



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE *Listeria* spp. E *Listeria monocytogenes* EM EQUIPAMENTOS E UTENSÍLIOS DE
INDÚSTRIAS DE LATICÍNIOS**

Luiza Pieta

Porto Alegre

2010/2

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE *Listeria* spp. E *Listeria monocytogenes* EM EQUIPAMENTOS E UTENSÍLIOS DE
INDÚSTRIAS DE LATICÍNIOS**

Luiza Pieta

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Alimentos, para obtenção do Título de Engenheira de Alimentos.

Orientador: Eduardo Cesar Tondo

Co-orientadora: Ana Carolina Ritter

Porto Alegre

2010/2

INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE *Listeria* spp. E *Listeria monocytogenes* EM EQUIPAMENTOS E UTENSÍLIOS DE INDÚSTRIAS DE LATICÍNIOS

Luiza Pieta

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

M. Sc. Eng. de Alim. Cheila Minéia Daniel de Paula

Prof. Dr. Jeverson Frazzon

Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo (Orientador)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais, Hermes e Vera Lia, por todo amor, dedicação e orgulho, e ao meu irmão e engenheiro Enrico, pelas “aulas de reforço” de Cálculo e Física, no início da faculdade.

Ao meu namorado Rodrigo que, mesmo estando um pouco longe, acompanhou a realização deste trabalho, sempre me incentivando e acreditando na minha capacidade.

A UFRGS, minha segunda casa durante estes anos de faculdade, em especial ao ICTA e todos seus mestres, que fizeram parte desta trajetória e proporcionaram muitos momentos marcantes durante a minha graduação.

Ao meu orientador, Eduardo Cesar Tondo, pelos ensinamentos e por todo o apoio recebido durante o tempo que trabalhei como bolsista de Iniciação Científica no Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, não esquecendo das “meninas do labi” que, com certeza, tornaram os dias de trabalho muito mais divertidos e prazerosos.

A minha co-orientadora, Ana Carolina Ritter, que por sorte pude conhecer em 2007, e com a qual tive o prazer de começar a trabalhar, ainda como bolsista voluntária. Obrigada pela sincera amizade e pela nítida admiração que tens por mim, votos de um futuro brilhante é o que a tua “eterna IC” te deseja.

Ao meu futuro orientador de mestrado, Jeverson Frazzon, que despertou o meu interesse pela Microbiologia de Alimentos durante suas aulas, e com o qual espero realizar trabalhos futuros de muito sucesso.

Ao Governo Italiano e aos coordenadores do Projeto Agriquality, em especial ao Marcello Cerasola, o meu sincero “obrigada” pela experiência única vivida.

A toda equipe da RASIP Fábrica de Laticínios, principalmente a Engenheira de Alimentos Cristine Jeusti, pela ótima recepção e disponibilidade em me acompanhar durante meu período de estágio na empresa.

Por último, agradeço a todos os amigos, amigas e colegas de faculdade, que estiveram ao meu lado e sempre me ajudaram no que foi preciso.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	08
2. JUSTIFICATIVA.....	09
3. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo Geral.....	10
3.2 Objetivos Específicos.....	10
4. DESENVOLVIMENTO BIBLIOGRÁFICO	
4.1 O gênero <i>Listeria</i>.....	11
4.2 <i>Listeria monocytogenes</i>.....	12
4.3 Listeriose Alimentar.....	13
4.4 <i>L. monocytogenes</i> em leite e produtos lácteos.....	14
4.5 Contaminação por <i>L. monocytogenes</i> nas indústrias de laticínios.....	16
5. MATERIAIS E MÉTODOS	
5.1 Coleta das amostras.....	18
5.2 Análises microbiológicas para <i>Listeria</i> spp.....	22
5.3 Identificação de <i>Listeria monocytogenes</i>.....	22
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVA.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

RESUMO

Listeria monocytogenes é um patógeno alimentar psicrotrófico, com baixa dose infectante, causador de doença severa com altas taxas de mortalidade. Adicionado a isso, *Listeria* spp. podem formar biofilmes em equipamentos e utensílios industriais, o que tem tornado os membros do gênero *Listeria* alguns dos microrganismos mais importantes para as indústrias de alimentos, na atualidade. Em vista disso, o objetivo do presente trabalho foi investigar a presença de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* em equipamentos e utensílios de indústrias de laticínios. As coletas foram realizadas em um laticínio do sul da Itália e em dois laticínios do sul do Brasil, após a higienização dos equipamentos e utensílios, utilizando-se suabes estéreis. Após as coletas, as amostras foram analisadas quanto à presença de *Listeria* spp., e as colônias suspeitas foram identificadas através de métodos bioquímicos descritos na ISO 11290-2:1998, Kit API *Listeria*® (BioMérieux) e BAX System (DuPont®). Ao total, foram analisadas 106 amostras e, dentre estas, sete amostras foram positivas para *Listeria* spp. e uma amostra foi identificada como *Listeria monocytogenes*. Tais resultados propiciaram ações corretivas importantes, uma vez que foi a primeira vez que esse microrganismo foi isolado na indústria italiana.

Palavras-chave: *Listeria* spp., higienização, equipamentos e utensílios, indústrias de laticínios.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a psychrotrophic food pathogen, with low infectious dose, causing severe disease with high mortality rates. Added to this, *Listeria* spp. can form biofilms in industrial equipment and utensils, and because of that, currently, members of the genus *Listeria* have become some of the most important microorganisms for the food industry. Therefore, the objective of this study was to investigate the presence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in equipment and utensils of dairy industries. Samples were collected from a dairy plant in southern Italy and two dairies plants in southern Brazil, after equipment and utensils hygienization, using sterile swabs. After the samples collection, these were analyzed for the presence of *Listeria* spp., and suspected colonies were identified by biochemical methods described in ISO 11290-2:1998, Kit API *Listeria*® (BioMérieux) and BAX System (DuPont®). In total, 106 samples were analyzed, and among these, seven samples were positive for *Listeria* spp. and one isolate was identified as *Listeria monocytogenes*. These results supported significant corrective actions, since it was the first time that this microorganism was isolated in the Italian industry.

