

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**DETECÇÃO DE *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Brucella* sp. EM
QUEIJOS PRODUZIDOS ARTESANALMENTE NA REGIÃO LITORÂNEA
DO RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação de Mestrado

Cristina Bergman Zaffari

Porto Alegre (RS), 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**DETECÇÃO DE *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Brucella* sp.
EM QUEIJOS PRODUZIDOS ARTESANALMENTE NA REGIÃO LITORÂNEA
DO RIO GRANDE DO SUL**

Cristina Bergman Zaffari
Médica Veterinária (ULBRA)

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau de
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre (RS), Brasil.

Julho de 2005.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Nilso e Gládis, meu eterno agradecimento, que mesmo distantes, fazem o impossível para estarem presentes. A minha avó Olga, pelo carinho e minha irmã Fabíola.

Ao meu irmão Pedro e minha cunhada Paola, por estarem sempre ao meu lado, independente da situação e por ter suportado meu “humor”. Vou sentir muita saudade.

A minha amada sobrinha, Ana Carolina que, mesmo sem saber, me fez refletir muito sobre os verdadeiros valores da vida.

Ao meu grande amor, Roberto Grecellé, pelo exemplo de profissional, por estar sempre ao meu lado e por todo incentivo, ensinamentos, força, carinho, atenção e paciência dedicada a mim.

A colegas de mestrado Katiane Rodrigues, Juliana Flach, Silvia Pavan, pela ajuda, amizade e atenção dedicada no decorrer do curso. À Sylvia Verdin, Jozi Mello e Ana Beatriz de Oliveira, pela dedicação “extra” nos últimos meses, pelas palavras incentivadoras e amigas.

A minha colega Cristiane Moraes, por ter me recebido e ajudado, incansavelmente, no início do curso.

À Professora Marisa da Costa, pelo voto de confiança em mim depositado, no início do curso, e por ter me despertado a vocação de professora.

A CAPES pelo suporte financeiro destinado a realização deste trabalho.

DETECÇÃO DE *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Brucella* sp. EM QUEIJOS PRODUZIDOS ARTESANALMENTE NA REGIÃO LITORÂNEA DO RIO GRANDE DO SUL¹

Autor: Cristina Bergman Zaffari
Orientador: Dra. Marisa da Costa

RESUMO¹

O queijo é o produto de maior importância entre os derivados do leite, pelo seu grande valor nutritivo e pelas suas características organolépticas. Na região litorânea do Rio Grande do Sul, Brasil, existe uma concentração elevada de comércio artesanal de queijo. Para a estimativa da qualidade microbiológica destes produtos, foram coletadas 80 amostras referentes a 29 bancas de estabelecimentos comerciais localizados nas rodovias RS 30 (Osório-Tramandai), RS 40 (Viamão-Pinhal) e RS 389 (Osório-Torres). Em 26% das amostras, a contagem de coliformes fecais estava acima da estabelecida pela legislação e em 32% das amostras foi possível o isolamento de *E.coli.*, sugerindo considerável contaminação e a necessidade de orientar estes produtores para normas básicas de higiene. Foi confirmada a presença de *Listeria* sp. em 16% das amostras, sendo 4% *L. monocytogenes*. Não foram isoladas cepas de *Brucella* sp. As características do produto analisado como pH, atividade da água, estocagem, presença de altas contagens de microrganismos competidores, provavelmente, contribuíram significativamente para controle de *Listeria* sp. e *Brucella* sp. O presente estudo demonstra que este tipo de alimento pode tornar-se um problema de saúde pública, principalmente para os grupos de risco.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil (92p) Julho, 2005

***Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* AND *Brucella sp.* DETECTION
IN HOMEMADE CHEESES PRODUCED IN THE SEACOAST OF RIO
GRANDE DO SUL**

Author: Cristina Bergman Zaffari
Advisor: Dra. Marisa da Costa

ABSTRACT²

Cheese is the most important among dairy products, due to its high nutritional value and its organoleptic characteristics. In the seacoast of Rio Grande do Sul, Brazil, there is a high concentration of establishments that sold artisanal cheese. For estimate the microbiological quality of these products, 80 samples were collected from 29 stands of retailers located on the RS 30 (Osório-Tramandai), RS 40 (Viamão-Pinhal) and RS 389 (Osório-Torres) highways. In 26% of the samples, the fecal coliform count was above the legal maximum limit and in 32% of the samples; it was possible to isolate *E. coli*, which suggests considerable levels of contamination and the need to instruct the farmers on basic hygiene procedures. The presence of *Listeria sp.* was confirmed in 16% of the samples, 4% of which were *L. monocytogenes*. Strains of *Brucella sp.* were not isolated. The characteristics of the products under analysis, such as pH, water activity, storage, and the presence of high counts of competitive microorganisms, probable, highly contributed to the control of *Listeria sp.* and *Brucella sp.* The present study demonstrates that this kind of food can become a serious public health hazard, specially among risk groups.

²Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (92p) Julho, 2005.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucléico

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC: *American Type Culture Collection*

°C: Graus Celsius

g: Grama

ICBS: Instituto de Ciências Básicas da Saúde

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

µL: Microlitro

mL: Mililitro

mm: milímetros

pH: Logaritmo decimal do inverso da atividade de íons hidrogênio numa solução

PNCEBT: Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1: Padrões microbiológicos estabelecidos para coliformes fecais e <i>L. monocytogenes</i> em queijo, na Resolução-RDC Nº. 12, de 2 de janeiro de 2001, ANVISA, Ministério da Saúde.....	16
Tabela 2: Perfil Bioquímico da <i>L. monocytogenes</i> e de outras <i>Listérias</i> sp... 27	27
Tabela 3: Etapas de subculturas, condições de incubação e meios de cultura utilizados na análise de <i>Listeria</i> sp. em alimentos pelos métodos do FDA e USDA.....	31
Tabela 4: Incidência de <i>L. monocytogenes</i> em laticínios.....	32
Tabela 5: Contagem de coliformes fecais (log.ufc.g ⁻¹), presença de <i>E. coli</i> , em queijo tipo Colonial, resfriados, coletados entre setembro/2004 a junho/2005.....	49
Tabela 6: Contagem de coliformes fecais (log.ufc.g ⁻¹), presença de <i>E. coli</i> em queijo tipo Colonial, não refrigerados, coletados entre setembro/2004 a junho/2005.....	51
Tabela 7: Contagem coliformes fecais (log.ufc.g ⁻¹), presença de <i>E. coli</i> do queijo tipo Ricota e Provolone, resfriados e não refrigerados, coletados entre setembro/2004 à junho/2005.....	53
Tabela 8: Resultados dos testes bioquímicos das colônias características de <i>Listeria</i> sp., isoladas das amostras de queijos produzidos artesanalmente, coletados em bancas da RS 30 (Osório-Tramandaí), RS 40 (Viamão-Pinhal) e RS 389 (Osório-Torres) no período entre setembro/04 e junho/05.....	56
Tabela 9: Espécies de <i>Listeria</i> sp. isoladas das amostras coletadas entre setembro/2004 à junho/2005.....	57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	05
2.1 Definição.....	05
2.2 Elaboração.....	06
2.2.1 Coleta e Tratamento do Leite.....	06
2.2.2 Coagulação e Tratamento da massa.....	08
2.2.3 Moldagem, Prensagem e Salga.....	10
2.2.4 Maturação.....	10
2.3 Bactérias Lácticas.....	12
2.4 Legislação.....	14
2.5 Contaminação do Queijo.....	15
2.5.1 Microrganismos Indicadores.....	17
2.5.2. Coliformes Totais.....	18
2.5.3 Coliformes Fecais e <i>Escherichia coli</i>	19
2.5.4 Características da <i>Escherichia. coli</i>	20
2.5.5 Presença de <i>Escherichia.coli</i> no queijo.....	24
2.6 <i>Listeria</i> sp.	24
2.6.1 Características Morfológica e Bioquímica.....	25
2.6.2 Ocorrência e Transmissão da <i>L. monocytogenes</i>	27
2.6.3 Métodos de Isolamento.....	29
2.6.3.1 Contagem pela técnica de semeadura direta.....	29
2.6.3.2 Enumeração de <i>Listeria</i> sp. pela técnica dos tubos múltiplos..	29
2.6.3.3 Isolamento pelo método do FDA e USDA.....	30
2.6.4 Presença de <i>L. monocytogenes</i> em alimentos.....	31
2.7 <i>Brucella</i> sp.	33
2.7.1 Características da <i>Brucella</i> sp.....	34
2.7.2 Importância da <i>Brucella</i> sp.....	35

2.7.3	Contaminação de <i>Brucella</i> sp. no alimento.....	37
2.7.4	Detecção de <i>Brucella</i> sp.....	38
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1	Coleta.....	40
3.2	Contagem de Coliformes.....	40
3.2.1.	Diluição inicial das amostras.....	40
3.2.2	Contagem de Coliformes Totais.....	40
3.2.3	Confirmação de Coliformes Totais.....	42
3.2.4	Contagem de Coliformes Fecais.....	42
3.2.5	Isolamento de <i>Escherichia coli</i>	43
3.3	Isolamento de <i>Listeria monocytogenes</i>	44
3.3.1	Pré-enriquecimento em meio seletivo.....	44
3.3.2	Isolamento de <i>Listeria monocytogenes</i> em meio sólido seletivo.....	44
3.3.3	Isolamento de <i>Listeria monocytogenes</i> em meio sólido seletivo a partir da diluição inicial, após incubação.....	44
3.3.4	Isolamento das colônias características de <i>Listeria</i> sp.....	45
3.3.5	Provas Bioquímicas para <i>Listeria monocytogenes</i>	45
3.4	Isolamento de <i>Brucella</i> sp.....	46
3.4.1	Amostragem.....	46
3.4.2	Pré-enriquecimento em meio seletivo.....	46
3.4.3	Isolamento em meio sólido seletivo.....	47
3.4.4	Provas Bioquímicas para identificação de <i>Brucella</i> sp.....	47
3.5	Análise Estatística.....	47
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1	Tipos de queijos coletados e armazenamento.....	48
4.2	Contagem de coliformes totais, coliformes fecais e presença de <i>Escherichia coli</i>	48
4.3	Detecção de <i>Listeria</i> sp.....	54
4.4	Detecção de <i>Brucella</i> sp.....	61
5.	CONCLUSÃO.....	63
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
7.	APÊNDICES.....	78

8. VITA.....	91
--------------	----

1. INTRODUÇÃO

O leite e seus derivados são utilizados como alimento pelo homem desde os primórdios da civilização. Contudo, devido a sua riqueza de nutrientes, torna-se susceptível à contaminação por um grande número de microrganismos potencialmente patogênicos ao homem, sendo assim, considerado um meio de cultura bastante favorável ao desenvolvimento de microrganismos.

O queijo é o produto de maior importância entre os derivados do leite, não somente por seu grande valor nutritivo, mas também pelas suas características organolépticas.

A indústria de queijos expandiu fortemente no Brasil nas últimas décadas. O desenvolvimento bem sucedido desta atividade industrial dependeu sobretudo de dois princípios básicos: constante aumento dos padrões produtivos e redução mínima de prejuízos ocorridos durante a produção.

A fabricação do queijo artesanal com venda direta ao consumidor surgiu, como uma das alternativas adotadas pelos pequenos produtores para aumentar a receita da sua atividade. Embora não se encontre nas estatísticas

oficiais, sua contribuição monetária é provavelmente expressiva, principalmente para produtores que não têm acesso às usinas processadoras de leite.

A produção de queijo artesanal utiliza, na maioria das vezes, leite *in natura* ou inadequadamente pasteurizado e maturação. Além das suas características organolépticas dependerem da microbiota do leite e do ambiente, resultando em um produto final variável, a contaminação microbiana destes produtos assume destacada relevância tanto para indústria, pelas perdas econômicas, como para saúde pública, pelo risco de veiculares doenças transmitidas por alimentos.

O número de notificações de toxinfecções de origem alimentar tem apresentado um aumento global, sendo decorrente de fatores, tais como distribuição globalizada, aumento da escala de produção, aumento do número de susceptíveis, como idosos (aumento da idade da população mundial) e imunodeprimidos, melhoria dos métodos de diagnósticos e de investigação. Este quadro confere à segurança sanitária de um produto alimentício um estatus cada vez maior. Do ponto de vista de saúde pública, a população deve ter ao seu alcance alimentos de boa qualidade, dentro dos padrões pré-estabelecidos, não só em valor nutritivo, como também, quanto às condições higiênicas, devendo propiciar segurança à saúde do consumidor.

Os queijos devem ser inspecionados por órgão governamental, em todas as fases da produção, começando pela propriedade rural, onde o leite é obtido até a indústria e os locais onde são expostos ao consumo. Por estas razões, a qualidade microbiológica de queijos artesanais de todo o país vem sendo alvo de constante monitoramento por parte dos órgãos de inspeção. Os

resultados demonstram a contaminação de grande parte das amostras analisadas, confirmando o risco que o consumo destes queijos representa à saúde da população.

Na região litorânea, próxima a Porto Alegre, Rio Grande do Sul, o queijo colonial artesanal é comercializado em bancas próximas às estradas, por onde, principalmente, entre os meses de novembro e fevereiro milhares de pessoas, do próprio estado, de outros estados e até de outros países deslocam-se para estas regiões. As bancas de produtos coloniais, por sua vez, tornam-se atrativos turísticos, aumentando a produção e consumo de queijos artesanais.

O objetivo deste trabalho foi verificar a qualidade microbiológica dos queijos produzidos artesanalmente em pequenos estabelecimentos comerciais em parte da região litorânea do Rio Grande do Sul com a quantificação de coliformes totais, fecais (coliformes termo-tolerantes) e isolamento de *Escherichia coli* (*E. coli*), *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) e *Brucella* sp., tornando possível a classificação dos mesmos.

