que o presente estudo. Esses autores, relacionam as altas cargas microbianas desses microrganismos no queijo de coalho, ao uso da matéria prima de origem não segura, má higienização de utensílios, elaboração sob condições insalubres, e armazenamento e comercialização em temperaturas inadequadas.

As contagens de mesófilos em amostras de queijos manteiga variaram entre 1×10^3 e 6×10^5 , com média de $7,2 \times 10^4$ no presente estudo. Esses dados divergem dos resultados de Pinto *et al.* (2016), que não observaram contaminações por microrganismos mesófilos nas amostras analisadas.

Por outro lado, corrobora com Alexandre *et al.* (2016), que avaliaram 40 amostras de queijo manteiga do comércio varejista de Maceió – AL e constataram que 82,5% (33/40) dessas amostras apresentaram contagens entre $1,03 \times 10^5$ a $>2,5 \times 10^6$ UFC/g. Contagens a partir de 10^5 UFC/g indicam processamento insatisfatório dando margens à proliferação de patógenos.

Aguilar *et al.* (2016), obtiveram contagens de mesófilos entre $1,2 \times 10^3$ a $1,1 \times 10^7$ UFC/g em queijos tipo parmesão ralados no comércio varejista em São Paulo. Esse dado converge com esta pesquisa ao considerar que essa alta carga microbiana possivelmente provém de uma contaminação do produto durante seu fracionamento. De fato, observou-se durante a colheita das amostras que alguns manipuladores não utilizavam Equipamentos de Proteção Individual (EPI), o que sugere uma contaminação cruzada em potencial.

Os valores obtidos na análise de microrganismos psicrotróficos variaram entre 1×10^3 e $3,4 \times 10^5$ e média de $9,2 \times 10^4$ em queijos coalho e entre 1×10^3 e 2×10^5 , com média de $3,2 \times 10^4$ em queijos manteiga. Verificou-se ainda, que as maiores contagens de psicrotróficos foram detectadas em amostras que no momento da colheita estavam armazenadas sob refrigeração.

Os microrganismos psicrotróficos além de possuírem a capacidade de se multiplicarem em temperatura de refrigeração são responsáveis por produzirem constantemente enzimas proteolíticas e lipolíticas que alteram a qualidade sensorial no produto mesmo após o

processamento, devido à capacidade de termorresistência destas enzimas (PERIN *et al.*, 2012). Desse modo, estes microrganismos podem reduzir o prazo de validade dos queijos.

Rodriguez-López *et al.* (2019) alertam que altas contagens de microrganismos psicrotróficos podem estar associadas com a presença de *L. monocytogenes*, reiterando a importância da análise desses microrganismos em alimentos.

Conclusões

A *L. monocytogenes* ocorre em queijos tipo coalho comercializados fatiados em estabelecimentos varejistas do município de Arapiraca – AL. Sua presença é um indicativo de condições higiênico-sanitárias inadequadas durante a produção, exposição de venda e comercialização desses queijos, especialmente se associada às altas contagens de coliformes, mesófilos e psicrotróficos, representando um risco à saúde pública.

Referências Bibliográficas

- AGUILAR, C.E.G.; JUNIOR, O. D. R.; VIDAL, A. M. C. *et al.* Microbial quality of industrial and retail market grated parmesan cheese in the State of São Paulo, Brazil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.46, n.12, p.2257-2263, dez, 2016.
- ALEXANDRE, A. P. S.; AQUINO, A. B.; LYRA, D. G.; FROEHLICH, A. Queijo manteiga - contaminação microbiológica e risco à saúde do consumidor. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 38(2):121-124, abr/jun, 2016.
- ARAÚJO, V. G. DE; ARRUDA, M. D. O.; DUARTE, F.N.D. *et al.* Predicting and Modelling the Growth of Potentially Pathogenic Bacteria in Coalho Cheese. *Journal of Food Protection*. João Pessoa, v.80, n.7, p.1172-1181, 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 146, de 07 de Março de 1996. 1996. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Diário Oficial da União, Brasília.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001a. 2001. Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União.
- CHAVADA, R.; KEIGHLEY, C.; QUADRI, S. *et al.* Uncommon manifestations of *Listeria monocytogenes* infection. *BMC Infectious Diseases*. Liverpool, Austrália. v.14, p.641, 2014.