Key words: *Listeria* spp., hygienization, equipment and utensils, dairy industries.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Locais e número de amostras de superfície coletadas em três plantas processadoras de laticínios.....	19
Tabela 2 – Amostras coletadas em laticínios que apresentaram contaminação por <i>Listeria</i> spp.....	24

1. INTRODUÇÃO

Dentre as seis espécies do gênero *Listeria*, a única patogênica transmitida por alimentos é a *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*). Esta caracteriza-se por ser um microrganismo psicrófilo, amplamente distribuído no ambiente, com baixa dose infectante e causador de doença severa com altas taxas de mortalidade, o qual emergiu nos últimos anos como um importante agente de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) (HOFER, DOS REIS & HOFER, 2006).

Apesar de muitos alimentos poderem veicular *L. monocytogenes*, a listeriose está principalmente associada a alimentos como os frutos do mar, produtos lácteos (com destaque para o leite cru), queijos e produtos a base de carne vermelha e aves, estando a listeriose normalmente associada a grupos de risco bem definidos, compostos por idosos, crianças, recém-nascidos, gestantes e pessoas imunodeprimidas (MONTVILLE & MATTHEWS, 2008).

Adicionado a isso, *L. monocytogenes* pode formar biofilmes sobre e dentro de equipamentos, o que a tem tornado um dos patógenos alimentares mais importantes em nível mundial, na atualidade. Mesmo assim, de acordo com a RDC nº 12 de 2 de Janeiro de 2001, que estabelece os Padrões Microbiológicos para Alimentos em grande parte dos alimentos brasileiros, a pesquisa de *L. monocytogenes* só é exigida em queijos de alta e média umidade, uma vez que tem sido freqüentemente isolada de produtos lácteos. Destacando a importância desse microrganismo, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou, em 8 de Abril de 2009, a Instrução Normativa nº 9, que instituiu os procedimentos de controle da *L. monocytogenes* em produtos de origem animal, prontos para consumo.

Em nível mundial, as indústrias de alimentos, principalmente as de carne e leite, têm dado muita importância ao controle da *L. monocytogenes*, sendo que, para isso, microrganismos do gênero *Listeria* (*Listeria* spp.) têm sido investigados, além da *L. monocytogenes*. A nova tendência é “investigar a presença de *Listeria* spp. nas indústrias de alimentos e tratá-las como se fossem *L. monocytogenes*”.

2. JUSTIFICATIVA

Uma das formas mais eficazes de prevenir a presença de *Listeria* spp. em indústrias de leite é a adequada higienização do ambiente, equipamentos e utensílios. A higienização faz parte da rotina de uma indústria de leite e a utilização de saneantes adequados, dentro de um rígido programa de higiene operacional, é muito importante. Contudo, nem todas as superfícies recebem uma higienização adequada e consistente, capaz de remover ou inativar microrganismos patogênicos. Locais pouco acessíveis aos procedimentos de higienização, como cantos e ângulos agudos (TIDE *et al.*, 1999) e no interior de equipamentos (AARNISALO *et al.*, 2003), podem não ser facilmente higienizados, tornando-se áreas de risco para a contaminação dos alimentos.

A formação de biofilmes, os quais são comunidades de bactérias associadas sobre uma superfície (CHAVANT *et al.*, 2002), pode reduzir a eficiência ou até mesmo inutilizar um equipamento, uma vez que sua remoção a partir de certa concentração de células fica difícil de ser realizada. Se os biofilmes forem formados por bactérias patogênicas, como a *Listeria monocytogenes*, isso pode colocar em risco a saúde dos consumidores, sendo esta situação particularmente preocupante naquelas indústrias que processam grandes quantidades de matéria-prima freqüentemente contaminada por esses microrganismos, como é o caso do leite.

Bactérias do gênero *Listeria* têm sido isoladas de diversos produtos lácteos (FOX *et al.*, 2009) e, mais que isso, podem contaminar superfícies de equipamentos e utensílios (CHAMBEL *et al.*, 2007), se multiplicar em óleos lubrificantes de grau alimentício (AARNISALO, RAASKA & WIRTANEN, 2007) e colonizar as partes internas de equipamentos (TOMPKIN, 2002), podendo se tornar persistentes no ambiente industrial. Desse modo, a investigação de *Listeria* spp., e principalmente da *L. monocytogenes*, dentro de indústrias de laticínios, assume grande importância.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho objetivou investigar a presença de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* em equipamentos e utensílios de indústrias de laticínios.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar a presença de *Listeria* spp. em um laticínio italiano;
- Investigar a presença de *Listeria* spp. em dois laticínios brasileiros;
- Investigar a proporção de *L. monocytogenes* em relação às *Listeria* spp., nos laticínios investigados.

4. DESENVOLVIMENTO BIBLIOGRÁFICO

4.1 O gênero *Listeria*

Bactérias do gênero *Listeria* são bastonetes Gram-positivos, anaeróbios facultativos, não-formadores de endósporos, móveis por flagelos, que crescem em temperaturas de 0 a 42^o C, podendo ainda se multiplicar lentamente em temperaturas de refrigeração (FORSYTHE, 2010). Alguns autores discutem sua motilidade em função da temperatura, e afirmam que existem casos em que ela pode não ser móvel em torno de 37^o C, em função da não-expressão do flagelo nessa temperatura (WAY *et al.*, 2004). O gênero *Listeria* compreende seis diferentes espécies, sendo somente duas destas consideradas patogênicas: *L. monocytogenes*, patogêna aos seres humanos; e *L. ivanovii*, patogêna principalmente a animais, como ovinos e bovinos (MONTVILLE & MATTHEWS, 2008).

Listeria spp. estão amplamente distribuídas no ambiente, sendo encontradas em uma vasta variedade de reservatórios, tais como solos, plantas em decomposição, água, bovinos, leite e diversos alimentos processados (KHELEF *et al.*, 2006). Além disso, existem diversas formas de se contaminar com tais bactérias: através de animais, da poeira, do ar, de insetos, das fezes (cerca de 1 a 9% da população humana tem *L. monocytogenes* nas fezes), da ingestão de alimentos ou através do contato com outras pessoas (JAY, 2005).

Em relação às características bioquímicas, de acordo com a Norma ISO 11290-2:1998, a confirmação do gênero *Listeria* inicia com a inoculação das colônias suspeitas em placas de TSYEA (*Tryptone Soya Yeast Extract Agar* = Ágar Triptona de Soja com Extrato de Levedura), as quais devem ser incubadas a 37^o C, por 18 a 24 horas. Posteriormente, com as colônias típicas, são realizados o Teste da Catalase, a Coloração de Gram e, por último, o teste de Motilidade. Além destes, outros testes importantes para a identificação do gênero *Listeria* são o Teste da Hemólise, os testes de utilização de Carboidratos (tais como xilose, ramnose e manitol) e o Teste de CAMP, considerado por muitos como o teste definitivo para a identificação de *L. monocytogenes* (JAY, 2005).