A pesquisa de coliformes fecais, especialmente *Escherichia coli* nos alimentos fornece, com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas do produto e a indicação da eventual presença de enteropatógenos. *E. coli* é responsável por inúmeros surtos de gastroenterites em humanos após ingestão de alimentos contaminados com este microrganismo, incluindo leite e seus derivados.

A detecção e o isolamento de *L. monocytogenes* em amostras de queijo é um dado com elevada importância sob aspecto de saúde pública, por ser um

produto consumido, também, pela população susceptível à listeriose, ou seja, mulheres gestantes, crianças, idosos e adultos imunocomprometidos.

A ocorrência de *Brucella* sp. em amostras de queijo foi verificada como forma de obter dados sobre a presença deste microrganismo, colaborando com o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) instituída em 2001 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que visa diminuir o impacto negativo destas zoonoses, sendo o controle do leite e seus derivados um dos focos de maior importância.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Definição

O queijo é consumido desde as primeiras civilizações. Povos alimentados com dietas contendo grande proporção de produtos lácteos são usualmente saudáveis, vigorosos e bem desenvolvidos (Araújo *et al.*, 2000).

Não se sabe onde e quando se iniciou a produção de queijo, entretanto é natural que tenha sido descoberto depois do desenvolvimento de elementos que alicerçam a sua produção, como a acidificação natural do leite depois de vários dias e a prensagem do leite ácido com eliminação do soro (Ide & Benedet, 2001).

Existem várias definições para queijo, porém nenhuma muito precisa. Segundo Fox (1993), queijo é o nome genérico dado a um grupo de produtos fermentados à base de leite. A definição que apresenta um caráter mais generalizado é dada pela “Food and Agriculture Organization” (FAO) em seu “Código de Princípios” que o define como “produto fresco ou maturado obtido por coagulação e

separação do soro dos seguintes produtos: leite *in natura*, leite desnatado (total ou parcial), nata, soro ou de uma mistura de quaisquer destes” (Nhuch, 2000).

2.2.Elaboração

Existem, em todo o mundo, mais de 1000 variedades de queijo, que apresentam diferentes formas e sabores. O processamento da maioria das variedades de queijo é a combinação de quatro principais ingredientes: leite, coalho, microrganismos e sal (Beresford *et al.*, 2001).

Para a elaboração do queijo, de uma forma geral, são necessárias várias etapas, embora existam variações específicas para cada tipo. Praticamente todos os tipos de queijo têm uma seqüência comum no seu processo de fabricação. Assim, resumidamente, tais etapas compreendem: recebimento e tratamento prévio do leite, incluindo a refrigeração, higienização e a pasteurização; a coagulação e separação parcial do soro; enchimento de moldes e prensagem prévia; moldagem; prensagem; salga; maturação; controle e saída (Madrid *et al.*, 1986).

2.2.1 Coleta e Tratamento do Leite

A escolha do leite utilizado na fabricação de um dado tipo de queijo é de fundamental importância, devendo-se considerar suas características físico-químicas e microbiológicas, com vistas a obter o produto final desejado

(Nhuch, 2000). A coleta deve ser realizada com máxima higiene (ordenha higiênica), diminuindo assim a contaminação (Scholz, 1997).

Na fabricação de queijos artesanais em condições de higiene deficiente, como coleta de leite de úberes sem higienização, recipientes de coleta oxidados, água armazenada em tambores expostos à contaminação, entre outros aspectos, o risco para saúde do consumidor aumenta significativamente. Nestas condições, verifica-se elevada concentração de coliformes fecais, além da ocorrência de outros microrganismos patogênicos como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* (Camacho & Sierra, 1988; Melchíades, 1993).

O leite obtido assepticamente através de úberes perfeitamente higienizados e ordenha com utensílios limpos, contém, geralmente, menos de 5000 microrganismos/mL. A microbiota deste leite é composta essencialmente por micrococcos, um número pouco significativo de bactérias psicrótróficas e menos de uma ufc (unidade formadora de colônias) de coliforme/mL (Eck, 1990).

Após a obtenção do leite, o mesmo deve ser refrigerado imediatamente até o momento do uso ou de iniciar a fabricação do queijo (Scholz, 1997).

O leite recebido na queijaria deve estar refrigerado a 4-6°C, em cisternas que serão esvaziadas em tanques de aço inoxidável. O leite sempre deve passar por centrifugação, para eliminar impurezas sólidas, e pela pasteurização, a uma temperatura de 70-80°C, durante alguns segundos (Grappin & Beuvier, 1997).

A finalidade da pasteurização é destruir a maioria dos microrganismos patogênicos que estiverem presentes. No aspecto higiênico-sanitário, há exigência

legal (Portaria nº 146 de 07/03/96) da pasteurização somente em queijos cujo período da cura é inferior a sessenta dias (Brasil, 1997). No caso dos queijos maturados por mais de sessenta dias, há diversos trabalhos técnicos-científicos mostrando que a maioria dos patógenos morre durante este período (Mor-Mur *et al.*, 1994).

Durante a pasteurização ocorre, também, a destruição de microrganismos lácticos importantes para produção de sabor e aroma durante a cura. Por isso, a exigência de adicionar ao leite após pasteurização, culturas lácticas específicas para cada tipo de queijo (Estepar *et al.*, 1999).

O leite utilizado na fabricação do queijo artesanal não sofre um processo térmico eficiente. O aquecimento ocorre entre 36-42°C antes da adição do coalho, não atingindo a temperatura de pasteurização, o que permite a sobrevivência de microrganismos, podendo causar contaminação do produto e risco ao consumidor (Schwab *et al.*, 1996)

2.2.2 Coagulação e Tratamento da massa

Antes da coagulação propriamente dita, pode ser acrescentado ao leite, o cultivo de bactérias lácticas, cuja função é transformar a lactose em ácido láctico causando a acidificação, que facilita a coagulação. Adiciona-se também cloreto de cálcio e nitrato de potássio, para diminuir o crescimento de bactérias do leite, que entre outros efeitos, produzem gases prejudiciais para o sabor e o aroma (Schwab *et al.*, 1996).

A coagulação é a etapa decisiva na fabricação do queijo e visa concentrar a proteína do leite retendo também gordura (Beresford *et al.*, 2001).

O fenômeno da coagulação do leite deve-se basicamente à hidrólise parcial da caseína (principal proteína do leite) através da adição de coalho, que é um extrato removido do abomaso de ruminantes. As partículas formadas, em virtude de suas dimensões e de sua carga elétrica negativa, flutuam no leite e repelem-se mutuamente. No entanto, perdem sua estabilidade em função da acidificação ou da ação de enzimas proteolíticas (Scott, 1991).

O coágulo enzimático ocorre em pH próximo ao do leite, ou seja, de 5,8 a 6,6, apresentando característica mais firme e elástica, tornando-se cada vez mais resistente e, ao ser fracionado, se contrai, originando um precipitado consistente (Fox *et al.*, 2000).

O final da coagulação é determinado em função da consistência do coágulo formado, procede-se, então, o fracionamento deste permitindo a saída do soro ali retido. O principal efeito disso é a desigualdade na acidificação produzida pelas bactérias lácticas do fermento, que agem mais rapidamente em grãos com maior umidade (Nath, 1993).

O corte do coágulo formará duas fases: precipitante (massa) e aquosa, (soro). Para acelerar e intensificar a moldagem, a mistura é mantida em agitação e aquecimento entre 30 a 35°C (Wegner, 1987).

2.2.3 Moldagem, Prensagem e Salga

Após a remoção do soro, o coágulo forma uma massa consistente que é colocada em formas, variando em formato e dimensões conforme o tipo de queijo. As formas são tampadas e levadas à prensa, permitindo a extração de água livre do queijo e transformando as partículas da coalhada em uma massa compacta, possibilitando, também, a formação da casca (Fox *et al.*, 2000).

O cloreto de sódio é adicionado em praticamente todos os queijos, em porcentagens que variam de acordo com o tipo a ser fabricado. Além do sabor, o cloreto de sódio influencia nos fatores físico-químicos, bioquímicos e microbiológicos que influenciam a maturação, intensificando a liberação da água da massa e influenciando na seleção da microbiota (Nath, 1993). Medina *et al.* (1995) constataram que a alta concentração de cloreto de sódio na produção do queijo espanhol León influenciou na diminuição da contagem de enterobactérias.

A salga é feita em imersão direta do queijo em tanques de salmoura ou por salga direta aplicada à casca, ou misturada na massa (Amaral *et al.*, 1992).

2.2.4 Maturação

A maturação corresponde à etapa de atividade biológica no queijo, envolvendo reações enzimáticas de decomposição dos três componentes principais do leite retidos no queijo: lactose, proteína e gordura (El Soda, 1993).

Em termos práticos, o queijo é considerado curado quando armazenado por algum tempo após a salga, sofrendo alteração no sabor, textura, consistência e cor, diferenciando-se do queijo fresco (Nath, 1993).

As fermentações secundárias envolvem a conversão dos produtos finais da transformação primária. O ácido láctico, peptídeos e ácidos graxos são transformados em diversos produtos como aminas, ácidos orgânicos, cetonas, lactonas, álcoois, aldeídos e compostos sulfurosos, contribuindo para o refinamento do sabor, aroma e características típicas de cada queijo (Fox, 1993).

Estes processos fermentativos são complexos e muito sensíveis a quaisquer mudanças tanto na composição e qualidade de matéria-prima, como nas condições de processamento. Com a utilização do leite *in natura*, ocorre maior dificuldade em controlar a fermentação do queijo devido à presença de contaminantes naturais secundários indesejáveis, que apesar de dominados pelos microrganismos lácticos desejáveis, desempenham papel complementar na maturação dos queijos. Isto resulta em maior dificuldade de padronização tecnológica dos queijos e também no aumento da ocorrência de defeitos e perdas durante a produção, devido à fermentação indesejada. No caso do leite pasteurizado, estes contaminantes são destruídos (Chapman & Sharpe, 1990).

Portanto, a pasteurização do leite e o uso adequado de culturas lácticas selecionadas ou fermento contribuem significativamente para melhoria da qualidade dos queijos (Nath, 1993).

2.3 Bactérias Láticas

Os microrganismos podem desempenhar papéis muito importantes nos alimentos, sendo possível classificá-los em três grupos distintos, dependendo do tipo de interação entre eles e o alimento: (1) microrganismos causadores de deterioração nos alimentos como alteração da cor, sabor, odor, textura e aspecto; (2) microrganismos patogênicos que podem chegar ao leite por várias vias, sempre refletindo condições precárias de higiene durante a produção, armazenamento, distribuição ou manuseio e (3) microrganismos presentes no alimento que causam alterações benéficas, modificando suas características originais de forma a transformá-lo em um novo alimento (Silva *et al.*, 1997).

A presença de bactérias ácido-láticas no leite é normal e inócua, quando em número, inferior a 10^3 células por mililitro (Soler *et al.*, 1995). Estas bactérias láticas podem ser utilizadas pela indústria laticínios nacionais, especialmente pelo fato de estarem adaptadas às condições de temperatura e da matéria-prima, sendo ainda necessários maiores estudos sobre suas características individuais e específicas (Lopez-Diaz *et al.*, 2000).

A utilização de bactérias fermentadoras, como as ácido-láticas, na elaboração de alimentos têm crescido nos últimos tempos. São pesquisados alguns dos efeitos que a fermentação exerce sobre a conservação de produtos alimentícios, por isso, pretende-se conhecer, dirigir e melhorar esses processos, visando à obtenção de produtos de melhor qualidade (Frank & Hassan, 1998).

O grupo das bactérias lácticas é formado por doze gêneros de microrganismos Gram-positivos, entre eles, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Carnobacterium* (Schleifer *et al.*, 1995).

Em épocas anteriores a fermentação da lactose para produção de queijo dependia somente das bactérias lácticas ali presentes (Balduino *et al.*, 1999). Atualmente, bactérias iniciadoras são adicionadas ao alimento. Estas culturas lácticas são o ingrediente de maior importância na fabricação do queijo, sendo um fator indispensável para obtenção de um produto de boa qualidade e padronizado. Apropriadamente chamadas de “starter” ou iniciadoras, essas culturas iniciam a maiorias das reações e mudanças que ocorrem durante a fabricação de queijo (Furtado *et al.*, 1990; Litopoulou-Tzanetaki & Tzanetaki, 1992; Mor-Mur, *et al.*, 1994). Aproximadamente 90% das culturas iniciadoras são compostas por *Lactococcus* sp., considerada uma boa cultura láctica por converter quase toda lactose em ácido láctico (Beresford *et al.*, 2001).

Apesar de seus mecanismos precisos ainda não estarem bem conhecidos, os fatores identificados como antagonismos lácticos são: peróxido de hidrogênio, diacetil, redução de nutrientes bem como a produção de bacteriocinas (Piard & Desmazeaud, 1991),

Vários estudos têm indicado que as bacteriocinas são uma das principais substâncias responsáveis pela ação antimicrobiana, especialmente em bactérias Gram-negativas, mediadas pelas bactérias lácticas (De Giorgi *et al.*, 1983; Sobrino *et al.*, 1991; Santos, 1993). Medina *et al.* (1995), em

pesquisa realizada em queijo espanhol León, elaborado com leite de vaca *in natura*, constataram decréscimo na contagem de enterobactérias ao longo da maturação, desaparecendo completamente após noventa dias.