- CHEN, J.; HEALEY S.; REGAN, P. *et al.* PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in foods and environmental sources. *Food Science and Human Wellness*. Ashland Ave, EUA. v.6. p.39-59. 2017.
- CUEVAS-GONZÁLEZ, P. F.; HEREDIA-CASTRO, P. Y.; MÉNDEZ-ROMERO, J. I. *et al.* Artisanal Sonoran cheese (Cocido cheese): an exploration of its production process, chemical composition and microbiological quality. *J Sci Food Agric*. Sonora, v.97, p.4459-4466, 2017.
- DANTAS, D. S. Qualidade microbiológica do queijo coalho comercializado no município de Patos, Estado da Paraíba. *Revista Agropecuária Científica no Semiárido*, Campina Grande, v.9, n.3, p.110-118, 2013.
- DU, X.; ZHANG, X.; WANG, X. *et al.* Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* in Chinese food obtained from the central area of China. *Food Control*, v.74, p.9-16, 2017.
- EVANGELISTA-BARRETO, N.S.; SANTOS, G.C. da F.; SOUZA, J. dos S.; *et al.* Queijos artesanais como veículo de contaminação de *Escherichia coli* e *estafilococos* coagulase positiva resistentes a antimicrobianos. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v.10, n.1, p.55-67, 2016.
- GARRIDO, A., CHAPELA, M. J., ROMAN, B. *et al.* A new multiplex real-time PCR developed method for *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* detection in food and environmental samples. *Food Control*, v.30(1), p.76-85. 2013.
- GUILLET, C.; JOIN-LAMBERT, O.; LE MONNIER, A. Human Listeriosis Caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging Infectious Diseases*, v.16(1), p.136-138, 2010.
- HEIMAN, K. E.; GARALDE, V. B.; GRONOSTAJ, M. *et al.* Multistate outbreak of listeriosis caused by imported cheese and evidence of cross-contamination of other cheeses, USA, 2012. *Epidemiology and Infection*. Cambridge, v.144, p.2698–2708, 2016.
- ISO, 1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs—horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*.—part 1: Detection method (ISO 11290-1:1996)
- ISO, 2004a. Microbiology of food and animal feeding stuffs—horizontal method for t detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*.—part 1: Detection Method,

Amendment 1:2004. Modification of the Isolation Media and Haemolysys Test (ISO 11290-1:2004).

KARLI, A.; SENSOY, G.; UNAL, N. *et al.* Ventriculoperitoneal shunt infection with *Listeria innocua*. *Pediatrics International*, v. 56, n. 4, p. 621–623, 2014.

LAHOU, E.; UYTTENDAELE, M. Growth potential of *Listeria monocytogenes* in soft, semi-soft and semihard artisanal cheeses after post-processing contamination in deli retail establishments. *Food Control*. v.76, p.13-23, 2017.

LEONG, D.; NICAOGÁIN, K.; LUQUE-SASTRE, L. *et al.* A 3-year multi-food study of the presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in 54 small food businesses in Ireland. *International Journal of Food Microbiology*, v.249, p.18-26, 2017.

MADJUNKOV, M.; CHAUDHRY, S.; ITO, S. Listeriosis during pregnancy. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. Toronto, Canadá. v.296, n.2, p.143-152, 2017

MORETRO, T.; SCHIRMER, B. C. T.; HEIR, E. *et al.* Tolerance to quaternary ammonium compound disinfectants may enhance growth of *Listeria monocytogenes* in the food industry. *International Journal of Food Microbiology*, v.241, p.15–224, 2017.

NASSAU, T. J. van; LENZ, C. A.; SCHERZINGER, A. S.; VOGEL, R. F. Combination of endolysins and high pressure to inactivate *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*. Freising, Germany, v. 68, p.81-88, 2017.

OXARAN, V.; SHI, L.; CHAUL, L. T. *et al.* *Listeria monocytogenes* incidence changes and diversity in some Brazilian dairy industries and retail products. *Food Microbiology*. São Paulo. v.68, p.16-23, 2017.

PARK, S. H.; CHANG, P. S.; RYU, S.; KANG, D. H. Development of a novel selective and differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80:1020–1025. 2014.

PERIN, L. M. *et al.* Interference of storage temperatures in the development of mesophilic, psychrotrophic, lipolytic and proteolytic microbiota of raw milk. *Semina – Ciências Agrárias*, v. 33, n. 1, p. 333-342, 2012.