Listeria spp. são produtoras de catalase e, em placas de TSYEA, suas colônias são opacas e incolores, com bordas definidas. Logo, se as características morfológicas, fisiológicas e o Teste da Catalase confirmarem o gênero *Listeria*, deve-se seguir com as provas seguintes para a confirmação de *L. monocytogenes*, que é produtora de β -hemolisina, utiliza ramnose como fonte de carboidrato e, no Teste de CAMP, apresenta resultado positivo com *Staphylococcus aureus* ou *Rhodococcus equi* (JAY, 2005). Outro importante método utilizado para a identificação das espécies de *Listeria*, bastante prático e que fornece resultados de maneira rápida e eficaz, é o Kit API-*Listeria*® (BioMérieux), composto por dez testes bioquímicos, capaz de discriminar *L. monocytogenes* de *L. innocua* (SWAMINATHAN, ROCOURT & BILLE, 1995).

Como um importante aspecto para a indústria de alimentos, cabe ressaltar que *Listeria* spp. podem colonizar várias superfícies inertes, sendo capazes de formar biofilmes em áreas de processamento de alimentos (ROBERTS & WIEDMANN, 2003). Uma maior preocupação quanto à higienização existe ainda nas indústrias de produtos lácteos, já que a ação bactericida de desinfetantes é reduzida pelo leite e seu soro (BEST, KENNEDY & COATES, 1990).

4.2 *Listeria monocytogenes*

Dentre as espécies de *Listeria*, *L. monocytogenes* é a única patogênica transmitida por alimentos, o que a torna um microrganismo importante tratando-se das enfermidades causadas pela ingestão de produtos alimentícios contaminados (FORSYTHE, 2010). Além disso, do ponto de vista econômico, a contaminação dos alimentos por *L. monocytogenes* é uma grande preocupação para as indústrias desta área (ALESSANDRIA *et al.*, 2010).

Quanto a sua fisiologia, *L. monocytogenes* cresce em valores de pH baixos, em torno de 4,4, podendo ser inibida por ácidos orgânicos, como ácido acético, cítrico e láctico, na concentração de 0,1%. Seu crescimento é acentuado em valores de atividade de água (a_w) maiores ou iguais a 0,97, podendo sobreviver em valores bem mais baixos, em torno de 0,83. Determinadas concentrações de sal, em torno de 6,5%, também permitem seu crescimento (MONTVILLE & MATTHEWS, 2008).

Diversos alimentos podem estar contaminados com *L. monocytogenes*, mas ela tem sido freqüentemente encontrada em leite cru, queijos (principalmente os de pasta mole), carnes frescas ou congeladas, frango, frutos do mar, frutas e produtos vegetais, tendo prevalência em leite e produtos lácteos, devido aos primeiros surtos notificados da doença (JAY, 2005). Mesmo sendo destruída durante a pasteurização e o cozimento dos produtos, *L. monocytogenes* pode contaminar alimentos prontos para o consumo, por exemplo, antes da sua embalagem (KHELEF *et al.*, 2006).

Existem treze sorotipos diferentes de *L. monocytogenes*, sendo que em torno de 95% dos organismos isolados de vítimas de listeriose pertencem aos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b. O sorotipo 4b é o mais relacionado aos surtos da doença (37 a 64% dos casos), estando intimamente relacionado aos casos de gravidez (FORSYTHE, 2010). *L. monocytogenes* possui uma dose infectante baixa, já que acredita-se que aproximadamente 100 células da bactéria por grama de alimento já são capazes de causar o surto, contaminando principalmente indivíduos imunodeprimidos e podendo ser letal em até 30% dos casos (DOUMITH *et al.*, 2004; VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001).

A fim de evitar a presença e multiplicação deste patógeno alimentar, são necessárias algumas medidas de controle, tais como: pasteurização e esterilização do leite; prevenção da contaminação cruzada; refrigeração por um período limitado, seguida de reaquecimento; e recomendação para que não sejam consumidos produtos de alto risco de contaminação (por exemplo, leite cru) por populações susceptíveis à bactéria, como as mulheres grávidas (FORSYTHE, 2010).

4.3 Listeriose Alimentar

A listeriose é uma doença grave e um sério problema de saúde pública, que apresenta altas taxas de mortalidade (SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007) e acomete principalmente idosos, recém-nascidos, gestantes e pessoas imunodeprimidas (FRECE *et al.*, 2010 *apud* LIU, 2006; VANEGAS *et al.*, 2009). Os principais sintomas da listeriose são meningite, encefalite, septicemia (*Listeria* na sua forma invasiva, capaz de atravessar a barreira intestinal, podendo alcançar diversos órgãos), gastroenterite e, em mulheres grávidas infectadas no segundo ou

terceiro mês de gestação, pode causar aborto, nascimento prematuro ou nascimento do bebê já morto (FORSYTHE, 2010). Diversas condições podem predispor a listeriose em pessoas adultas, e dentre elas pode-se citar os neoplasmas, a AIDS, o alcoolismo, a diabetes (tipo 1, em particular), as doenças cardiovasculares, os transplantes renais e as terapias com corticóides (JAY, 2005; MONTVILLE & MATTHEWS, 2008).

O consumo de produtos alimentícios contaminados é responsável por 99% dos casos de listeriose em humanos (MEAD *et al.*, 1999), sendo a dose infectante influenciada tanto pela susceptibilidade do hospedeiro quanto pela linhagem envolvida (MCLAUHLIN *et al.*, 2004). A respeito da quantidade de microrganismos ingeridos necessários para o surgimento da doença, esta pode variar de 10^2 a 10^9 UFC (Unidades Formadoras de Colônias), dependendo do estado imunológico do indivíduo (JEMMI & STEPHAN, 2006).

Importante ressaltar ainda a diferença entre os surtos de gastroenterite e os surtos por *Listeria* na sua forma invasiva. Os primeiros afetam pessoas sem fatores de risco predisponentes, sendo necessária uma dose infectante maior para causar a doença. Os sintomas aparecem em algumas horas após a exposição ao microrganismo, em contraste à listeriose invasiva, na qual os sintomas aparecem depois de algumas semanas do contato com a bactéria (MONTVILLE & MATTHEWS, 2008). Devido à possibilidade dos humanos serem portadores assintomáticos de *Listeria*, se torna muito difícil definir a frequência com que ocorrem casos de listeriose gastrointestinal não-invasiva (SLUTSKER & SCHUCHAT, 1999).