2.4 Legislação

As metodologias para amostragem, coleta, acondicionamento, transporte e análise microbiológica de amostras de produtos alimentícios deve obedecer ao disposto pelo Codex Alimentarius; “Internacional Commission on Microbiological Specifications for Food” (I.C.M.S.F); “Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods” e “Standard Methods for the Examination of Dairy Products” da American Public Health Association (APHA); “Bacteriological Analytical Manual” da “Food and Drug Administration”, editado por “Association of Official Analytical Chemists” (FDA/ AOAC) em suas últimas edições e ou revisões, assim como outras metodologias internacionalmente reconhecidas.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde considerando a importância de compatibilizar a legislação nacional com regulamentos do Mercosul, relacionados aos critérios e padrões microbiológicos, aprovou o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos na Resolução-RDC Nº. 12, de 2 de janeiro de 2001. Esta Resolução determina os microrganismos que devem ser verificado nos diferentes produtos alimentícios por meio de metodologias padronizadas e analisados em relação a cada tipo de alimento (Brasil, 2001).

Os diversos tipos de queijos têm o seu padrão microbiológico contemplados nesta Resolução (Tabela 1). O descumprimento aos termos desta Resolução constitui infração sanitária.

TABELA 1: Padrões microbiológicos estabelecidos para coliformes fecais e *L. monocytogenes* em queijo na Resolução-RDC N°. 12, de 2 de janeiro de 2001, ANVISA, Ministério da Saúde (Brasil, 2001)

Tipo de queijo	Coliformes a 45°C (ufc/g)	<i>L. monocytogenes</i> /25g
a) baixa umidade	5×10^2	-
b) média umidade: 36% (Danbo, prato, mussarela curado e similares)	10^3	Ausente
c) alta umidade: 46% (cremoso, criollo, mussarela e similares)	5×10^3	Ausente
d) alta umidade: 46%, de muito alta umidade: 55%, c/ bactérias lácticas abundantes e viáveis, incluindo Minas frescal	5×10^3	Ausente
e) muito alta umidade: 55%, incluindo queijos de coalho c/ umidade correspondente, minas frescal, mussarela e outros, elaborados por coagulação enzimática, sem ação das bactérias lácticas	5×10^2	Ausente

- Não exigido na legislação acima

2.5 Contaminação do queijo

Programas de resfriamento do leite na fazenda, após a ordenha, com posterior coleta e transporte de leite em caminhões-tanque isotérmicos, têm aumentado significativamente. Estas duas medidas vêm sendo amplamente incentivadas pelos laticínios, bem como pelas autoridades governamentais, uma vez que há considerável aumento na qualidade do leite e derivados quando este é refrigerado na fazenda (Silva *et al.*, 2000).

A *Escherichia coli*, o *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* estão sendo apontadas como as maiores causadoras de infecções associadas ao consumo de queijo. Estes microrganismos podem causar seqüelas por um longo período e até mesmo a morte (Silva *et al.* 2001).

2.5.1 Microrganismos indicadores

O termo microrganismo indicador pode ser aplicado a qualquer grupo taxonômico, fisiológico ou ecológico de microrganismos, cuja presença ou ausência proporciona uma evidência indireta referente a uma característica particular do histórico da amostra. Os microrganismos indicadores fornecem informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial de um alimento, além de indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento (Forsythe, 2000; Silva *et al.*, 2000).

Um indicador de segurança dos alimentos deve apresentar certas características importantes: ser detectável de forma fácil e rápido; ser facilmente distinguível de outros membros da microbiota do alimento; possuir um histórico de associações constantes com o patógeno cuja presença visa indicar; estar sempre presente quando o patógeno de interesse estiver presente; ser um microrganismo cujas contagens sejam correlacionadas às quantidades do patógeno de interesse; possuir características e taxas de crescimento equivalentes às do patógeno; possuir taxa de mortalidade que seja ao menos paralela à do patógeno e, de preferência, que persista por mais tempo do que este último; estar ausente dos alimentos que são livres de patógenos, ou se estiver presente deverá estar em baixas contagens (Jay, 2005).

2.5.2. Coliformes Totais

A utilização de coliformes como indicadores de condições higiênico-sanitárias em alimentos é uma prática estabelecida há anos. Coliformes são um dos grupos microbianos de maior importância no leite *in natura* e sua enumeração é empregada como índice de grau de higiene. A presença em número elevado indicaria métodos de ordenha e/ou fabricação pouco higiênica, inadequada pasteurização ou contaminação após pasteurização. Nestes casos costuma-se isolar números elevados de coliformes (Tornadijo *et al.*, 2001).

As bactérias do grupo coliforme diferenciam-se em fecais e não fecais, que são encontradas no trato intestinal do homem e dos animais, entretanto as

primeiras são incapazes de persistirem, por longo tempo, em outro ambiente exceto as fezes (Silva *et al.*,1997).

Os coliformes totais são formados por bastonetes Gram negativos, não formadores de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C, incluindo cerca de 20 espécies, dentre as quais encontram-se tanto bactérias entéricas, como diversos gêneros e espécies de bactérias não entéricas, como *Serratia* sp. e *Aeromonas* sp., por exemplo (Silva *et al.*,1997).

A presença de coliformes totais no alimento não indica, necessariamente, contaminação fecal. Porém sua presença em alimentos processados é uma indicação útil de contaminação pós-sanitização ou pós-processamento (principalmente na pasteurização), evidenciando práticas de higiene aquém dos padrões requeridos para o processamento de alimento (Tronco, 1997).

Os valores de pH e de acidez do leite influenciam na população de coliformes. Na fabricação de queijos, o emprego de cultivos iniciadores adequados tem importante papel no controle destes microrganismos, através da produção de ácido lático e, conseqüentemente, do declínio de pH e, possivelmente, pela produção de substâncias com capacidade inibitória sobre o crescimento (Frank & Hassan, 1998).

A evolução deste grupo microbiano é determinada pelos níveis iniciais do leite, pelas características do queijo e pelas condições de maturação. Apesar de algumas espécies serem relativamente ácido-tolerantes, a maioria desaparece nas etapas iniciais da maturação dos queijos. Os efeitos combinados de vários fatores de

inibição repercutem de modo eficaz no controle dos coliformes, determinando sua progressiva diminuição ao longo da maturação (Fontán *et al.*, 2001).

2.5.3 Coliformes Fecais e *Escherichia coli*

O grupo dos coliformes fecais é formado pelos gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, sendo que os dois últimos incluem cepas de origem não fecal (Germano & Germano, 2001).

A presença dos coliformes fecais no alimento indica contato direto ou indireto com associações microbianas encontradas no intestino humano ou animal, podendo estar associada à presença de outros organismos patogênicos (Fontán *et al.*, 2001).

O grupo coliforme fecal compreende a população predominantemente de *Escherichia coli* e são observadas, também, contaminando alimentos (Pereira *et al.*, 1999). A presença dos coliformes fecais no alimento é menos representativa como indicação de contaminação fecal do que a enumeração direta de *Escherichia coli*, porém mais significativa do que a presença de coliformes totais, dado o maior predomínio de *Escherichia coli* dentro do grupo fecal (Silva *et al.*, 1997).

2.5.4 Características da *E. coli*

A *E. coli* é uma enterobactéria Gram-negativa, catalase positiva e oxidase negativa. Embora existam cepas capazes de multiplicar-se a 4°C, é um microrganismo mesófilo típico, capaz de desenvolver-se em temperaturas que variam entre 7 a 46°C, sendo 37°C sua temperatura ótima de crescimento. Este microrganismo não apresenta termorresistência, sendo destruído em temperaturas em torno de 60°C em poucos segundos (Germano & Germano, 2001).

A dose infectante de *E. coli* em humanos adultos é geralmente entre 10⁶ a 10⁸ célula/g, porém alguns autores afirmam que entre 10¹ a 10² células podem ser suficientes para causar a doença (Strachan *et al.*, 2001; Sippy *et al.*, 2003). O período de incubação varia entre 18 a 24 horas após contaminação e a duração da doença pode ser de alguns dias (Cliver, 1990).

As cepas de *E. coli* toxigênicas, ou seja, as responsáveis por toxinfecções, podem ser classificadas em quatro categorias: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), que é a principal causadora de distúrbios gastrointestinais relacionados à contaminação do queijo, enteroinvasiva (EIEC) e entero-hemorrágica ou produtoras de verotoxina (VTEC) (Holko *et al.*, 2005)

A carne e o leite *in natura* foram os alimentos mais associados à infecção por *E. coli* O157:H7 em diversos surtos no EUA e Canadá (Qiongzehen *et al.*, 2004). Em 1982, *E. coli* O157:H7 foi reconhecida como patogênica a humanos após ter sido implicada como a principal causa de colite hemorrágica em dois surtos ocorridos nos Estados Unidos (Dontorou *et al.*, 2004).

Desde então, mais de 30 países notificaram surtos causados por *E. coli* O157:H7 (Jo *et al.*, 2004). Mead *et al.* (1999), estimam que a *E. coli* O157:H7 é responsável por 73 mil novos casos, com aproximadamente 61 mortes, por ano nos EUA

2.5.5 Presença de *E.coli* no queijo

Analisando a qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal, Silva *et al.* (1997) obtiveram resultados comprovando que, a maioria das amostras analisadas, apresentou condições higiênico-sanitárias insatisfatórias. A contagem média de coliformes fecais e *E. coli* encontradas nas amostras foram superiores às exigidas pela vigilância sanitária. Quinto & Cepeda (1997) analisaram 296 amostras de queijos suaves na cidade de Lugo na Espanha, sendo 75 provenientes de leite bovino não pasteurizado. Estes apresentaram uma positividade de 4% contaminados com *E. coli* toxigênica.

Em queijo Minas Frescal fabricado artesanalmente foi registrado 91,3%, 43,5% e 31,6% das amostras em desacordo com os padrões estabelecidos na legislação brasileira para *S. aureus*, *Salmonella* e *E. coli* respectivamente (Silva *et al.* 2001).

2.6 *Listeria* sp.

Um conjunto de características faz com que *Listeria* sp., especialmente *L. monocytogenes*, sejam microrganismos emergentes de interesse na área de alimentos. Vários surtos e casos esporádicos de listeriose de origem alimentar ocorrido no Canadá, Estados Unidos e Europa fizeram com que aumentasse o interesse em detecção de *L. monocytogenes*, ocupando um importante papel no controle de qualidade na indústria de alimentos (Silva *et al.*, 1998).

2.6.1 Características Morfológicas e Bioquímicas

Membros do gênero *Listeria* são microrganismos amplamente distribuídos no ambiente, definidos como bastonetes regulares, Gram positivos, não formadores de esporos, catalase positivos e não produtores de Indol e H₂S. Crescem em uma ampla faixa de temperatura (3-45°C), com um crescimento ótimo entre 30-37°C, sendo classificados como psicro-tolerantes em função de multiplicar-se em temperatura de refrigeração (Silva *et al.*, 2001) e possui um aumento do seu crescimento sob concentração reduzida de oxigênio (Ryser, 1998).

Uma importante característica deste gênero é a capacidade de crescimento em temperaturas de 5°C ou menores, possibilitando o isolamento em água destilada ou caldo nutritivo após um longo período de incubação em temperatura de refrigeração (Langraf, 1997; Papageorgiou *et al.*, 1996).

Estas bactérias apresentam flagelo peretríquios, que causam movimentos celulares rotatórios ou de tombamento, exibindo turvação característica em forma de guarda-chuva quando incubada a 20-25°C em ágar semi-sólido, mas são imóveis a 37°C. São anaeróbios facultativos, fermentadores de glicose, com produção de ácido láctico e sem produção de gás (Farber *et al.*, 1994, Silva *et al.*, 1997).

O gênero *Listeria* encontra-se constituído por seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. innocua* e *L. welshimeri* e *L. grayi*. Dentre elas, *L. monocytogenes* é a patogênica para o homem (Farber *et al.*, 1991).

Bioquimicamente, a *L. monocytogenes* diferencia-se das demais *Listerias* conforme está demonstrado na Tabela 2.

TABELA 2: Perfil Bioquímico da *L. monocytogenes* e de outras *Listerias* sp.

	<i>Listeria Monocytogenes</i>	<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Listeria seeligeri</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria welshimeri</i>
β-hemólise	+	+	+	-	-
CAMP teste					
<i>S. aureus</i>	+	-	+	-	-
<i>R. equi</i>	-	+	-	-	-
Redução/Nitrato	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+
Vermelho de Metila	+	+	+	+	+
Produção/ácido					
Manitol	-	-	-	-	-
Ramnose	+	-	-	+/-	+/-
Xilose	-	+	+	-	-

Fonte: Adaptado de Farber *et al.* (1991).

+ Positivo; - Negativo; +* Reação positiva fraca; +/- Variável

A *L. monocytogenes* e a *L. innocua* fermentam glicose, lactose e ramnose sob condições de aerobiose e a *L. ivanovii* e a *L. seeligeri* são as espécies que fermentam xilose (Pinne *et al.*, 1992)

A reação hemolítica da *L. monocytogenes* é fraca e a zona clara só pode ser observada após a remoção da colônia da superfície da placa com ágar sangue, podendo causar dúvida na interpretação dos resultados com a *L. innocua* (Schuch, 1994).

A hemolisina age sinergicamente com a beta-hemolisina do *Staphylococcus aureus* em placas contendo ágar sangue de carneiro. A substância mediadora deste efeito é conhecida como Fator CAMP. Este teste é utilizado na diferenciação da *Listeria monocytogenes* das demais espécies de *Listeria* (BAM, 2003).

A *L. monocytogenes* está dividida treze sorovares: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4d, 4e e 7. Em 722 casos de listeriose humana estudada na Inglaterra, 91% das infecções foram relacionadas com sorovares 1/2a, 1/2b ou 4b (McLauchlin, 1997).

2.6.2 Ocorrência e Transmissão da *L. monocytogenes*

A *L. monocytogenes* encontra-se amplamente distribuída no meio ambiente de onde pode ser isolada de várias fontes, incluindo água, solo, vegetação, fezes de animais e do homem. A silagem impropriamente fermentada é uma fonte

importante de contaminação para ruminantes, podendo causar quadros de mastite, e, conseqüentemente contaminando o leite *in natura* (Barrow & Feltham, 1993)

A *L. monocytogenes* pode ser encontrada em leite *in natura*, queijos com alta umidade, carnes frescas ou congeladas, frangos, estabelecendo que qualquer alimento fresco de origem animal ou vegetal pode apresentar número variado de *L. monocytogenes* (Jay, 2005).