PINTO, M. R. M.; M. F. TEIXEIRA; R. C. SARMENTO. *et al.* Avaliação microbiológica de Queijo do Marajó tipo creme, de leite de búfala, elaborado em queijarias da Ilha do Marajó, Pará. *Scientia Plena*, v.12, n.06, 2016. DOI: 10.14808/sci.plena.2016.069908

PRATES, D. F.; WÜRFEL, S. R.; GOLDBECK, J. C. *et al.* Microbiological quality and safety assessment in the production of moderate and high humidity cheeses. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.47:11, 2017.

ROCHA, C.E., MOL, J.P.S., GARCIA, L.N.N. *et al.* Comparative experimental infection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in bovine trophoblasts. *Plos One*. 12(5): e0176911, may, 2017.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ A. P.; BERNÁRDEZA, M.; RODRÍGUEZ-HERRERAA, J. J. *et al.* Identification and metagenetic characterisation of *Listeria monocytogenes*-harbouring communities present in food-related industrial environments. *Food Control*, v.95, p. 6-17, jan, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.07.023>. Acesso em: 05 de janeiro de 2019.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 536p, 2007.

REFERÊNCIAS

AMAJOUD, N. et al. Prevalence of *Listeria* spp. and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from food products in Tetouan, Morocco. **Food Control**, v. 84, p. 436–441, 2017.

ARAÚJO, V. G. DE. et al. Predicting and Modelling the Growth of Potentially Pathogenic Bacteria in Coalho Cheese. **Journal of Food Protection**. João Pessoa, v.80, n.7, p.1172-1181, 2017.

BARRE, L. et al. Applicability of the EN ISO 11290-1 standard method for *Listeria monocytogenes* detection in presence of new *Listeria* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 238, p. 281–287, 2016.

BORUCKI, M.K.; CALL, D.R. *Listeria monocytogenes* Serotype Identification by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p. 5537-5540, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001a. Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2001. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b. Acesso em: 01/05/2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro 2004. A Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2004. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388704/RESOLU%25C3%2587%25C3%2583O-RDC%2BN%2B216%2BDE%2B15%2BDE%2BSETEMBRO%2BDE%2B2004.pdf/237014-96-925d-4d4d-99aa-9d479b316c4b>. Acesso em: 25/04/2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Manteiga. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 jul. 2001. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/legislacao-1/instrucoes-normativas/instrucao-normativa-sda-mapa-no-30-de-13-09-2018.pdf/view>. Acesso em: 25/04/2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 22, de 24 de novembro de 2005. Regulamento Técnico para Rotulagem de Produtos de Origem Animal Embalado. **Diário Oficial da União**.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n.146, de 07 de março de 1996. Regulamento técnico geral para a fixação dos requisitos microbiológicos de queijos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1996. Disponível em: <https://ambbrasil.esteri.it/resource/2009/09/INTotale.pdf>. Acesso em: 15/04/2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. 2018. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>. Acesso em: 11 de junho de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Doenças transmitidas por alimentos: causas, sintomas, tratamento e prevenção. 2019. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos>. Acesso em: 11 de junho de 2019.

BRASILEIRO, I. S. et al. Occurrence and antimicrobial resistance patterns of *Listeria monocytogenes* isolated from vegetables. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 438-443, 2016.

CAMARGO, A. C. et al. Low Occurrence of *Listeria monocytogenes* on Bovine Hides and Carcasses in Minas Gerais State, Brazil: Molecular Characterization and Antimicrobial Resistance. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 7, p. 1148-1152, 2014.

CAMARGO, A.C.; WOODWARD, J.J.; NERO, L.A. The Continuous Challenge of Characterizing the Foodborne Pathogen *Listeria monocytogenes*. **Foodborne Pathog Dis.**, v. 13, n.8, p. 405-416, 2016.

CARTWRIGHT, E.J. et al. Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008. **Emerging and infectious Diseases**, v. 19, p. 1-9, 2013.

Centers for Disease Control and Prevention – CDC. (2013). Commercial dishwashing specification: guideline for mechanical ware washing in foodservice establishments. Atlanta: US Department of Health and Human Services. Disponível em: [http://www.bccdc.ca/NR/rdonlyres/558797A0-F492-43D7-ACE3-260D5E726380/0/GuidelinesMechanicalWarewashinginFoodServiceEstablishmentswebform atJan2013.pdf](http://www.bccdc.ca/NR/rdonlyres/558797A0-F492-43D7-ACE3-260D5E726380/0/GuidelinesMechanicalWarewashinginFoodServiceEstablishmentswebformatJan2013.pdf). Acesso em 11 de junho de 2019

CHAE, M. S.; SCHRAFT, H. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 103-111, 2000.