4.4 *L. monocytogenes* em leite e produtos lácteos

O leite cru é uma importante fonte de contaminação por *L. monocytogenes* (MONTVILLE & MATTHEWS, 2008), pois o seu consumo está intimamente relacionado com diversos surtos registrados de listeriose (JAY, 2005). Além disso, produtos lácteos em geral têm sido identificados como fonte de surtos alimentares (LATORRE *et al.*, 2009).

De acordo com a OMS, Organização Mundial da Saúde, “a pasteurização é um processo seguro que reduz o número de células de *L. monocytogenes* no leite

cru até níveis que não representem risco significativo para a saúde humana”; entretanto, *L. monocytogenes* consegue crescer de forma satisfatória no leite pasteurizado, caso ocorra contaminação pós-processo (ORAVCOVÁ *et al.*, 2008). A listeriose vem despertando atenção especial das autoridades governamentais e da comunidade científica da área de alimentos, devido a sua alta taxa de mortalidade (KABUKI, 2004), baixa dose infectante, distribuição ambiental e capacidade de multiplicação em produtos lácteos sob refrigeração. Em função disso, o consumo de leite cru e dos produtos feitos a partir dele é de grande preocupação quando se trata de segurança dos alimentos.

Diversas culturas estabelecem o uso do leite cru no preparo de produtos alimentícios, inclusive de queijos certificados, os quais são elaborados a partir de processos artesanais, que se mantiveram ao longo do tempo e que têm um valor histórico importante. Na região da Sicília, sul da Itália, têm-se muito clara esta idéia, pois a produção de queijos históricos é ainda cultivada, principalmente através da produção do Ragusano D.O.P (*Denominazione di Origine Protetta* = Denominação de Origem Protegida), queijo de massa filada pertencente a família dos queijos *Caciocavallo*.

Devido à dificuldade de impedir tais barreiras sócio-culturais, alguns países (como Brasil, França e Itália) já estabeleceram legislações que permitem a produção de queijos utilizando o leite cru, sem nenhum tratamento térmico. No Brasil, o MAPA publicou, em 7 de Março de 1996, a Portaria nº 146, que permite a fabricação de queijo a partir do leite cru, desde que o produto final seja maturado. A respeito da produção do Queijo Minas Artesanal, a Lei Estadual nº 14.185 de 31 de Janeiro de 2002 permite a fabricação deste queijo com leite cru, no Estado de Minas Gerais. Esta lei foi regulamentada pela aprovação do Decreto nº 42.645 de 5 de Junho de 2002, que dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal. Existem ainda duas portarias que estabelecem algumas normas referentes à produção destes queijos mineiros: a Portaria nº 517, que estabelece as normas de defesa sanitária para os rebanhos que fornecem leite para elaboração do Queijo Minas; e a Portaria nº 518, que dispõe sobre requisitos básicos de instalações, materiais e equipamentos para fabricação dos queijos artesanais de Minas Gerais. Apesar da existência dessas legislações, sabe-se que não existe um controle totalmente eficaz quanto ao cumprimento das normas estabelecidas, em todos os locais produtores de queijos de leite cru no país. Em muitos casos, a produção é realizada por pequenos

agricultores em suas próprias fazendas, tornando preocupante o consumo destes queijos, devido às diversas fontes de contaminação por *Listeria* spp. que podem estar na área de produção, dentre as quais pode-se citar o gado leiteiro, o leite cru e a silagem (D'AMICO & DONNELLY, 2009).

Ainda a respeito de *L. monocytogenes* e sua relação com queijos, esse microrganismo pode sobreviver ao processo de fabricação e maturação de tais produtos, devido a sua capacidade de sobrevivência em ampla faixa de temperatura, tolerância a determinadas concentrações de sal e habilidade de se multiplicar no frio (MONTVILLE & MATTHEWS, 2008), sendo esta última característica, provavelmente, a mais preocupante para a indústria de laticínios (VANEGAS *et al.*, 2009). De acordo com o FDA, Food and Drug Administration, casos de listeriose relacionados a leite cru e queijos são datados desde 1980, nos Estados Unidos (FDA, 2003). Já na Europa, segundo dados do EFSA, European Food Safety Authority, o consumo de queijos contaminados foi responsável por 0,4% do total de surtos alimentares ocorridos em 2006 (KOUSTA *et al.*, 2010).

Queijos com altos teores de umidade (Ricota e Queijo Minas Frescal, por exemplo) não são recomendados para pessoas pertencentes aos grupos de risco da listeriose, principalmente as mulheres grávidas, devido à grande possibilidade de contaminação a partir do seu consumo. Agências regulatórias dos EUA consideraram os queijos frescos latinos, como o Queijo Minas Frescal, alimentos de grande preocupação à saúde pública, em função da sua relação com a ocorrência de surtos de listeriose. Além disso, *L. monocytogenes* foi isolada de amostras de Queijo Minas Frescal no Brasil, elaborados com leite cru e leite pasteurizado (BRITO *et al.*, 2008).

4.5 Contaminação por *L. monocytogenes* nas indústrias de laticínios

L. monocytogenes “invade” as indústrias processadoras de alimentos de diversas maneiras, e tais ambientes, bastante úmidos e ricos em nutrientes, colaboram e propiciam o seu desenvolvimento (MONTVILLE & MATTHEWS, 2008). Esta bactéria pode ser encontrada em diversas áreas de uma planta de

processamento, como pisos, ralos e equipamentos, e tem a habilidade de colonizar e se multiplicar em várias superfícies, incluindo aço inoxidável, borracha, vidro e polipropileno (VAID, LINTON & MORGAN, 2010), podendo se manter nestes locais por meses ou até anos (ZHAO, DOYLE & ZHAO, 2004).

Dentro de uma indústria de queijos, por exemplo, *L. monocytogenes* é capaz de colonizar diversas áreas do ambiente de processamento, além dos equipamentos, utensílios, e até mesmo a salmoura, contaminando assim o produto final (JOHANSSON *et al.*, 1999; CAGRI-MEHMETOGLU *et al.*, 2010). Devido a sua capacidade de contaminar queijos durante as etapas do processo, não causa estranheza o fato de diversos surtos de listeriose estarem relacionados ao consumo deste produto alimentício. Dessa forma, o monitoramento de tal bactéria em laticínios é de extrema importância, desde que diversos surtos têm sido relacionados a produtos lácteos (CHAMBEL *et al.*, 2007).