Ao contrário da maioria dos patógenos de origem alimentar, que geralmente provocam sintomas gastrointestinais, as principais manifestações clínicas da listeriose são, inicialmente, semelhantes a um resfriado. A sintomatologia mais freqüente é hipotermia, fadiga, podendo progredir para meningite, meningoencefalite, septicemia, aborto ou parto pré-maturo. A taxa de mortalidade encontra-se na faixa de 20-30% dos casos diagnosticados (Ryser, 1998). A listeriose ocorre em casos esporádicos ou em surtos epidêmicos. (Murray *et al.*, 1995).

A ingestão de 100 a 1000 células de *L. monocytogenes* pode ser letal para fetos, crianças e imunodeprimidos. O número mínimo de células que deve ser ingerido para causar doença em indivíduos normais não é conhecido, variando conforme a suscetibilidade do hospedeiro, pH do suco gástrico e a virulência da cepa bacteriana. Indivíduos saudáveis consomem alimento contendo o microrganismo em pequeno número e não apresentam sinais de listeriose (Farber & Peterkin, 1991).

Após penetrar no trato intestinal, a bactéria invade os tecidos, incluindo a placenta, crescendo e multiplicando-se no interior dos macrófagos do fígado e do baço, produzindo lesão pela presença da listeriolisina, uma proteína com capacidade de romper macrófagos. A imunidade contra a listeriose depende da ativação dos

linfócitos T, entretanto ainda não está bem esclarecido o papel da defesa imunológica celular nesta patologia (Rocourt *et al.*, 1997).

2.6.3 Métodos de Isolamento

2.6.3.1 Contagem pela técnica de semeadura direta

Este método utiliza água peptonada para a homogeneização com 25 gramas da amostra e para obtenção das diluições decimais até 10^{-4} .

O volume de cada diluição é semeado, na superfície, de placas contendo ágar Oxford modificado suplementado com moxalactan e sulfato de colistina e ágar Palcam. As placas são incubadas a 35°C por 24 a 48 horas, sendo o ágar Palcam em condições de microaerofilia (5% CO₂, 80% N e 10% H). Posteriormente, é realizada a contagem e isolamento de colônias características de *Listeria* sp. e sua confirmação (Silva *et al.*, 1997).

2.6.3.2 Enumeração de *Listeria* sp. pela técnica dos tubos múltiplos

A quantificação de *Listeria* sp. e *L. monocytogenes* em amostras analisadas pela técnica do número mais provável (NMP) é realizada de acordo com a técnica convencional proposta por Tran & Hitchins (1996). Nesta técnica, uma alíquota cada diluição decimal é inoculada, em triplicata, em de caldo triptose de soja adicionado de 0,2 % de esculina e 0,1% de citrato férrico amoniacal e incubado a

35°C por 24-48 horas. Após este período, uma alíquota dos tubos que apresentarem coloração enegrecida, é transferida para tubos contendo caldo Fraser suplementado com acriflavina, ácido nalidíxico e citrato férrico amoniacal e incubados durante 48 horas a 35°C.

Tubos apresentando caldo Fraser enegrecido são semeados em ágar Mox e Palcam para posterior incubação. A determinação do NMP é realizada após a confirmação de *L. monocytogenes* em cada diluição (Yu *et al.*, 1995).

2.6.3.3 Isolamento pelo método do FDA e USDA

Os métodos de detecção de *Listeria monocytogenes* em alimentos utilizam a capacidade de crescer em baixas temperaturas e a resistência a vários antibióticos. A técnica de enriquecimento a frio em meios não-seletivos é considerada a mais segura, porém em função do longo tempo de refrigeração requerido, tem sido substituída pelo enriquecimento em meios seletivos e em temperatura de 30°C. Esses meios de cultura, geralmente, são caldos nutritivos suplementados com vários agentes antimicrobianos, sendo os mais utilizados o ácido nalidíxico, acriflavina e cicloeximidina (Silva *et al.*, 1997).

O método proposto pela Food and Drug Administration dos Estados Unidos (FDA), usualmente utilizado na análise de produtos lácteos e o método do United States Department of Agriculture (USDA), são amplamente difundidos. Estes métodos apresentam grande semelhança, sua principal diferença está relacionada à

escolha do meio utilizado em cada etapa e a aplicação ou não de uma segunda etapa de enriquecimento seletivo (Tabela 3) (Yu & Fung, 1991).

TABELA 3: Etapas de subculturas, condições de incubação e meios de cultura utilizados na análise de *Listeria* sp. em alimentos pelos métodos do FDA e USDA

Órgão regulador	Enriquecimento primário	Enriquecimento secundário	Plaqueamento diferencial
Food and Drug Administration (FDA)	LEB 30°C/24 e 48h	-	OXA 35°C/24 e 48h LPM 30°C/24 e 48h
United States Department of Agriculture (USDA)	UVM 30°C/24h	Fraser 35°C/24 e 48h	MOX 35°C/24 e 48h

Fonte: Silva *et al.* (1997).

LEB Caldo Enriquecimento de Listeria, UVM: Caldo Universidade de Vermont

OXA: ágar Oxford, LPM: ágar Cloreto de Lítio Feniletanol Moxalactam

MOX :ágar Oxford Modificado

2.6.4 Presença de *L. monocytogenes* em alimento

A literatura é abundante em relatos da presença de *Listeria* sp. em alimentos, seja nas matérias-primas, durante a produção e/ou durante o processamento ou nos produtos já acabados em exposição nas prateleiras (Franco & Landgraf, 1996; Furlanetta *et al.*, 1996). Entre os alimentos, o queijo é reconhecido como um importante veículo de transmissão de listeriose humana, como demonstrado na Tabela 4 (Wernars *et al.*, 1991).

TABELA 4 Ocorrência de *L. monocytogenes* em laticínios

Produto	Nº de Amostras	% <i>L. monocytogenes</i>
Queijo maturado	88	0
Queijo semimaturado	205	2
Queijo branco maturado	261	2,7
Queijo frescal	222	10
Queijo frescal	338	1,8
Manteiga	20	0
Queijo de cabra	476	4,6
Queijo de ovelha	141	0,7
Iogurte	180	2,2
Sorvete	394	0,3

Fonte: Adaptado de Farber & Peterkin (1991)

Os primeiros surtos registrados de listeriose ocorreram em Halle, na Alemanha Oriental, entre 1949 e 1957. Foram associados ao consumo de leite e derivados e atingiram 100 gestantes que apresentaram aborto ou parto pré-maturo. Em Los Angeles, foram identificados 94 casos de listeriose, nos anos de 1985 e 1986 e 64 casos em 1987, totalizando 8,5 casos em um milhão de habitantes. Em 1985, na Califórnia (EUA), um surto de listeriose com 142 casos registrados apresentou como provável fonte de contaminação o queijo tipo mexicano. Na Suíça, um tipo de queijo macio contaminado com *L. monocytogenes* foi responsável pelo surto que persistiu durante quatro anos e registrou 122 casos (Rocourt, 1997).

No Brasil, a *Listeria* sp. foi encontrada em 12,7% das amostras de leite *in natura* coletada em plataforma láctea, sendo que 9,5% dos isolamentos foram positivos para *L. monocytogenes*. A *L. innocua* apresentou um percentual idêntico,

enquanto as demais espécies do gênero foram isoladas com percentual menor que 1% (Moura *et al.*,1993)

Sousa (2002) detectou baixa incidência (1,4%) de *L. monocytogenes* em 70 amostras de queijo de coalho artesanal comercializado em Fortaleza-CE. Silva *et al.*, 1998, pesquisando a contaminação em queijos produzidos no Rio de Janeiro, encontraram 19,6% das amostras positivas para *L. monocytogenes* e, ainda, as mesmas amostras foram também positivas para *L. innocua* e *L. grayi*, demonstrando, que a frequência de casos de listeriose veiculada por queijos, evidencia a importância desse alimento e de outros derivados do leite na cadeia epidemiológica de transmissão de *Listeria* sp. (Rayser & Marth, 1991).

Pesquisa realizada em 50 amostras de queijo tipo Colonial com produção artesanal comercializados em Porto Alegre-RS evidenciou a presença de *L. monocytogenes* em uma amostra e em 16 amostras foi isolada *L. innocua*. Na amostra contaminada com *L. monocytogenes* também foi isolada a *L. innocua* (Schwab *et al.*, 1996).

2.7 *Brucella* sp.

O fato da brucelose, tuberculose e outras zoonoses poderem ser transmitidas através da ingestão do leite e derivados foi reconhecido no último século e o aquecimento do leite antes de ser consumido foi adotado como medida preventiva efetiva. A pasteurização foi introduzida na indústria de laticínios para combater as enfermidades e aumentar o tempo de prateleira do produto. Os

parâmetros de tratamento térmico foram definidos em função da resistência térmica dos microrganismos (Hajdenwurcel, 1997).

A *Brucella* é um microrganismo de classe III e o material deve ser manipulado dentro das regras de segurança microbiológica, sendo realizados por poucos laboratórios (Hamdy & Amin, 2002; Brasil, 2003).

2.7.1 Características da *Brucella* sp.

A brucelose é uma doença infecto-contagiosa causada por bactérias do gênero *Brucella*. Os membros deste gênero são bactérias Gram-negativas, imóveis, não formadoras de esporos com morfologia de cocobacilos, intracelulares facultativos e podem apresentar-se em cultivos primários com morfologia colonial lisa ou rugosa (Rojas *et al.*, 2001; Ocholi *et al.*, 2004). Possuem requerimentos fastidiosos para seu crescimento, pois requerem meios complexos enriquecidos com soro e atmosfera entre 5 a 10% de dióxido de carbono (Alton *et al.*, 1988; Ocholi *et al.*, 2004).

Considera-se que o gênero *Brucella* contenha seis espécies: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* e *B. neotomae* subdividas dentro de biovars ou biotipos (Moreno *et al.*, 2002; Zigmunt *et al.*, 2002; Ko & Splitter, 2003; Ocholi *et al.*, 2004). A estas seis espécies podem ser incluídas as espécies isoladas de mamíferos marinhos tais como cetáceos e pinípedes (Halling & Boyle, 2002; Moreno *et al.*, 2002; Ko & Splitter, 2003). Atualmente, duas novas espécies estão sendo

propostas, *B. cetaceae* e *B. pinnipediae*, devido ao isolamento nestes mamíferos marinhos (Clockaert *et al.*, 2003; Vizcaíno *et al.*, 2004)

As bactérias deste gênero, apesar de permanecerem no ambiente, não se multiplicam. Elas são medianamente sensíveis aos fatores ambientais, entretanto a resistência diminui quando aumentam a temperatura e a luz solar direta ou diminui a umidade. A pasteurização é um método eficiente de destruição deste microrganismo, assim como as radiações ionizantes (Brasil, 2003).

2.7.2 Importância da *Brucella* sp.

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) foi instituído em 2001 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento com o objetivo de diminuir o impacto negativo destas zoonoses na saúde comunitária e de promover a competitividade da pecuária nacional. Este programa instituiu a vacinação obrigatória contra brucelose bovina e bubalina em todo o território nacional e definiu uma estratégia de certificação de propriedades livres ou monitoradas, onde estas enfermidades serão controladas com rigor (Brasil, 2003). Assim, tornam-se importantes, estudos que apontem a presença da *Brucella* sp. em propriedades e produtos lácteos.

A brucelose é considerada como a zoonose mais importante de ocorrência mundial. Esta afirmação é apoiada também por órgãos internacionais como a Organização de Alimentos e Agricultura (Food and Agriculture Organization - FAO), a

Organização Mundial da Saúde (World Health Organization - WHO) e o Escritório Internacional de Epizootias (Office International des Epizooties - OIE) (Poester *et al.*, 2002).

A brucelose acarreta problemas sanitários importantes e prejuízos econômicos vultosos devido a abortos, diminuição na produção leiteira e infertilidade dos animais (Rojas *et al.*, 2001; Arellano-Reynoso *et al.*, 2004).

A brucelose bovina está disseminada em todo o Brasil e, no Estado do Rio Grande do Sul, onde a prevalência era de 0,3% em 1986 (Poester *et al.*, 2002).

A maioria dos casos de brucelose bovina é causada por *B. abortus*, *B. suis* e *B. melitensis* (Luna-Martínez & Mejía-Terán, 2002). A brucelose é responsável pela diminuição de 25% da produção de leite, pela diminuição na produção de terneiros em 15% e uma em cada cinco fêmeas bovinas infectadas aborta ou torna-se permanentemente estéril (Brasil, 2003).

Dentre as espécies de *Brucella*, a *B. melitensis* tem sido considerada a mais patogênica ao homem, embora alguns autores demonstrem que a *B. abortus* produza doença com intensidade semelhante (Soberón-Mobarak *et al.*, 2000; Ocholi *et al.*, 2004). Por afetar, principalmente, grupos profissionais específicos, ocupam um lugar de destaque em saúde ocupacional. Estão incluídos nestes grupos os médicos veterinários, funcionários de frigoríficos e de granjas leiteiras, além de pessoas que trabalham em laboratórios que manipulem materiais contaminados com este microrganismo (Salgado *et al.*, 1995; Metin *et al.*, 2001; Poester *et al.*, 2002).