COLE, M.; JONES, M.; HOLYOAK, C. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 69, p. 63-72, 1990.

COSSART, P. Molecular and cellular basis of the infection by *Listeria monocytogenes*: An overview. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, p. 401-409, 2002.

COURTIEU, A. L. Latest News on listeriosis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. v. 14, p. 1-7, 1991.

CRUZ, C. D.; MARTINEZ, M. B.; DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alim. Nutr.**, v.19, n.2, p. 195- 206, 2008.

DANTAS, D. S. Qualidade microbiológica do queijo coalho comercializado no município de Patos, Estado da Paraíba. **Revista Agropecuária Científica no Semiárido**, Campina Grande, v.9, n.3, p.110-118, 2013.

DE BUYSER, M. L. et al. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and different industrialised countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n. 1-2, p. 1-17, 2001.

DHAMA, K., et al. Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, v.35(4), p.211–235, 2015.

DISSON, O.; LECUIT, M. Targeting of the central nervous system by *Listeria monocytogenes*. **Virulence**, v. 3, p. 213-221, 2012.

DOUMITH, M. et al. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 1072- 1083, 2004a.

DU, X. et al. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* in Chinese food obtained from the central area of China. **Food Control**, v.74, p.9-16, 2017.

EFSA – European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. **EFSA Journal**, v.13, p. 165, 2015.

FAI, A. E. C. et al. *Salmonella sp.* and *Listeria monocytogenes* in fully cooked ham commercialized in supermarkets of Fortaleza (CE, BRASIL): risk factor for public health. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.16, n.2, p.657-662, 2011.

FAO/WHO. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: technical report. **Microbiological risk assessment series**, n. 5. Roma: FAO/WHO, 2004.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. **Microbiological Reviews**, v. 55, p. 476-511, 1991.

FDA – Food and Drug Administration. **Listeria monocytogenes: Contains nonbinding recommendations draft - not for implementation compliance policy Guide guidance for FDA staff sec. 555.320 (2008)**. Disponível em: <https://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2017.

FEITOSA, T. et al. Pesquisa de *Salmonella sp.*, *Listeria sp.* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência de Tecnologia de Alimentos**, Campinas. 2003.

FENTAHUN, T.; FRESEBEHAT, A. Listeriosis in Small Ruminants : A Review. **Advances in Biological Research**, v.6(6), p.202–209, 2012.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FOX, P.F. et al. Fundamentals of Cheese Science: Bacteriology of Cheese Milk. Boston: **Springer**, p.105-120, 2017.

FRIEDLY, E. C.; CRANDALL, P. G.; RICKE, S.; et al. Identification of *Listeria innocua* surrogates for *Listeria monocytogenes* in hamburger patties. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 4, p. 174–178, 2008.

GELBÍCOVÁ, T.; KARPÍSKOVÁ, R. Occurrence and characteristics of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food from retail market in the Czech Republic. **Czech Journal of Food Science**, v. 27, p. S2-3eS2-7, 2009.

HAIN, T. et al. Pathogenomics of *Listeria spp.* **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, p. 541-557, 2007.

HEIMAN, K. E. et al. Multistate outbreak of listeriosis caused by imported cheese and evidence of cross-contamination of other cheeses, USA, 2012. **Epidemiology and Infection**. Cambridge, v.144, p.2698–2708, 2016.

HOF, H.; ROCOURT, J. Is any strain of *Listeria monocytogenes* detected in Food a health risk? **International Journal of Food Microbiology**, v.16, p.173-182, 1992.

IGLESIAS, M.A. et al. Occurrence and phenotypic and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in slaughterhouses in southern Brazil. **Food Res Int**. v. 100, p. 96-101, 2017.

IVANEK, R. et al. The cost and benefit of listeria monocytogenes food safety measures. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 7-8, p. 513–523, 2004.

JAY, J.M.; LOESSNER, M., GOLDEN, D.A. Modern Food Microbiology 7th Edition, Springer, New York, NY, USA, 790 p., 2005.

KONEMAN, E.W. et al. **Diagnóstico Microbiológico**, 5.ed. Rio de Janeiro : MEDSI, 2001.

KOUSTA, M. et al. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food control*, v. 21, p. 805-815, 2010.

LEONG, D. et al. A 3-year multi-food study of the presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in 54 small food businesses in Ireland. **International Journal of Food Microbiology**, v.249, p.18-26, 2017.

LIU, D. Y. et al. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, p. 133-140, 2007.