Muitas bactérias são capazes de colonizar superfícies e formar biofilmes, os quais permitem ao microrganismo persistir a condições adversas, tais como a dessecação, a exposição à luz ultravioleta, o tratamento com antimicrobianos e agentes sanitizantes (BORUCKI *et al.*, 2003), representando assim uma importante fonte de contaminação aos produtos alimentícios que entram em contato com os mesmos (AMALARADJOU, NORRIS & VENKITANARAYANAN, 2009). Sua persistência pode ser influenciada por diversos fatores, e a formação deste por *L. monocytogenes* já foi estudada anteriormente por outros pesquisadores em relação a diferentes parâmetros, como superfície de contato, meio e temperatura (DI BONAVENTURA *et al.*, 2008); variações entre as cepas (BORUCKI *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2009); e morfologia (HEFFORD *et al.*, 2005; KALMOKOFF *et al.*, 2001).

L. monocytogenes consegue aderir a superfícies onde há resíduos de alimentos acumulados (GANDHI & CHIKINDAS, 2007; POIMENIDOU *et al.*, 2009) formando biofilmes, que apresentam determinada resistência frente ao calor e a agentes antimicrobianos e biocidas (CLOETE, 2003). A resistência a tais biocidas pode ser explicada pela proteção mecânica devido à síntese de exopolissacarídeos (EPS = *Extracellular Polymeric Substances* = substâncias poliméricas extracelulares), além da adaptação do biofilme a situações de estresse bacteriano (CHAITIEMWONG, HAZELEGER & BEUMER, 2010).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Coleta das amostras

De Junho a Outubro de 2010, foram realizadas coletas em três plantas industriais de laticínios, sendo duas situadas no Brasil, no Estado do Rio Grande do Sul, e uma situada no sul da Itália, na cidade de Ragusa, pertencente à região da Sicília. Das três indústrias coletadas, duas processam o leite cru para a produção de queijos, enquanto que uma, situada no Brasil, utiliza o leite pasteurizado para a produção de produtos lácteos (incluindo queijos). Dentre as indústrias processadoras do leite cru, uma é italiana e produtora de queijos certificados da região siciliana, enquanto que a outra é brasileira e uma das únicas produtoras de Queijo Tipo Grana no Brasil.

Ao todo, foram coletadas 106 amostras de superfície de equipamentos e utensílios higienizados, em áreas de difícil limpeza e desinfecção, nas três indústrias. Do total, 76 amostras foram coletadas nos laticínios gaúchos, e as demais 30 amostras foram coletadas na planta industrial italiana. O procedimento de coleta foi baseado na Técnica do Esfregaço de Superfície em 100cm², em três direções diferentes, através da utilização do 3MTM *Swab Sampler*, umidificado com 1mL de caldo Lethen (3M do Brasil.) As amostras coletadas foram transportadas, sob refrigeração, até os laboratórios de análise. Aquelas provindas das indústrias brasileiras foram analisadas no Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos do ICTA/UFRGS, enquanto que aquelas coletadas na indústria italiana foram analisadas no Laboratório de Microbiologia de um Centro de Pesquisa especializado em queijos históricos sicilianos, em Ragusa.

A descrição dos pontos de coleta das amostras se encontra na Tabela 1.

Tabela 1 – Locais e número de amostras de superfície coletadas em três plantas processadoras de laticínios.

Locais de coleta	Laticínio	Número de amostras coletadas
Esteira para transporte do produto pronto	A	5
Tanque para salga dos queijos	A	3
	B	2
Equipamento para filagem da massa de queijo	A	10
Tanques para coagulação do leite	A	8
	B	10
Caixa plástica para transporte de produto pronto e embalado	A	1
Forma para moldagem dos queijos (maior)	A	1
Forma para moldagem dos queijos (menor)	A	1
Embaladora	A	1
Equipamento para fabricação de Ricota	B	2
Coador de leite	B	1
Espátula plástica	B	1
Forma de queijo retirada de tanque com solução clorada a 120ppm	B	1
Forma de Ricota retirada de tanque com solução clorada a 120ppm	B	1

Locais de coleta	Laticínio	Número de amostras coletadas
Bandeja metálica perfurada	B	3
Utensílio para mistura e resfriamento do leite	B	1
Lira para ruptura da coalhada (maior)	B	1
Lira para ruptura da coalhada (menor)	B	1
logurteira	B	1
Mesa inclinada para escorrimento do soro dos queijos	B	2
Ralador para produção do Queijo Tipo Grana ralado "pó"	C	7
Ralador para produção do Queijo Tipo Grana ralado "fiapo"	C	5
Coletora de queijo ralado nº 1	C	4
Coletora de queijo ralado nº 2 (produto pronto para ser embalado)	C	2
Secador de queijo ralado	C	7
Porcionadora e embaladora de queijo ralado	C	6
Bandeja plástica	C	1
Caixa plástica coletora de queijo ralado	C	1

Locais de coleta	Laticínio	Número de amostras coletadas
Ordenhadeira mecânica - teto <i>antes</i> de ter sido usado	C	1
Ordenhadeira mecânica - teto <i>depois</i> de ter sido usado	C	1
Rampa para recebimento de peça inteira de Queijo Tipo Grana	C	1
Fracionadora de queijos automática	C	1
Fracionadora de queijos não-automática	C	2
Vazadora de queijos manual	C	2
Vazadora de queijos automática	C	1
Serra	C	3
Mesa de uso geral	C	1
“Guilhotina” (equipamento composto de lâmina, para corte dos queijos)	C	2
Faca	C	1
	TOTAL	106 amostras coletadas

Laticínio A: indústria italiana processadora de leite cru

Laticínio B: indústria brasileira processadora de leite pasteurizado

Laticínio C: indústria brasileira processadora de leite cru

5.2 Análises microbiológicas para *Listeria* spp.

Em um primeiro momento, após a coleta com suabes, foram adicionados 2mL de Água Peptonada Tamponada 1% aos tubos contendo os *swab* e 1mL de caldo Letheen, com posterior incubação dos mesmos a 25° C durante 1 hora a 1 hora e 30 minutos, a fim de recuperar as células bacterianas estressadas. Em um segundo momento, os 3mL contidos nos tubos foram vertidos em Placas 3M™ Petrifilm™ para Monitoramento de *Listeria* Ambiental, e estas foram incubadas a 35°C (+-1°C), por 28 a 30 horas, com posterior contagem do número de colônias típicas de *Listeria* spp..