A brucelose está incluída no contexto das doenças transmitidas por alimentos. O consumo de leite e seus derivados, não pasteurizados, constituem uma

via importante de transmissão de *Brucella* sp. aos humanos (Metin *et al.*, 2001). Entretanto, ainda há possibilidade de inalação de aerossóis e pelo contato com conteúdo uterino de animais infectados. Após a penetração na mucosa epitelial, a bactéria é transportada, livre ou dentro dos macrófagos, até os linfonodos regionais. As células de *Brucella* sp. podem ficar cronicamente alojadas nos linfonodos supramamários e glândulas mamárias em 80% dos animais infectados. Estes animais podem excretar o patógeno em seus fluidos corporais, tais como o leite, mesmo que o período agudo da doença tenha acabado e os animais possam estar sem sinais clínicos (Leal-Klevezas *et al.*, 1995). A mastite brucélica é uma doença crônica e sem sinais clínicos aparentes e as fêmeas bovinas podem excretar um grande número de células viáveis de *Brucella* sp. através do leite durante meses até anos após a infecção (Langoni *et al.*, 2000).

A sintomatologia em humanos é bastante variável. De modo geral, a manifestação da brucelose é aguda e os sinais clínicos mais comuns são: febre, suores noturnos e astenia. Ainda são relatados outros sinais como insônia, febre intermitente, anorexia, cefaléia, artralgia, dores generalizadas, irritação, nervosismo e depressão. Nos exames clínicos complementares salientam-se adenomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia (Metin *et al.*, 2001; Leclerc *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2002; Ko & Splitter, 2003).

2.7.3 Contaminação de *Brucella* sp. no alimento

Em todo o mundo, são registrados 5000 novos casos de contaminação humana por *Brucella* sp., desses, alguns são associados ao consumo de queijo proveniente de leite não pasteurizado (Chapman & Sharp, 1990; Wallach, 1994).

Alguns fatores afetam a sobrevivência da *Brucella* sp. em alimentos, incluindo umidade, pH, idade e a presença de outros microrganismos (Wallach, 1994)

A *Brucella* sp. tem se mostrado viável em manteiga e sorvete por mais de um mês, e em queijos frescos por vários meses. Apesar da *Brucella* sp. sobreviver por meses, após inoculação em leite esterilizado, ela morre cerca de 10 dias em amostras de leites contaminados naturalmente ou em leite talhado e acidificado. No queijo a *Brucella* sp. morre em poucos dias pelo acúmulo de ácido láctico

Segundo Freitas *et al.*, (2002), cepas de *Brucella* sp. foram isoladas na região de Santa Catarina em 11 amostras de 29 produtos analisados, entre os quais lingüiça frescal, queijo prato e queijo frescal. Os produtos analisados eram de origem desconhecida, produzidos artesanalmente, crus ou insuficientemente cozidos.

2.7.4 Detecção de *Brucella* sp

Pode-se isolar *Brucella* sp. a partir do sangue ou soro, membranas fetais, fetos abortados, conteúdo estomacal dos fetos, carcaças animais, sêmen e do leite de úberes infectados, através de métodos diretos e sorológicos (Alton *et al.* , 1988).

Um componente importante no diagnóstico de brucelose é o isolamento da bactéria e, é considerado, o padrão ouro para o diagnóstico (Romero *et al.*, 1995). O meio seletivo comumente utilizado no isolamento primário de *Brucella* sp. é denominado de ágar Farrel. Este meio diminui a contaminação secundária que venha a ocorrer durante o período de incubação, já que a *Brucella* sp. apresenta crescimento lento (Alton *et al.*, 1988).

Entretanto, este tipo de diagnóstico apresenta inúmeras desvantagens como o tempo de cultura de *Brucella* sp. (que pode ser de até 30 dias), tipo de material utilizado para o isolamento e a eliminação intermitente do agente. Os testes utilizados para caracterização desta bactéria são realizados com a utilização de bacteriófagos e aglutinação com soros específicos e devem ser realizados por equipe qualificada (Bricker, 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta

No período compreendido entre setembro de 2004 e junho de 2005, foram coletadas 80 amostras de queijos produzidos artesanalmente e comercializados em bancas localizadas nas estradas RS 30 (Osório-Tramandai), RS 40 (Viamão-Pinhal) e RS 389 (Osório-Torres). De cada banca foram adquiridas uma ou mais amostras (aproximadamente 200 gramas), escolhidas aleatoriamente. Foram realizadas visitas em diferentes períodos do ano, em cada uma das 29 bancas.

As amostras foram transportadas em recipiente isotérmico contendo tubos de gelo e mantidas sob refrigeração até o momento das análises. As análises foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.2. Diluição inicial das amostras

Foi removido aproximadamente 1cm de espessura da parte externa de cada queijo com auxílio de garfo e faca inox esterilizados. As 25 gramas pesadas, da parte interna de cada amostra foram acondicionadas em sacos plásticos esterilizados para posterior adição de 225 mL da água peptonada (APT – Merck - Alemanha) a 0,1%.

As amostras foram homogeneizadas em “Stomacher” durante 90 segundos. Após diluição inicial foram realizadas diluições seriadas decimais de 10^{-2} a 10^{-4} das amostras em tubos contendo 9mL de APT a 0,1%. A partir destas diluições foi realizada a detecção de coliformes totais, coliformes fecais e a verificação da presença de *E. coli* e *Brucella* sp.

3.3 Contagem de coliformes

3.3.1 Contagem de coliformes totais

Para a contagem destes microrganismos foi utilizado o método proposto pelo USFDA (2002) com modificações. Alíquotas de 1mL das diluições, citadas em 3.2., foram colocadas em placas de Petri estéreis, as quais foram adicionadas 20mL de ágar Vermelho Violeta Bile Lactose (Violet Red Bile Lactose Agar - VRBA - Merck - Alemanha) dissolvido e resfriado a 45°C com posterior homogeneização. Após solidificação, uma sobrecamada (5mL) do mesmo meio foi adicionada. As

placas foram incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. A semeadura de VRBA foi realizada em.

Após o período de incubação, foram selecionadas as placas, que apresentavam entre 25 e 250 colônias, sendo contadas as colônias características de coliformes totais (vermelho púrpura com 0,5 mm ou mais de diâmetro, rodeados por halo avermelhado de precipitação de sais biliares).

3.3.2 Confirmação de coliformes totais

Para a confirmação de coliformes totais, foram retiradas de três a cinco colônias, de cada placa. As colônias foram inoculadas em tubos contendo Caldo Verde Brilhante (Bile 2%) (Biobrás-Brasil). Os tubos permaneceram durante 24 horas em banho a 37°C. Após este período, foram considerados positivos os tubos que apresentaram presença de gás no tubo de Durhan e turvação.

A contagem de coliformes totais foi determinada multiplicando-se o número de colônias típicas pelo inverso da diluição, sendo o resultado expresso em ufc/g de queijo.

3.3.3 Contagem de coliformes fecais

A contagem de coliformes fecais foi realizada semeando cinco colônias características (rosa intenso com ou sem presença de precipitado de sais biliares), proveniente das placas contendo ágar VRBA, em tubos contendo 10mL de caldo EC (Difco - EUA). Foram considerados positivos os tubos que apresentaram

turvação e presença de gás no tubo de Durham após 24 a 48 horas em banho a 45°C. A contagem foi determinada através do número de colônias típicas contadas pelo inverso da diluição inoculada dos tubos positivos, sendo o resultado expresso em ufc/g de queijo.

3.3.4 Isolamento de *Escherichia coli*

Os tubos positivos para coliformes fecais foram semeados em placas contendo ágar Eosina Azul de Metileno (EMB - Merck - Alemanha) e incubadas durante 24 horas a 37°C. Foram selecionadas placas que apresentaram colônias com crescimento típico de *E.coli*. De cada placa foi isolada e inoculada uma colônia típica em ágar MacConkey (Merck - Alemanha). As placas que apresentaram colônias circulares de cor rosa intenso (lactose positiva) foram semeadas em tubos contendo ágar nutriente para realização da coloração de Gram.

Colônias que apresentavam células com forma de cocobastonetes, Gram negativos, foram testadas com as provas bioquímicas: motilidade, indol, vermelho de metila, Voges-Proskauer e citrato (Citrato de Simmons - Biobrás - Brasil). Os resultados foram interpretados segundo USFDA (2002).

Após a leitura confirmatória, os isolados foram congelados em caldo BHI com adição de 15% de glicerol.

3.4 Isolamento de *Listeria monocytogenes*

O isolamento de *Listeria monocytogenes* foi realizado conforme Health and Welfare Canadá MFHPB-30 (1993), modificado.

3.4.1 Pré- enriquecimento em meio seletivo

Das amostras coletadas, foram pesadas 25 gramas de queijo, acondicionadas em sacos plásticos esterilizados, ao qual foram adicionados 225 mL de Caldo de Enriquecimento para *Listeria* (LEB) (Difco - França), para, posterior, homogeneização em “Stomacher” durante 90 segundos. (Anexo 1).

3.4.2 Isolamento de *Listeria monocytogenes* em meio sólido seletivo a partir da diluição inicial

Inicialmente, uma alíquota da diluição, após homogeneização, foi retirada para esgotamento em ágar Oxford Modificado (MOX) (Difco - França) e, outra alíquota, para esgotamento em ágar Palcam (PAL) (Merck - Alemanha). As placas foram incubadas durante 48 horas em temperatura de 35°C (Anexo 2).

3.4.3 Isolamento de *Listeria monocytogenes* em meio sólido seletivo a partir da diluição inicial após incubação

As amostras acrescidas de LEB foram incubadas durante 48 horas e 7 dias em temperatura de 30°C, para ser realizado novo esgotamento em placas

contendo ágar Oxford e ágar Palcam. As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas.

3.4.4 Isolamento das colônias características de *Listeria* sp.

Em ambos os meios, MOX e PAL, colônias que apresentaram forma esférica, com 1-3 mm de diâmetro, pretas, com halo preto referente à hidrólise de esculina, foram semeadas por esgotamento, em ágar triptose de soja acrescido de 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE) e incubadas a 30°C por 24 horas.

As placas foram examinadas sob luz oblíqua e selecionadas as colônias que apresentaram coloração azulada típica. A colônia foi transferida para tubo contendo TSA-YE inclinado e um tubo com caldo triptose de soja com 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE).

Estes tubos foram incubados a 30°C por 24 horas, a partir dos quais foram realizados os testes bioquímicos para confirmação do microrganismo.

3.4.5 Provas Bioquímicas para *Listeria monocytogenes*

Colônias que apresentaram crescimento típico foram submetidas à coloração de Gram, teste da catalase e provas bioquímicas: TSI (ágar Tríplice Açúcar e Ferro), vermelho de metila, Voges-Proskauer, motilidade, fermentação dos açúcares (manitol, ramnose, xilose) e redução de nitrato, de acordo com Mac Faddin (2001).

Nos isolados que apresentaram forma de cocobastonetes, Gram positivos, catalase positiva e perfil bioquímico compatível com *Listeria sp.* foram submetidos ao Teste de CAMP.

O Teste de CAMP foi realizado em placas contendo ágar sangue e inoculadas culturas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 49444) e *Rhodococcus equi* (ATCC 6939). Entre estas culturas, foram semeadas as culturas suspeitas de *Listeria sp.*

As culturas de *Listeria monocytogenes* produzem reação de hemólise discreta, porém nas proximidades da cultura de *Staphylococcus aureus*, o halo torna-se maior e mais nítido. Esta metodologia está de acordo com a utilizada por Farber *et al* (1994).

3.5. Isolamento de *Brucella sp.*

3.5.1 Amostragem

Para o isolamento de *Brucella sp.*, foi utilizada a diluição 10^{-4} de cada amostra preparada para o isolamento e identificação de coliformes.

3.5.2 Pré-enriquecimento em meio seletivo

Foram adicionados 200 μ L da diluição em tubos contendo 2mL de caldo *Brucella* composto por: caldo triptose de soja, acrescido de 5% de soro

eqüino e antimicrobianos: polimixina B (5U/L), bacitracina (25U/L), ácido nalidíxico (5mg/L), nistatina (100U/l) e ciclohexamida (100mg/L)).

Os tubos permaneceram em temperatura de 37°C em microaerobiose durante 48 horas.

3.5.3 Isolamento em meio sólido seletivo

Os tubos que apresentaram crescimento foram semeados em ágar *Brucella* (caldo *Brucella* acrescido com 1,5% de ágar-ágar) e incubadas a 37°C em microaerobiose durante 7 dias ou mais.

As placas que apresentaram crescimento de colônias características de *Brucella* sp. foram reisoladas em placas contendo ágar soro (agar triptose de soja acrescido de 5% de soro eqüino) e incubadas até 30 dias em temperatura de 37°C em microaerobiose. Após este período, foi realizada a coloração de Gram.

3.5.4 Provas Bioquímicas para identificação de *Brucella* sp.

As colônias que apresentaram células em forma de cocobastonetes curtos e testes da catalase e oxidase positivos, foram isoladas em tubos com ágar triptose para realização das provas bioquímicas.

As provas bioquímicas realizadas foram: redução de nitrato, produção de indol, urease em ágar Christensen (Apêndice 3) e produção de H₂S em ágar TSA com fitas impregnadas com acetato de chumbo.

3.6 Análise estatística

Os dados microbiológicos foram analisados utilizando valores em logaritmo. Foram realizadas análises da variância, Teste de t de Student, Turkey-HSD e Qui-quadrado, utilizando o programa SPSS/PC versão 8.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, USA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Tipos de queijos coletados e armazenamento

Das 80 (n=80) amostras coletadas e analisadas, sessenta e duas (78%) foram de queijos do tipo Colonial, dez (12%) tipo Provolone, seis (7%) do tipo Ricota e duas (3%) foram do tipo Caccio Cavallo. Destas amostras, cinquenta e sete (71%) não estavam sob refrigeração no momento da coleta, enquanto vinte e três (29%) estavam resfriadas no momento da coleta (Tabela 5, 6 e 7).

Foram realizadas doze coletas, sendo cinco (42%) durante o verão, quatro (33%) na primavera e três (25%) no outono.