LIU, H. et al. Rapid detection and differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species in deli meats by a new multiplex PCR method. **Food Control**, v.52, p.78-84, 2015.

LOTFOLLAHI, L. et al. Prevalence, antimicrobial susceptibility and multiplex PCR-serotyping of *Listeria monocytogenes* isolated from humans, foods and livestock in Iran. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 425-429, 2017.

LUBER, P. et al. Controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Working towards global scientific consensus and harmonization - Recommendations for improved prevention and control. **Food Control**, v. 22, n. 9, p.1535–1549, 2011.

- LUCHANSKY, J. B. et al. Survey for *Listeria monocytogenes* in and on Ready-to-Eat Foods from Retail Establishments in the United States (2010 through 2013): Assessing Potential Changes of Pathogen Prevalence and Levels in a Decade. **Journal of Food Protection**, v.80, n.6, p.903–921, 2017.
- MANTILLA, S. P. S. et al. Occurrence of *Listeria* spp. in bovine ground meat samples commercialized in Niterói, RJ, Brazil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 1225-1230, 2007.
- MARTINS, E.A.; GERMANO, P.M.L. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of São Paulo, Brazil: Occurrence, quantification, and serotyping. **Food Control**, v. 22, p. 297-302, 2011.
- MCLAUHLIN, J. et al. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.92, p.15– 33, 2004.
- MEDEIROS, N. C. et al. Quality of milk used in informal artisanal production of coalho and butter cheese. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 4, p. 1955-1962. Jul./ago. 2017.
- MORETRO, T. et al. Tolerance to quaternary ammonium compound disinfectants may enhance growth of *Listeria monocytogenes* in the food industry. **International Journal of Food Microbiology**, v.241, p.15–224, 2017.
- NASSAU, T. J. van. et al. Combination of endolysins and high pressure to inactivate *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology. Freising**, Germany, v. 68, p.81-88, 2017.
- NEWELL, D. G. et al. Food-borne diseases – The challenges of 20years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. SUPPL. 1, p. S3–S15, 2010.
- ORSI R.H. & WIEDMANN M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 100(12):5273-5287, 2016.
- OXARAN, V. et al. *Listeria monocytogenes* incidence changes and diversity in some Brazilian dairy industries and retail products. **Food Microbiology**. São Paulo. v.68, p.16-23, 2017.

PAQUEREAU, B.; MACHADO, G.; CARVALHO, S. A produção do leite e do queijo se torna cultura. In: PAQUEREAU, B.; MACHADO, G.; CARVALHO, S. **O queijo de coalho em Pernambuco: histórias e memórias**. Garanhuns: E. dos Autores, 2016. p. 20-27.

PINTO, M. S. et al. Segurança alimentar do queijo minas artesanal do Serro, Minas Gerais, em função da adoção de boas práticas de fabricação. **Pesquisa Agropecuária Tropical** 2009;39(4):342-347.

PORT, G. G.; FREITAG, N. E. Identification of novel *Listeria monocytogenes* secreted virulence factors following mutational activation of the central virulence regulator, PrfA, **Infection and Immunity**, v. 75, p. 5886-5897, 2007.

QUEIROGA, R. C. R. E. et al. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. **LWT - Food Science and Technology**, Campinas, v. 50, p. 538-544, 2013.

ROCOURT, J. Risk factors for listeriosis. *Food Control*, v. 7, p. 194-203, 1996. In: ROCOURT, J.; GRIMONT, P. A. D. *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. **Int J Syst Bacteriol**, v. 33, p. 866-869, 1983.

RYSER, E.T.; MARTH, E.M. **Listeria, Listeriosis, and Food Safety**. 3rd ed. (Food Science and Technology). New York: CRC Press, 2007.

SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States—Major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 7-15, 2011.

SCHÄFER, D.F. et al. Monitoring of contamination sources of *Listeria monocytogenes* in a poultry slaughterhouse. **LWT - Food Science and Technology**, v. 86, p. 393-398, 2017.

SCHLECH III, W.F. et al. Epidemic listeriosis -- evidence for transmission by food. **New England Journal of Medicine**, v. 308, p. 203-205, 1983.

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

SILVA, D.A.L. et al. *Listeria* spp. contamination in a butcher shop environment and *Listeria monocytogenes* adhesion ability and sensitivity to foodcontact surface sanitizers. **Journal of Food Safety**, p. 1- 8, 2016.

SILVA, R. A. et al. Can artisanal “Coalho” cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? **Food Chemistry**, London, v. 35,n.3,p.1533-1538,2012.