5.3 Identificação de *Listeria monocytogenes*

No Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisa italiano, as células bacterianas foram primeiramente enriquecidas através da inoculação em *Complete Selective Enrichment Broth* suplementado (OXOID), com posterior incubação a 30°C, por 22 a 24 horas. No dia seguinte, uma alçada do caldo foi transferida para placas de *Chromogenic Listeria Agar* (ISO) suplementado (OXOID), que foram incubadas a 37° C, por 24 a 48 horas, e as colônias típicas de *L. monocytogenes* foram submetidas ao Teste da Catalase e à Coloração de Gram. Na próxima etapa, para a confirmação da espécie investigada, foram utilizados dois métodos diferentes: um através do protocolo do BAX-System (DuPont®) para *L. monocytogenes*, e outro a partir da utilização do Kit API *Listeria*® (BioMérieux).

O BAX-System (DuPont®) consiste em um método rápido para a detecção de patógenos e outros organismos em alimentos ou amostras ambientais, o qual se baseia em reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction* = Reação em Cadeia da Polimerase), em tempo real. Já o Kit API *Listeria*® (BioMérieux) é definido como um sistema padronizado para a identificação das *Listeria*, que comporta dez microtubos contendo substratos desidratados, que permitem a realização de testes bioquímicos.

No Brasil, no Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos do ICTA/UFRGS, o procedimento realizado para a identificação de *Listeria monocytogenes* seguiu as recomendações da Norma ISO 11290-2:1998. De forma

geral, as colônias típicas de *Listeria* spp., detectadas nas Placas 3M™ Petrifilm™ para Monitoramento de *Listeria* Ambiental, foram semeadas em placas de TSYEA, com posterior incubação a 37° C, por 18 a 24 horas. Após a comprovação do isolamento e da pureza de cada colônia, as mesmas foram submetidas ao Teste de CAMP, Teste da Hemólise, teste de Motilidade e, por último, aos testes de utilização de Carboidratos, tais como manitol, xilose e ramnose.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 106 amostras coletadas, sete foram positivas para *Listeria* spp., e dentre essas, uma foi identificada como *L. monocytogenes*, proveniente da indústria italiana. É relevante ressaltar que, através deste experimento conseguiu-se isolar, pela primeira vez, *L. monocytogenes* nesta indústria da região siciliana. Este resultado gerou grande preocupação por parte da gerência do laticínio e, como medida para verificar a presença de patógenos nos equipamentos e utensílios da área de produção, surgiu a idéia de serem realizadas, periodicamente, coletas nos principais focos de contaminação, com posterior análise em laboratórios especializados.

Do total de amostras positivas para *Listeria* spp., cinco foram coletadas na planta industrial italiana processadora de leite cru, enquanto que as outras duas amostras foram coletadas no laticínio brasileiro que fabrica produtos lácteos a partir de leite pasteurizado. A indústria brasileira fabricante do Queijo Tipo Grana não apresentou contaminação suspeita de *Listeria* spp.

A descrição das amostras coletadas que apresentaram resultado positivo quanto à presença de *Listeria* spp se encontra na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2 – Amostras coletadas em laticínios que apresentaram contaminação por *Listeria* spp.

Amostra contaminada	Local da coleta
Lateral do tanque de coagulação do leite	Indústria italiana
Cantos do tanque de coagulação do leite	Indústria italiana
Fundo do tanque de coagulação do leite	Indústria italiana
Rosca do tubo para saída do soro do tanque de coagulação do leite	Indústria italiana
Caixa plástica para transporte de produto pronto e embalado	Indústria italiana
Forma de queijo retirada de tanque com solução clorada a 120ppm	Indústria brasileira
logurteira	Indústria brasileira

Das cinco amostras positivas para *Listeria* spp. encontradas na planta industrial italiana, quatro delas (80%), incluindo a amostra identificada como *L. monocytogenes*, foram coletadas do mesmo tanque, responsável pela coagulação do leite e posterior formação da coalhada, para a produção de queijos. Esses resultados demonstram que provavelmente este equipamento não foi higienizado corretamente após a sua utilização. A amostra confirmada como *L. monocytogenes* foi coletada da rosca do tubo para saída do soro de leite deste tanque, sendo um ponto que requer atenção e cuidados, uma vez que pode ser negligenciado durante os procedimentos de higienização. Pontos de difícil limpeza e desinfecção podem ser importantes fontes de contaminação dos alimentos por patógenos, como a *Listeria*, já que diversos microrganismos são encontrados com maior frequência em áreas úmidas e difíceis de serem higienizadas, principalmente quando estas contêm partículas de alimentos (KESKINEN, TODD & RYSER, 2008).

A respeito das duas amostras coletadas na indústria brasileira, ambas foram identificadas como *Listeria innocua*. De acordo com Kells e Gilmour (2004), *L. innocua* é usada como um indicador para *L. monocytogenes* e, portanto, a presença deste microrganismo é importante, devendo ser monitorada; enquanto que Klausner e Donnelly (1991) afirmam que a presença de qualquer *Listeria* spp. em produtos alimentícios é de grande importância, demonstrando que há muito tempo os membros do gênero *Listeria* vêm preocupando as indústrias processadoras de alimentos, quanto à segurança de seus produtos. Esta indústria, como já foi ressaltado anteriormente, só processa produtos lácteos a partir do leite pasteurizado, o que pode significar uma proteção a mais, mesmo que diversos autores (SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007; BRITO *et al.*, 2008; LATORRE *et al.*, 2009) já tenham relatado a ocorrência de surtos de listeriose a partir do consumo de tais produtos. Falhas durante a pasteurização e contaminação pós-processo são os principais causadores de contaminação de produtos lácteos feitos a partir do leite pasteurizado. Como importante ferramenta para garantir a segurança destes produtos podemos citar, por exemplo, o controle de temperatura durante o seu transporte e armazenamento (CAVA *et al.*, 2007).