4.2 Contagem de coliformes totais, coliformes fecais e presença de *Escherichia coli*

Todas as amostras analisadas apresentaram contagem de coliformes totais (n=80). Das 240 colônias típicas de coliformes (três colônias de cada uma das 80 amostras) selecionadas, todas foram confirmadas.

Foram isoladas 320 colônias típicas de coliformes fecais para confirmação em caldo EC. A contagem de coliformes fecais estão apresentadas nas Tabelas 5, 6 e 7.

TABELA 5: Contagem de coliformes fecais ($\log.\text{ufc.g}^{-1}$), presença de *E. coli* em queijo tipo Colonial, resfriados, coletados entre setembro de 2004 à junho de 2005.

Banca	Localização	Coliformes Fecais ($\log.\text{ufc.g}^{-1}$),	<i>E.coli</i>
01	RS 40	4,25	ausente
01	RS 40	3,35	ausente
04	RS 40	3,32	presente
10	RS 389	4,04	presente
17	RS 389	3,01	ausente
17	RS 389	3,76	presente
17	RS 389	4,20	presente
19	RS 389	4,04	presente
20	RS 389	3,51	presente
20	RS 389	4,08	ausente
21	RS 389	4,38	ausente
21	RS 389	5,08	presente
23	RS 389	3,90	presente
23	RS 389	4,04	presente
27	RS 389	3,95	presente
27	RS 389	5,00	ausente

RS 40: localizada entre Viamão-Pinhal, Rio Grande do Sul, Brasil, RS 30: localizada entre Osório-Tramandaí, Rio Grande do Sul, Brasil, RS 389: localizada entre Osório-Torres, Rio Grande do Sul, Brasil.

Cinquenta e duas amostras (84%) das sessenta e duas analisadas para coliformes fecais, apresentaram valores igual ou acima de $3,7 \log.\text{ufc.g}^{-1}$ e, dez amostras (16%) apresentaram contagem inferior. A amostra coletada da banca 27 apresentou a menor contagem, $2,77 \log.\text{ufc.g}^{-1}$.

A presença de *E. coli* foi confirmada em vinte e sete (34%) das amostras referentes a dezesseis (55%) bancas (Tabelas 5, 6 e 7). Este resultado foi semelhante ao encontrado por Silva *et al.* (2001) em pesquisa realizada em queijo tipo Frescal no estado do Rio grande do Norte. Rapini *et al.* (2002) obteve resultado inferior (10%) quando analisou queijo tipo Coalho.

Segundo os padrões microbiológicos para contagem de coliformes fecais, estabelecidos na Resolução-RDC N^o. 12, de 2 de janeiro de 2001, ANVISA, Ministério da Saúde para estes tipos de queijos ($\leq 5 \times 10^3$ ufc/g), 84% das amostras apresentaram-se acima do padrão de aceitação. Estes valores sugerem contaminação na maioria das amostras analisadas, que pode ter ocorrido desde a ordenha, durante a manipulação da elaboração dos queijos e/ou higiene inadequada durante produção e/ou no estabelecimento de venda.

O tipo de queijo analisado apresentou significância estatística ($p < 0,05$), na contagem de coliformes totais e fecais quando comparados o tipo Colonial e Provolone. O Colonial apresentou maior média na contagem de coliformes fecais e totais em relação ao Provolone.

O queijo tipo Ricota apresentou média de contagem superior ao Provolone, talvez pela maior umidade do primeiro, permitindo uma maior sobrevivência dos microrganismos. Entretanto, devido ao número de amostras analisadas ($n=6$), não foi possível assegurar a significância estatística. Logueiro & Aleixo (2001), na análise de 30 queijos tipo frescais, encontraram 93% das amostras acima dos padrões exigidos para coliformes fecais. Correia & Roncada (1997) comparado a contaminação microbiológica dos queijos, detectaram 100% dos queijos tipo frescal em condições higiênicas insatisfatórias, enquanto os queijos tipo Mussarella e Prato apresentaram 34,1% das amostras condenadas.

Os queijos que se encontravam resfriados no momento da coleta apresentaram média de $4,4 \log \text{ ufc/g}^{-1}$ na contagem de coliformes totais e $4,10 \log \text{ ufc/g}^{-1}$ na contagem de coliformes fecais, enquanto as amostras não refrigeradas apresentaram contagem de $5,3 \log \text{ ufc/g}^{-1}$ para coliformes totais e

4,5 log.ufc/g⁻¹ coliformes fecais, havendo diferença estatística (p<0,05) entre eles, ou seja, as amostras refrigeradas apresentaram contagem inferior as não refrigeradas. (Apêndice 4).

TABELA 6: Contagem de coliformes fecais (log.ufc.g⁻¹), presença de *E. coli* em queijo tipo Colonial, não refrigerados, coletados entre setembro de 2004 e junho de 2005,

Banca	Localização	Coliformes Fecais (log.ufc.g ⁻¹)	<i>E. coli</i>
02	RS 40	4,50	ausente
03	RS 40	3,41	ausente
05	RS 30	5,10	ausente
05	RS 30	5,17	presente
06	RS 30	4,07	ausente
06	RS 30	4,20	ausente
07	RS 40	4,81	presente
07	RS 40	5,07	presente
08	RS 40	4,04	ausente
08	RS 40	4,27	ausente
09	RS 40	4,32	presente
09	RS 40	5,08	presente
11	RS 389	5,04	presente
11	RS 389	5,06	presente
12	RS 389	4,32	presente
13	RS 389	5,07	ausente
14	RS 389	4,34	ausente
14	RS 389	5,04	ausente
14	RS 389	5,33	ausente
15	RS 389	4,09	presente
16	RS 389	4,44	presente
16	RS 389	5,00	presente
18	RS 389	4,34	ausente
22	RS 389	5,00	ausente
24	RS 389	5,05	ausente
24	RS 389	5,81	ausente
25	RS 389	4,79	ausente
26	RS 389	4,74	presente
29	RS 389	5,00	presente

RS 40: localizada entre Viamão-Pinhal, Rio Grande do Sul, Brasil, RS 30: localizada entre Osório-Tramandaí, Rio Grande do Sul, Brasil, RS 389: localizada entre Osório-Torres, Rio Grande do Sul, Brasil.

A estocagem de alimentos em temperatura ambiente e o resfriamento inadequado são os principais fatores que contribuem para a ocorrência de surtos de doenças de origem alimentar (Forsythe, 2002).

TABELA 7: Contagem de coliformes fecais (log.ufc/g-1), presença de *E.coli* em queijo tipo Ricota, Provolone e Caccio Cavallo, resfriados e não resfriados, coletado entre setembro de 2004 à junho de 2005.

Banca	Localização	Armazenamento	Tipo de queijo	Coliformes Fecais (log.ufc.g ⁻¹)	E. coli
04	RS 40	Resfriado	Ricota	4,00	presente
04	RS 40	Resfriado	Ricota	4,15	presente
10	RS 389	Resfriado	Ricota	5,05	ausente
28	RS 389	Resfriado	Ricota	3,79	ausente
28	Rs 389	Resfriado	Ricota	4,06	ausente
10	RS 389	não refrigerados	Caccio Cavallo	3,08	ausente
10	RS 389	não refrigerado	Caccio Cavallo	4,08	ausente
10	RS 389	não refrigerado	Provolone	3,38	ausente
10	RS 389	não refrigerado	Provolone	4,00	presente
10	RS 389	não refrigerado	Provolone	4,28	ausente
10	RS 389	não refrigerado	Provolone	4,34	ausente
21	RS 389	não refrigerado	Provolone	3,54	presente
21	RS 389	não refrigerado	Provolone	3,85	ausente
22	RS 389	não refrigerado	Provolone	3,00	ausente
22	RS 389	não refrigerado	Provolone	3,92	ausente
27	RS 389	não refrigerado	Provolone	2,77	ausente
27	RS 389	não refrigerado	Provolone	4,05	ausente

RS 40: localizada entre Viamão-Pinhal, Rio Grande do Sul, Brasil, RS 389: localizada entre Osório-Torres, Rio Grande do Sul, Brasil.

Em alimentos, o crescimento de coliformes é considerado lento a temperatura de 5°C, embora haja relatos de trabalhos que demonstram crescimento de coliformes de 3 – 6°C. Além disso, pH do meio torna-se mais ácido à medida que a temperatura aumenta (Jay, 2005). A ação acidificante das bactérias mesófilas é inibida pelas baixas temperaturas, porém proporciona o desenvolvimento de bactérias psicrótróficas que podem causar efeitos indesejáveis no leite e em seus derivados (Sorhaug & Stepaniak, 1997).

A estação do ano que a amostra foi coletada não apresentou significado estatístico na contagem de coliformes totais e fecais. Souza (2002), não constatou diferenças significativas para a maioria dos microrganismos, inclusive coliformes, em relação ao período do ano que os queijos foram analisados.

O tipo de queijo, o armazenamento e a época das coletas não apresentaram significados estatísticos ($p>0,05$) em relação à presença de *E. coli* nas amostras, entretanto, Byrne *et al.* (2003) obteve maior número de isolados de *E. coli* em queijos coletados no verão.

Quinto *et al.* (1997) observaram que, mesmo em condições inadequadas, como baixo pH (4,5), não foram suficientes para controlar o crescimento de microrganismos patogênicos entre eles a *E. coli* em queijos elaborados com leite *in natura*.

4.3 Detecção de *Listeria* sp.

Foram confirmadas quatorze colônias de *Listeria* sp. referentes a treze amostras (16%) das oitenta analisadas ($n=80$) as mesmas foram identificadas como: seis *L. innocua* (8%), cinco *L. seeligeri* (6%) e três *L. monocytogenes* (4%). Esta identificação foi realizada por testes bioquímicos demonstrados na Tabela 8.

Em onze bancas (38%) das vinte e nove ($n=29$) coletadas, foi possível o isolamento de *Listeria* sp., somente uma banca foi possível o isolamento de mais de um gênero, *L. innocua* e *L. monocytogenes* (Tabela 9).

A *L. innocua* foi a única espécie presente em todas as amostras de queijo colonial artesanal analisadas por Jantzen *et al.* (2004) na cidade de Pelotas-RS e das 75 amostras pesquisadas por Schittler (2002), foi obtido a presença desta espécie em apenas uma amostra.

TABELA 8; Resultados dos testes bioquímicos das colônias características de *Listeria* sp., isoladas das amostras de queijos produzidos artesanalmente, coletados em bancas da RS 40 (Viamão-Pinhal) e RS 389 (Osório-Torres) no período entre setembro/2004 e junho/2005

Amostra	LEB	Mot	Cat	Ni	VM	VP	R	X	M	hemólise	CAMP		<i>Listeria</i>
											<i>S.aureu</i>	<i>R.equi</i>	
4	7 dias	caract	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	<i>innocua</i>
4	48h	caract	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	<i>innocua</i>
5	48h	caract	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	<i>monocytogenes</i>
6	48h	caract	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	<i>innocua</i>
7	48h	caract	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	<i>innocua</i>
9	48h	caract	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	<i>innocua</i>
11	7 dias	caract	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	<i>monocytogenes</i>
20	48h	caract	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	<i>monocytogenes</i>
59	48h	caract	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>seeligeri</i>
63	48h	caract	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>innocua</i>
65	*	caract	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>seeligeri</i>
69	48h	caract	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>seeligeri</i>
70	48h	caract	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>seeligeri</i>
73	48h	caract	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>seeligeri</i>

LEB: tempo de incubação das amostras no caldo de Enriquecimento para *Listeria*; mot: teste de motilidade; cat: teste de catalase; ni: teste de redução do nitrato; VM: teste do Vermelho de Metila; VP: teste Voges-Proskauer; R: degradação da Ramnose; X: degradação da xilose, M: degradação do manitol,

Schwab *et al.* (1996) ao analisar queijos do tipo colonial comercializados em Porto Alegre-RS, encontraram 30% de positividade para *L. innocua* e 2% para *L. monocytogenes*.

A presença destes três gêneros de *Listeria* sp. indica que os produtos analisados ou suas matérias primas não foram submetidos aos procedimentos higiênico-sanitários e tecnológicos adequados ou, ainda, foram contaminados após seu processamento. Murray *et al.* (1995) comentam que a presença de *L. innocua* no queijo ou em qualquer alimento não representa risco

a saúde do consumidor, tendo em conta que a *L. monocytogenes* é considerada a única, deste gênero, patogênica ao homem.

Segundo Waldroup, (1996), a presença de qualquer espécie de *Listeria* sp. pode ser indicativo de *L. monocytogenes* ainda que não isolada. Isto pode ser explicado pelo fato desta espécie ser menos competitiva que as outras do seu gênero em qualquer meio de cultura e especialmente em presença de alguns agentes seletivos.

TABELA 9; Espécies de *Listeria* sp. isoladas das amostras coletadas entre setembro de 2004 à junho de 2005.

Banca	Localização	Armazenamento	Tipo de Queijo	Incubação LEB	<i>Listeria</i>
01	RS 40	Resfriado	Colonial	48 horas	<i>innocua</i>
04	RS 40	Resfriado	Colonial	48 horas	<i>innocua</i>
04	Rs 40	Resfriado	Colonial	7 dias	<i>innocua</i>
04	RS 40	Resfriado	Ricota	48 horas	<i>monocytogenes</i>
04	RS 40	Resfriado	Ricota	7 dias	<i>monocytogenes</i>
10	RS 389	Resfriado	Ricota	48 horas	<i>monocytogenes</i>
03	RS 40	não refrigerado	Colonial	7 dias	<i>innocua</i>
05	RS 30	não refrigerado	Colonial	48 horas	<i>innocua</i>
11	RS 389	não refrigerado	Colonial	48 horas	<i>seeligeri</i>
15	RS 389	não refrigerado	Colonial	48 horas	<i>innocua</i>
18	RS 389	não refrigerado	Colonial	48 horas	<i>seeligeri</i>
21	RS 389	não refrigerado	Provolone	48 horas	<i>seeligeri</i>
24	RS 389	não refrigerado	Colonial	48 horas	<i>seeligeri</i>
29	RS 389	não refrigerado	Colonial	s/incubação	<i>seeligeri</i>

RS 40: localizada entre Viamão-Pinhal, RS 30: localizada entre Osório-Tramandaí, RS 389: localizada entre Osório-Torres, Rio Grande do Sul, Brasil. LEB: caldo de enriquecimento *Listeria*.