STECKLER, A. J. et al. Genetic characterization of *Listeria monocytogenes* from ruminant listeriosis from different geographical regions in the U.S. **Veterinary Microbiology**, v.215, 93–97, 2017.

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

TAO, T. et al. Investigation on prevalence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in animal-derived foods by multiplex PCR assay targeting novel genes. **Food Control**, V.73, p.704-711, 2017.

UE – União Européia. **Regulamento no 2073/2005 da comissão de 15 de Novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios**. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20060101&from=NL>. Acesso em: 17/05/2019.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology**, v. 14, p. 584-640, 2001.

VAZQUEZ-BOLAND, J.A. et al. Preliminary evidence that different domains are involved in cytolytic activity and receptor (cholesterol) binding in listeriolysin O, the *Listeria monocytogenes* thiol-activated toxin. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 53, n. 1-2, p. 95-99, 1989.

VENTURA, R. F. Requeijões do Nordeste: tipos e fabricações. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 42, n. 254, p. 3-21, 1987.

VERA, A. et al. Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. **Revista Chilena de Infectología**, v.30, n.4, p.407-416, 2013.

WIECZOREK, K.; OSEK, J. Prevalence, genetic diversity and microbial resistance of *Listeria monocytogenes* isolate from fresh and smoked fish and Poland. **Food Microbiology**, v. 64, p. 164-171, 2017.

WIEDMANN, M. Molecular Subtyping Methods for *Listeria monocytogenes*. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 2, p.524-531, 2002.

ZAFFARI, C. B.; MELLO, J. F.; COSTA, M. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 862-867, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782007000300040>. Acesso em: 12/01/2019.

ANEXO I



Relatório de Resultados



REGISTRO: 080950526

DADOS DO CLIENTE

Cliente: 9848 - ANIMAL PAT LAB ARACAJU
 Endereço: AVENIDA DESEMBARGADOR MAYNARD-ARACAJU-SE
 CEP: 49055-210
 CGC/CPF: 15.019.301/0001-34 IE: .
 Responsável Técnico: RACHEL LIVINGSTONE CRMV: SE0723
 E-mail: animalpatlab@hotmail.com

DADOS DO TOMADOR

Tomador: 9848- R & R ANDRADE LABORATORIO DE ANALISES VETERINARIAS LTDA

DADOS DA AMOSTRA

Material: Meio de cultura TSA
 Data de coleta: NI
 Data ou nº de Produção: NI
 Natureza da Amostra: Queijo
 Quantidade: 2
 Data de recebimento: 10/04/19
 Condições de armazenamento: Resfriado

PESQUISA DE LISTERIA MONOCYTOGENES POR qPCR

CARACTERÍSTICAS PESQUISADAS

PARAMETRO	AMOSTRA	RESULTADO
Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> .	Queijo nº 10	Presente
Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> .	Queijo nº 23	Presente

Interpretação dos Resultados:

Resultados ausentes devem ser avaliados com cautela, pois há fatores que podem contribuir para a não detecção como momento contaminação, tipo de material coletado e sua preservação dentre outros.

Comentário técnico:

O método utilizado foi desenvolvido somente para detecção in vitro de *Listeria monocytogenes*.

Os iniciadores *L. monocytogenes* foram projetados para uso específico e exclusivo in vitro e não detectam outras espécies de *Listeria*. A técnica possui especificidade e sensibilidade superiores a 95% na amostra adequada.

Foram realizados os controles de qualidade e validação abaixo:

Controle positivo e controle negativo de detecção:	Válidos/Conformes
Controle interno de extração de DNA:	Válido/Conforme
Controle interno de amplificação ACTB (Beta-actina):	Válido/Conforme
Controle de verificação ambiental:	Válido/Conforme

Método: qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Qualitativo)

Legenda: NI - Não Informado

Observações: Os resultados expressos neste relatório de resultados referem-se apenas à amostra analisada, sendo a coleta de responsabilidade do cliente.

Este relatório somente poderá ser reproduzido em sua totalidade. O TECSA Laboratórios se isenta de qualquer responsabilidade pela reprodução parcial do mesmo.

Os ensaios devem ser avaliados tecnicamente pelo responsável da empresa.

Dr. Luiz Eduardo Ristow - CRMV MG 3708
Fale com o Diretor Técnico: (31)98484-3400

CONTROLE DE
QUALIDADE

Data da emissão das análises:
 Belo Horizonte, 12 de abril de 2019
 Página: 1/1