Apesar do número de amostras coletadas em utensílios ter sido relativamente pequeno (16 amostras), elas corresponderam a aproximadamente 30% do total de amostras contaminadas por *Listeria* spp. Uma provável explicação para a contaminação das caixas plásticas por *Listeria* spp. poderia ser que elas são

utilizadas para o transporte de produto pronto e embalado dentro e fora dos laticínios, mudando constantemente de um ambiente para o outro. Muitas vezes, apesar de não recomendado pelas Boas Práticas de Fabricação (BPF), as caixas plásticas são colocadas diretamente em contato com o chão, sendo posteriormente encaixadas umas dentro das outras, sem higienização adequada. Além disso, elas podem conter resíduos de alimento, devido ao rompimento de embalagens de produto, o que foi constatado no momento da coleta neste utensílio. Sendo a *Listeria* uma bactéria disseminada no ambiente (CAGRI-MEHMETOGLU *et al.*, 2010), o controle de sua presença no ambiente industrial nem sempre é uma tarefa fácil de ser realizada, podendo propiciar contaminação cruzada nos alimentos prontos.

Além da caixa plástica, foi detectada *Listeria* spp. em uma forma de queijo retirada de um tanque contendo solução clorada a 120ppm, para higienização das formas. Normalmente, os estabelecimentos processadores de alimentos utilizam solução com 100 a 200ppm de cloro livre, sendo recomendado manter os utensílios imersos durante cerca de 15 minutos. Logo, a baixa concentração da solução clorada, o pouco tempo de exposição a tal saneante, ou até mesmo a presença de matéria orgânica, devido à limpeza insuficiente dos utensílios (já que a matéria orgânica pode inativar o efeito bactericida do cloro), podem ser alguns dos responsáveis pela contaminação da forma de queijo por *Listeria* spp. Geralmente, as formas de queijo são imersas em solução desinfetante e, muitas vezes, o fundo da forma acaba não entrando em contato com a mesma, devido à presença de bolhas. Além disso, as formas podem não ficar totalmente submersas nesta solução, prejudicando a sua ação. Estas são duas prováveis explicações, a fim de elucidar a origem da contaminação desta forma, pois a coleta foi realizada no fundo da mesma.

Fazendo um comparativo da contaminação no laticínio italiano e nos laticínios gaúchos, a realidade italiana parece estar menos adequada que a brasileira, pois 16,67% das amostras italianas foram positivas quanto a presença de *Listeria* spp., enquanto que somente 2,63% das amostras brasileiras apresentaram contaminação por esta bactéria. Além disso, a única amostra identificada como *L. monocytogenes* foi isolada da planta industrial italiana.

Durante as coletas pôde-se observar as diferenças nos hábitos de higiene e aplicação das BPF entre as indústrias. Na indústria italiana, foram observadas diversas falhas quanto à implementação das BPF, dentre as quais podemos citar: o uso de bonés em vez de toucas descartáveis pelos funcionários, que são todos do

sexo masculino; a permissão de conversa entre os trabalhadores sobre o produto exposto; a falta de cuidados ao permitir o acesso de visitantes à fábrica, que não usam avental ou qualquer outro tipo de roupa protetora, e podem acessar todas as áreas de produção, tocando as superfícies de equipamentos e utensílios, sem qualquer exigência de higienização das mãos; dentre outros problemas encontrados. Sem o cumprimento das BPF não há como assegurar a qualidade e a segurança do produto final, prejudicando, desta forma, tanto a empresa quanto o consumidor.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVA

Com base na realização das análises, concluiu-se que *Listeria* spp. pode estar presente em equipamentos e utensílios de indústrias de produtos lácteos, tanto no Brasil como na Itália. Além disso, foi detectada a presença de *L. monocytogenes* em um ponto de difícil higienização da indústria italiana, demonstrando a necessidade de melhorias nos procedimentos de higienização de equipamentos.

Como perspectiva, objetiva-se investigar a capacidade de formação de biofilmes em aço inoxidável AISI 316 e polietileno das cepas de *Listeria* spp. isoladas neste trabalho. Para isso, corpos de prova serão construídos e submetidos à formação de biofilmes com diferentes concentrações de células das *Listeria* spp. isoladas dos equipamentos e utensílios. Por fim, os biofilmes serão tratados com diferentes concentrações de desinfetantes, a fim de propor as melhores estratégias para sua remoção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARNISALO, K. et al. Typing of *Listeria monocytogenes* Isolates Originating from the Food Processing Industry with Automated Ribotyping and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 2, p. 249-255, fevereiro 2003.

AARNISALO, K.; RAASKA, L.; WIRTANEN, G. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* in lubricants used in the food industry. **Food Control**, Guildford, v.18, n. 9, p. 1019-1025, setembro 2007.

ALESSANDRIA, V. et al. Molecular methods to assess *Listeria monocytogenes* route of contamination in a dairy processing plant. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 141, suplemento 1, p. S156-S162, julho 2010.

AMALARADJOU, M. A. R.; NORRIS, C. E.; VENKITANARAYANAN, K. Effect of Octenidine Hydrochloride on Planktonic Cells and Biofilms of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v.75, n. 12, p. 4089-4092, junho 2009.

BEST, M.; KENNEDY, M. E.; COATES, F. Efficacy of a variety of disinfectants against *Listeria* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 56, n. 2; p. 377-380, fevereiro 1990.

BORUCKI, M. K. et al. Variation in Biofilm Formation among Strains of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v.69, n. 12, p. 7336-7342, dezembro 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº9, de 8 de Abril de 2009. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 7 out. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 7 de Março de 1996. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218>>. Acesso em: 21 out. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 12, de 2 de Janeiro de 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em: 17 set. 2010.

BRITO, J. R. F. et al. Retail Survey of Brazilian Milk and Minas Frescal Cheese and a Contaminated Dairy Plant to Establish Prevalence, Relatedness, and Sources of *Listeria monocytogenes* Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 74, n. 15, p. 4954-4961, agosto 2008.

CAGRI-MEHMETOGLU, A. et al. Incidence of *Listeria monocytogenes* and *E. coli* O157:H7 in Two Kasar Cheese Processing Environments. **Food Control**, Guildford, doi 10.1016/j.foodcont.2010.11.011, 2010 (Article in Press).

CAVA, R. et al. Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. **Journal of Food Protection**, v. 70, n.12, p. 2757-2763, dezembro 2007.

CHAITIEMWONG, N.; HAZELEGER, W. C.; BEUMER, R. R. Survival of *Listeria monocytogenes* on a conveyor belt material with or without antimicrobial additives. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 142, n. 1-2, p. 260-263, agosto 2010.