Os critérios microbiológicos de avaliação no Reino Unido em 1996, consideram a *Listeria* sp. como microrganismo indicador, em produtos como queijo e carnes, classificado como satisfatório quando não detectado em 25g/alimento.

Dos queijos analisados que apresentaram *Listeria* sp., dez amostras (13%) eram do tipo Colonial, três (4%) do tipo Ricota e uma (1%) do tipo Provolone (Tabela 9). Estes resultados não apresentaram valor estatístico considerável, apesar da *Listeria* ter sido detectada em um maior número de amostras de queijo tipo Colonial. Além disso, as amostras em que foram

isoladas *L. monocytogenes*, eram do tipo Ricota. Este resultado vai ao encontro com os obtidos por Faber & Peterkin (1991), que relacionam surtos de listeriose, principalmente, em queijos com alto teor de umidade.

Os resultados obtidos por Silva *et al.* (1998), em diferentes tipos de queijos, apontaram a maior incidência de *L. monocytogenes* em queijo Minas Frescal (41,17%), sugerindo que, no presente estudo, se o número de amostras de queijos com alto teor de umidade fosse aumentado, provavelmente elevaria o número de isolados de *L. monocytogenes*.

Os mesmos autores encontraram maior incidência de *L. innocua* em queijo tipo Gorgonzola (13,2%), levando em consideração o teor de umidade deste tipo de queijo, este resultado vai ao encontro do evidenciado neste trabalho.

Oito amostras (10%), das oitenta analisadas, não estavam em refrigeração e cinco (6%) estavam resfriadas no momento da coleta, não considerado significativo na análise estatística pelo número de amostras que confirmaram *Listeria* sp. e, o tipo de armazenamento. Entretanto, as três amostras, que foram confirmadas a presença de *L. monocytogenes*, estavam conservadas sob refrigeração no momento da coleta. Resultados descritos por Papageorgio *et al.* (1996), apontam a capacidade de crescimento, multiplicação e manutenção da *Listeria* sp. quando inoculada em queijos mantidos em baixas temperaturas.

Sete (50%) dos isolados foram detectados em amostras coletadas na primavera, seis (43%) no outono e uma (7%) foi isolada em amostra coletada durante o verão (Tabela 9). As estações do ano influenciaram no isolamento de *Listeria* sp ($p < 0,05$), sendo a primavera considerada a estação

do ano com maior e o verão com menor número de isolados. Tem sido demonstrado, que a temperatura ambiental e mesmo a localização geográfica influenciam na detecção de *Listeria* sp. Em queijos. Locais ou épocas com temperaturas mais amenas seriam mais propícias para multiplicação ou sobrevivência deste gênero. (Pianta *et al.* 2004).

Das 14 colônias isoladas, onze colônias foram de amostras com LEB incubado durante dois dias, duas em LEB incubado durante sete dias e uma isolada do LEB sem incubação (Tabela 9). Harvey & Gilmour (1993) relatam que, a incubação do LEB durante sete dias não aumentou o número de amostras positivas para *Listeria* sp. Quando comparadas com o período de 24 horas. Porém, Meurier & Terplan (1993) encontraram uma amostra de queijo duro positiva após sete dias de incubação e não encontraram em 24 horas de incubação em LEB.

O baixo número de isolados em amostra inoculada em LEB sem incubação estão de acordo com resultados obtidos por outros autores, os quais observaram que a técnica de semeadura direta do caldo seletivo em meio sólido seletivo não apresenta resultados satisfatórios (Smith & Archer, 1988; Yu & Fung, 1991; Serafini, 1992).

Alguns fatores afetam a sobrevivência da *Listeria* sp., tais como umidade, pH, temperatura e a presença de outros microrganismos. Erkmen (2000) encontrou valores maiores de *L. monocytogenes* em queijos quando não adicionou culturas iniciadoras, manteve em baixa temperatura e inoculou maior número de microrganismos. O ácido láctico e a presença de bactérias ácido lácticas viável provavelmente, contribuem para inibição do microrganismo (Hicks & Lund, 1991).

Os diferentes tempos de incubação aumentaram a probabilidade de detecção, pois o fator temperatura, pode ter diminuído o crescimento de outros microrganismos presentes na amostra, facilitando o isolamento. Em relação à temperatura utilizada para a incubação destas amostras, segundo Yu & Fung, (1991), amostras incubadas a menos de 25°C, apresentam maior probabilidade de isolamento de *L. monocytogenes*, diferentemente de diversos microrganismos competidores, o que causaria sua inibição.

Vários problemas são encontrados na interpretação de *L. monocytogenes* em alimentos e em amostras ambientais quando utilizada a microbiologia clássica. Em vista desta dificuldade, um resultado negativo não assegura a ausência de *Listeria*. Destro *et al.* (1991) detectaram a presença de *L. monocytogenes* em 10% das amostras de queijo Minas, enquanto Casarotti *et al.* (1994) e Vieira *et al.* (1993) não encontraram *Listeria* sp. neste mesmo tipo de queijo. Essa discordância de resultados é causada, provavelmente, devido aos diferentes métodos e meios de cultura empregados em cada pesquisa.

4. Detecção de *Brucella* sp.

Foram isoladas doze cepas suspeitas de *Brucella* sp., referentes a 15% das amostras, que não foram confirmadas pelas provas bioquímicas.

Foi possível a identificação de *Pseudomonas aeruginosa* nas amostras referentes à banca 23, localizada na RS 389. Os testes bioquímicos para confirmação e os resultados obtidos, estão descritos no Anexo 5.

O não isolamento de *Brucella* sp., nas amostras analisadas, não representa a segurança das amostras coletadas. Frequentemente, a presença de altas contagens de microrganismos competidores, como observado neste trabalho, pode dificultar o isolamento em amostras de alimentos. Este microrganismo não sobrevive por muito tempo com a acidificação do queijo. Em queijo maturado, após inoculação artificial da *Brucella* sp., não foi possível o isolamento após dois dias. Estes resultados propõem que, a sobrevivência deste microrganismo em alimentos é variável, sendo influenciada principalmente pela acidificação do meio, que atua negativamente sobre o microrganismo (Marth & Steele, 1998)

Metabólitos inibidores produzidos pela microbiota presente nas amostras, também dificultar o isolamento de *Brucella* sp. Estes metabólitos, podem ter afetado negativamente a recuperação e o crescimento da *Brucella* sp., bem como, a depleção de nutrientes, redução do potencial de oxidação-redução e alteração no pH (Diaz Cinco *et al.*, 1994).

A ação das bactérias lácticas inibe o desenvolvimento de diversos microrganismos indesejáveis e patogênicos nos alimentos e, assim, além de lhes conferir características sensoriais desejáveis, estendem a sua vida útil e melhoram a sua qualidade microbiológica (Santos, 1993).

Um estudo de Mead *et al.* (1999) mostrou que, 50% dos 1554 casos de brucelose analisados nos Estados Unidos, foram de origem alimentar. Pesquisas realizadas em manteiga, sorvete e queijos frescos, foi possível o isolamento de *Brucella* sp., permanecendo viável por diversos meses nestes alimentos (Marth & Steele, 1998).

Outro fator determinante em relação ao isolamento de *Brucella* sp. em alimento é a temperatura de manutenção das amostras. Por exemplo, e, leite contaminado artificialmente com *Brucella* sp., estes microrganismos não foram isolados após três dias de armazenamento à 25-37°C. No entanto, sobreviveram 800 dias quando armazenados à 4°C. O desenvolvimento de outros microrganismos, facilitado pelas temperaturas mais altas e, conseqüentemente, acidificação do produto, são os responsáveis por este resultado (Diaz Cinco *et al.*, 1994).

Portanto, a presença de coliformes totais e fecais, a confirmação de *Escherichia coli* e de *Listeria* sp., possibilita que outros patógenos possam estar presentes, incluindo a *Brucella* sp., nas amostras analisadas, mas estes, além da microbiota do queijo, podem ter influenciado negativamente sobre o microrganismo

5. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho mostram que, em relação a coliformes fecais, 84% das amostras apresentaram condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, de acordo com o padrão legal vigente, indicando sua contaminação direta ou indiretamente com material fecal, sendo classificado como produto impróprio para o consumo.

O isolamento de *Listeria monocytogenes* nas amostras analisadas indica que estas estão impróprias para o consumo, e, ainda, estes tipos de queijo tornar-se um problema de saúde pública principalmente para os grupos de risco, recomendando-se cautela no consumo desse produto, quando não se conhece a origem do mesmo.

Mesmo utilizando enriquecimento seletivo, não foi possível o isolamento de *Brucella* sp., entretanto, não é possível afirmar a ausência deste microrganismo das amostras.

Os resultados das análises demonstram a necessidade de orientar pequenos produtores a importância das normas básicas de higiene durante todo o processo de produção e, ainda, não permitir a comercialização de produtos sem a

devida fiscalização, a fim de que os produtos cheguem ao consumidor com boas características sanitárias.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, L.A. et al. Variação das características físico-químicas e microbiológicas das salmouras empregadas na salga durante o período de sua utilização. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 136-142, 1992.
- ALTON, G.G, JONES, L.M, ANGUS, R.D., VERGER, J.M. **Techniques for the brucellosis laboratories**. Paris,1988, 190p.
- ARAÚJO, W.N. et al. Determinação do nível de contaminação por coliformes totais no queijo Minas comercializado na região metropolitana de Salvador-Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 2, p. 5-9, 2000.
- ARELLANO-REYNOSO, B. et al. Intracellular trafficking study of a RB51 *B. abortus* vaccinal strain isolated from cow milk. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 98, p. 307-312, 2004.
- BALDUINO, R.; OLIVEIRA, A.S.; HAULY, M.C.O . Influência da fonte de carbono e da temperatura sobre a fermentação láctica desenvolvida por cultura mista de bactérias lácticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, p. 363-369, 1999.
- BARROW, G.I.; FELTHAM, R.K.A. **Cowan and Stell's manual for the identification of medical bacteria**. 3 ed..Londres, Cambridge Univerity Press, 1993.
- BERESFORD, T.P. et al. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, p. 259-274, 2001
- BORELLI, B.M. et al. Perfil microbiológico do queijo minas curado produzido na região do Serro da Canastra-MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17, 2000, Fortaleza-CE. **Resumos**. Fortaleza-CE: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 1, 491p., 2000.
- BOTTAZZI, V. et al. Germinazione delle spore di Clostridium ed azione del lisozima in formaggio grana. **Scienza e Técnica Lattiero-casearia**, v. 44, n. 2, p. 79-96, 1993.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária, Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Portaria nº 451. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 8-15, 22 de set., 1997.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução**: RDC nº 12. de 02 de janeiro de 2001. Aprova o: Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 15 jun. 2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretária de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. **Manual técnico do Programa de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT**, Brasília, 2003. 130p.
- BRICKER, B. Diagnostic strategies used for the identification of *Brucella*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, p. 433-434, 2002.
- BYRNE, C.M. et al. Characterization of *E. coli* O157:H7 from downer and healthy dairy cattle in upper Midwest region of the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 4683-4688, 2003.
- CAMACHO, L.; SIERRA, C. Diagnostico sanitario y tecnológico del proceso artesanal del queso fresco da cabra en Chile. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v. 38, n. 4, p. 935-945, 1988.
- CASAROTTI, V.T.; GALLO, C.R.; CAMARGO, R. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo minas Frescal comercializados em Piracicaba- **Arquivo Latino Americano de Nutrição**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 158-163, 1994.
- CLIVER, D.O. **Foodborne diseases**. [s]: Academic Press, 1990. 395p.
- CLOECKAERT, A. et al. Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. **Microbes and Infection**, Paris, v. 5, p. 593-602, 2003
- CORREIA, M., RONCADA, M.J. Características microscópicas de queijo Prato, Mussarela e Mineiro comercializado em feiras livres da Cidade de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 3, 1997.
- DE GIORI, G.S. Microflora of Tafi Cheese: changes during manufactures and maturation. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 46, p. 518-521, 1983.
- DESTRO, M.T.; SERRANO, A.M.; KABUKI, D.Y. Comparison of two plating media for the isolation of *Listeria sp.* from some brazilian dairy and meat products. **Reviews Microbiology**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 256-259, 1992.

- DIAZ CINCO, M.E. et al. Survival of *Brucella abortus* in the Mexican White cheese processing. **Dairy Food Environmental**, Londres, v. 14, p. 608, 1994.
- DONNELLY, C.W. et al. *Listeria* In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F., **Compedium of methods for the microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington: American Public Health Association, 1992, p. 637-663, Cap. 38.
- DONTOROU, A. et al. Isolation of a rare *Escherichia coli* O157:H7 strain from farm animals in Greece. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Oxford, v. 27, p. 201-207, 2004.
- ECK, A. **El queso**. Barcelona: Omega, 1990. 490p.
- EL SODA, M.A. The role of lactic acid bacteria in accelerated cheese ripening. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 12, p. 239-252, 1993.
- ERKMEN O. Inactivacion kinetics of *Listeria monocytogenes* in Turkish White cheese during the ripening period. **Journal of Food Engineering**, Londres, n. 46, p. 127-131, 2000.
- ESTEPAR, J. Biochemical and microbiology characterization of artisanal "Peñamellera" cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, Barking, v. 9, p. 737-746, 1999.
- FARBER, J.M, PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a Foodborne Pathogen. **Microbiological Reviews**, Ottawa, v. 55, p. 476-511, 1991.
- FARBER, J.M., WARBURTON, D.W., BABIUK, T. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. Canadá. **Health Protection Branch- MFHPB-30 Governmanet of Canadá**, Toronto, p.16-21, 1994.
- FEITOSA, T. **Estudos tecnológicos, físico-químico, microbiológico e sensorial do queijo coalho do Ceará**. 1985. 96p. Dissertação (Mestrado)-Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- FLORENTINO, E.S.; MARTINS, R.S. Características microbiológicas de queijo coalho produzido no estado da Paraíba. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 59, p. 43-48, 1999.
- FONTÁN, M.C.G. Microbiological changes in "San Simón" cheese throughout ripening and its relationship with physico-chemical parameters. **Food Microbiology**, Londres, v. 18, p. 25-33, 2001.