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

CHAVANT, P. et al. *Listeria monocytogenes* LO28: Surface Physicochemical Properties and Ability To Form Biofilms at Different Temperatures and Growth Phases. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 68, n. 2, p. 728-737, fevereiro 2002.

CLOETE, T. E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 277-282, junho 2003.

D'AMICO, D. J.; DONNELLY, C. W. Detection, Isolation, and Incidence of *Listeria* spp. in Small-Scale Artisan Cheese Processing Facilities: A Methods Comparison. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 12, p. 2499-2507, dezembro 2009.

DI BONAVENTURA, G. et al. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n.6, p. 1552-1561, junho 2008.

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

FDA (Food and Drug Administration) / USDA (United States Department of Agriculture) / CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2003. **Quantitative assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods**. Disponível em:<<http://www.fda.gov/downloads/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/RiskAssessmentSafetyAssessment/UCM197330.pdf>>. Acesso em: 4 nov. 2010.

FORSYTHE, S. J. **The Microbiology of Safe Food**. 2nd. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010. 496p.

FOX, E. et al. *Listeria monocytogenes* in the Irish Dairy Farm Environment. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 7, p. 1450-1456, julho 2009.

FRECE, J. et al. Comparison of conventional and molecular methods for the routine confirmation of *Listeria monocytogenes* in milk products produced domestically in Croatia. **Journal of Dairy Research**, London, v. 77, n. 1, p. 112-116, fevereiro 2010.

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

HEFFORD, M. A. et al. Proteomic and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* 568. **Canadian Journal of Microbiology**, Saskatoon, v. 51, n. 3, p. 197-208, 2005.

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

IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária). Portaria nº 517, de 14 de Junho de 2002. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc_download/209-portaria-no-517>. Acesso em: 21 out. 2010.

IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária). Portaria nº 518, de 14 de Junho de 2002. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc_download/210-portaria-no-518>. Acesso em: 21 out. 2010.

International Organization for Standardization, ISO 11290-2:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Listeria monocytogenes*.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

JEMMI, T.; STEPHAN, R. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. **Révue Scientifique et Technique — Office International des Epizooties**, Paris, v. 25, n. 2, p. 571-580, 2006.

JOHANSSON, T. et al. Occurrence and typing of *Listeria monocytogenes* strains in retail vacuum-packed fish products and in a production plant. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 47, n. 1-2, p. 111-119, março 1999.

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. 145f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

KALMOKOFF, M. L. et al. Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 4, p. 725-734, outubro 2001.

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

KESKINEN, L. A.; TODD, E. C. D.; RYSER, E. T. Impact of bacterial stress and biofilm-forming ability on transfer of surface-dried *Listeria monocytogenes* during slicing of delicatessen meats. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 127, n. 3, p. 298-304, outubro 2008.

KHELEF, N.; LECUIT, M.; BUCHRIESER, C.; CABANES, D.; DUSSURGET, O.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.-H.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria**. 3rd. ed. New York: Springer, 2006. Cap. 1.2.11, p. 404-476.

KLAUSNER, R. B.; DONNELLY, C. W. Environmental sources of *Listeria* and *Yersinia* in Vermont dairy plants. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 54, n.8, p. 607-611, agosto 1991.

KOUSTA, M. et al. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 6, p. 805-815, junho 2010.

KUMAR, S. et al. A study on the effects of some laboratory-derived genetic mutations on biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 527-531, 2009.

LATORRE, A. A. et al. Molecular Ecology of *Listeria monocytogenes*: Evidence for a Reservoir in Milking Equipment on a Dairy Farm. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 75, n. 5, p. 1315-1323, março 2009.

LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 645-659, 2006.

MCLAUCHLIN, J. et al. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 92, n. 1, p. 15-33, abril 2004.

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

MINAS GERAIS. Decreto nº 42.645, de 5 de Junho de 2002. Disponível em: <<http://www.deloitte.com.br/publicacoes/2002all/072002/lcmsestados/decreto42645.pdf>>. Acesso em: 21 out. 2010.

MINAS GERAIS. Lei nº 14.185, de 31 de Janeiro de 2002. Disponível em: <http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/gce/outros_documentos/42645.pdf>. Acesso em: 21 out. 2010.

MONTVILLE, T.J.; MATTHEWS, K.R. **Food Microbiology: An Introduction**. 2nd. ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2008. 428p.

ORAVCOVÁ, K. et al. Limitation in the detection of *Listeria monocytogenes* in food in the presence of competing *Listeria innocua*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.104, n. 2, p. 429-437, fevereiro 2008.

POIMENIDOU, S. et al. *Listeria monocytogenes* Attachment to and Detachment from Stainless Steel Surfaces in a Simulated Dairy Processing Environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 75, n. 22, p. 7182-7188, novembro 2009.

ROBERTS, A. J.; WIEDMANN, M. Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 60, n. 5, p. 904-918., 2003.

SLUTSKER, L.; SCHUCHAT, A. Listeriosis in humans. In: RYSER, E. T.; MARTH, E.H. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. 2nd. ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1999. p. 75-95.

SWAMINATHAN, B.; ROCOURT, J.; BILLE, J. *Listeria*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TERNOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 6th. ed. Washington D. C.: ASM Press, 1995, p. 341-348.

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

TIDE, C. et al. The influence of welding procedures on bacterial colonization of stainless steel weldments. **Journal of Food Engineering**, Davis, v. 42, n. 2, p.85-96, novembro 1999.

TOMPKIN, R.B. Control of *Listeria monocytogenes* in the Food-Processing Environment. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n. 4, p. 709-725, abril 2002.

VAID, R.; LINTON, R. H.; MORGAN, M. T. Comparison of inactivation of *Listeria monocytogenes* within a biofilm matrix using chlorine dioxide gas, aqueous chlorine dioxide and sodium hypochlorite treatments. **Food Microbiology**, London, v. 27, n.8, p. 979-984, dezembro 2010.

VANEGAS, M. C. et al. Detection of *Listeria monocytogenes* in raw whole milk for human consumption in Columbia by real-time PCR. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 4, p. 430-432, abril 2009.

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

WAY, S. S. et al. Characterization of flagellin expression and its role in *Listeria monocytogenes* infection and immunity. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 235-242, março 2004.

ZHAO, T.; DOYLE, M. P.; ZHAO, P. Control of *Listeria monocytogenes* in a Biofilm by Competitive-Exclusion Microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 70, n. 7, p. 3996-4003, julho 2004.