- FORSYTHE, S.J. Microrganismos causadores de doenças de origem alimentar. In: **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed 2000, p. 155-204.
- FOX, P.F. *et al.* **Cheese**: chemistry, physics and microbiology. 2. ed. London: Chapman & Hall, 1993. 601p.
- FOX, P.F. *et al.* **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. 587p.
- FRANCO, B.D.G.H. & LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.
- FREITAS, J.A, SANTOS, E.J.C., OLIVEIRA, J.P. Isolamento de *Brucella* sp. em Produtos de Origem Animal e Significado em Saúde Pública. **Revista Ciências Agrárias**, Belém, n. 37, p. 147-154, 2002
- FURLANETTO, S.M.P.; SANTOS, M.A.A., HARA, C. *Listeria* spp. Avaliação da eficiência de quatro meios de plaqueamento no seu isolamento. **Higiene Alimentar**, São Paulo, n. 10, v. 46, p. 30-34, 1996.
- FURTADO, M.M.; FERREIRA, C.L.L.F.; CHAVES, J.B.P. Queijo prato fabricado com culturas lácticas isoladas de leite cru e soro de queijo artesanal de região do Serro, Minas Gerais. **Revista de Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 45, p. 14-17, 1992.
- GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimento**. São Paulo: Varela, 2001. 629 p.
- GILBERT, R.J. Zero tolerance for *Listeria monocytogenes* in foods. Is it necessary or realistic? In: **XII International Symposium on Problems of Listeriosis**. p. 351-356. Perth Western, Austrália, 1995.
- GRAPPIN, R.; BEUVIER, E. Possible implication of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 7, p. 751-761, 1997.
- HAJDENWURCEL, J.R. Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) na Indústria de Laticínios. **Revista de Indústria de Laticínios do Instituto Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 52, n. 5, p. 37-39, 1997.
- HALLING, S.M.; BOYLE, S.M. Foreword. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, p. 1-3, 2002.
- HALLING, S.M. & YOUNG, E.J. *Brucella* In: Y.H.HUI *et al.* (ed) **Foodborne disease handbook**, New York, Marcel Dekker Inc, 1994, n.6, v. 1.

- HAMDY, M.E.R.; AMIN, A.S. Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. **The Veterinary Journal**, Londres, v. 163, p.299-305, 2002.
- HARVEY, J.; GILMOUR, A. Occurrence of *Listeria* sp. in raw milk and dairy products produced in Northern Ireland. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 72, p. 119-125, 1992.
- HAYES, P. et al. The *Listeria* study group. Comparison of three selective enrichment methods for the isolation of *Listeria monocytogenes* from naturally contaminated foods. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 5, n. 12, p. 952-959, 1992.
- HICKS, S.J.; LUND, B.M.; The survival of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 70, p. 308-314, 1991.
- HOLKO, I. et al. Virulence markers of *E. coli* strains isolated from traditional cheese made from unpasteurised sheep milk in Slovakia. **Food Control**, Guildford, v. 36, p. 154-162, 2005.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods), v.5, Microorganisms in Foods. Microbiology Specification of Foods Pathogens. Blackie Academic & Professional, Londres, 1996.
- IDE, L.P.A.; BENEDET, H.D. Contribuição ao conhecimento do queijo colonial produzido na região serrana do estado de Santa Catarina. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1351-1358, 2001.
- JANTZEN, M.M. Bactérias potencialmente enteropatogênicas em queijo e carnes moídas comercializadas em Pelotas-RS In: SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR: ACESSO, EDUCAÇÃO E QUALIDADE, 2004-Gramado RS. **Anais**, SBCTA-RS, 2004.
- JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 712p.
- JENSEN, A. *Listeria monocytogenes* isolation from human faecal specimens: experiments with the selective media, Palcam and L-Palcamy. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 16, p. 32-35, 1993.
- JO, M.Y. et al. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* O157 from major food animals in Korea. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 95, p. 41-49, 2004.
- JONHSON, J.L.; DOYLE, M.P. e CASSENS, R.G. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products: a review. **Journal Food Protect**, Ames, v. 53, p. 81-91, 1990.

- KO, J.; SPLITTER, G.A. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, p. 65-78, 2003.
- KOHANN, K.L. et al. Production of proteases by psychrotropic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, p. 3275-3283, 1991.
- LANDGRAF, M. Novos patógenos de interesse em alimentos. **Boletim do SBCTA**, v. 31, n. 15-7, 1997.
- LANGONI, H. et al. Isolation of *Brucella* spp. from milk of brucellosis positive cows in São Paulo and Minas Gerais states. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.37, p.15-25, 2000.
- LEAL-KLEVEZAS, D.S. et al. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 12, p. 3087-3090, 1995.
- LECLERC, V. et al. Pathogens in meat and milk products: surveillance and impact on human health in France. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 76, p. 195-202, 2002.
- LECLERCQ, A.; WANEGUE, C.; BAYLAC, P. Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1631-1638, 2002.
- LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; TZANETAKI, N. Microbiological study of white-brined cheese made from raw goat milk. **Food Microbiology**, Londres, v. 9, p. 13-19, 1992.
- LOGUERCIO, A.P., ALEIXO, J.G. Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 6, p. 15-29, 2001.
- LÓPEZ-DÍAZ, T.M. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. **Food Microbiology**, Londres, v. 17, p. 23-32, 2000.
- LUNA-MARTÍNEZ, J.; MEJÍA-TERÁN, C. Brucellosis in Mexico: current status and trends. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, p. 19-30, 2002.
- MACFADDIN, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3 ed.** Baltimore: Williams & Wilkins, 2001. 625p.
- MCLAUCHLIN, J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. **Food Control**, Guildford, v. 7, n. 4/5, p. 187-193, 1996.

- MCLAUHLIN, J. The identification of *Listeria* species. **Internacional Journal Food Microbiology**, Londres, v. 38, p. 77-81, 1997
- MADRID, A, CENTANO, I., VICENTE, J.M. **O queijo: elaboração e tipos**. São Paulo: Varela, 1986. 168p.
- MAGRO, M.L. et al. Las bacteriocinas de las bacterias lacticas 1: Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección. **Alimentaria**, Madrid, v. 37, p. 59-66, 2000a.
- MAGRO, M.L.M. et al. Las bacteriocinas de las bacterias lacticas 1: Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección. **Alimentaria**, v. 37, p. 67-74, 2000b.
- MARAKCHI, A. et al. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products produced or imported into Marrocos. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 56, n. 3, p. 256-259, 1993.
- MEAD, P.S. et al. Food-related illness and death in United States. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 119, p. 65-82, 1999.
- MEDINA, M.L.R. Microbiology study of León raw cow-milk cheese, a Spanish craft variety. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 57, p. 998-1006, 1995.
- MEIER, R.; TERPLAN, G. Investigation of cheese and other foodstuff samples with the *Listeria*-Tek ELISA. **Letters in Applied Microbiology**, Londres, v. 17, p. 97-100, 1993.
- METIN, A. et al. Cutaneous findings encountered in brucellosis and review of the literature. **International Journal of Dermatology**, Filadélfia, v. 40, p. 434-438, 2001.
- MELCHÍADES, L.E.A. Produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* isolados de mastite subclínica bovina. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 48, n. 288, p. 80, 1993.
- MOR-MUR, M. Microbiology changes during ripening of Cendrat del Montsec, a goat's milk cheese. **Food Microbiology**, Londres, v. 11, p. 177-185, 1994.
- MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYÓN, I. *Brucella* evolution and taxonomy. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, p. 209-227, 2002.
- MOURA, S.M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D.G.M. Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 19, p. 229-237, 1993.

- MUIR, D.D. The fresh-life of Dairy products: Factors influencing raw milk and fresh products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 49, p. 24-32, 1996.
- MURRAY, P.R. et al. **Manual of clinical microbiology**. 6. ed. Washington: American Society for Microbiology Press, 1995. 320p.
- NATH, K.R. Cheese. In: HUI, Y. H. **Dairy science and technology handbook**. New York: VCH Publishers, 1993, v. 2, p. 161-255.
- NHUCH, E.L. **Estudio bioquímico del proceso madurativo del queso de San Simon da Costa elaborado por procedimientos artesanales e industriais com vistas a la mejora de su tecnologia de fabricacion**. Léon, 2000. 147p. Tese (Doutorado)- Departamento de Higiene y Tecnologia de los Alimentos, Universidad de Léon.
- OCHOLI, R.A. et al. Phenotypic characterization of *Brucella* strains isolated from livestock in Nigeria. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 103, p. 47-53, 2004.
- OLIVEIRA, S.C., SOEURT, N. SPLITTER, G. Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* and host immune responses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, p. 417-424, 2002.
- OLIVEIRA, S.J. de. **Microbiologia Veterinária: guia bacteriológico pratico**. 2 ed. Canoas: Ed. ULBRA, 2000. 120p.
- OXOID. **Manual oxoid**. Hampshire: Unipath, 1995. 389p.
- PAIVA, M.S.D.; CARDONHA, A.M.S. Queijo de coalho artesanal e industrializado produzidos no Rio Grande do Norte: estudo comparativo da qualidade microbiológica. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 61, p. 33, 1999
- PAPAGEORGIOU, D.K.; MARTIN, E.H. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening and storage of feta cheese. **Journal Food Protect**, Ames, v. 52 n. 2, p. 82-87, 1996.
- PEREIRA, M.L. et al. Avaliação de ensaio analítico para detecção de coliformes fecais em queijo Minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 51, n. 5, 1999.
- PIANTA, C. et al. Presença de *Listeria* sp. em queijo artesanal tipo colonial no Rio Grande do Sul. **Veterinária em Foco**, Canoas, v. 2, n. 1, p. 5-14, 2004
- PIARD, J.C.; DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria- 1.Oxygen metabolites and products from catabolism. **Lait**, v.71, p.525-541, 1991

- PINNER, R.W. et al. Role of foods in sporadic listeriosis. Microbiologic and epidemiologic investigation. **Journal American Medical Association**, Chicago, v. 267, p. 2046-2050, 1992.
- POESTER, F.P., GONÇALVES, V.S.P.; LAGE, A.P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, p. 55 – 61, 2002.
- PRADO, C.S. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de embutidos carneos frente a *L. monocytogenes*. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, p. 417-423, 2000.
- QIONGZHEN LI, J.; SHERWOOD, S.; LOGUE, C.M. The prevalence of *Listeria Salmonella*, *Escherichia coli* e *Escherichia coli* O157:H7 on bison carcasses during processing. **Food Microbiology**, Londres, v. 21, p. 791-799. 2004.
- QUINTO, E.J.; CEPEDA, A. Incidence of toxigenic *Escherichia coli* in soft cheese made with raw or pasteurized milk. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, n. 24, p. 291-295, 1997.
- RAPINI, L.S., FEIJÓ, L.D., JAMAIRA, F.V., NASCIMENTO, K.F. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Listeria* sp. e *Staphylococcus* sp. E detecção de enterotoxinas estafilocócicas em queijo tipo coalho. **Resumos. XIX Congresso Nacional de Lactícínios**, Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p. 60-64, 2002.
- RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis and food safety**. New York: Marcel Dekker, 1991. 631 p.
- RYSER, E.T. Public health concern. In: MARTH, E.H; STEELE, J. **Applied dairy microbiology**. New York: Marcel Dekker, 1998, 520p.
- ROCOURT, J.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes* In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food microbiology, fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 1997, p. 337-351.
- ROJAS, N. et al. Comparison of antibody response in adult cattle against different epitopes of *Brucella abortus* lipopolysaccharide. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlim, v. 48, p. 623-629, 2001.
- ROLFE, D.C.; SYKES, W.E. Monitoring of dairy herds for *Brucella abortus* infection when prevalence is low. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 64, p. 97-100, 1987.
- ROMERO, C. et al. Evaluation of PCR and indirect enzyme-linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 3198-3200, 1995.

- SALGADO, E.A. et al. Estudio de brucelosis a partir de muestras de leche de bovinos en el trópico subhúmedo del Estado de Guerrero. **Veterinaria Mexico**, México, v. 26, p. 359-363, 1995.
- SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F. Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 88, p. 13-19, 2001.
- SCHITTELER, L.; et al. Avaliação de incidência de *L monocytogenes* em queijos coloniais. **Resumos**. XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre. Anais 2002.
- SCHOLZ, W. **Elaboracion de quesos de oveja y cabra**. Zaragoza: Acribia, 1997. 145p.
- SCHUCH, D.M.T. et al. Haemolytic reation of *Listeria monocytogenes* on bilayer Columbia Agar plates with defibrinated guinea-pig blood. **Letters In Applied Microbiology**, Londres, v. 15, p. 78-79.
- SCHWAB, J.P.; BECHTEL, M.A.B.; SCHUCH, D.M.T. *Listeria monocytogenes* em queijo colonial artesanal comercializado em Porto Alegre. **Arquivo da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v. 24, n. 1, p. 95-106, 1996.
- SCOTT, R. **Frabricacion de queso**. Zaragoza: Acribia. 1991, 176p.
- SERAFIN, A B. ***Listeria* sp.: comparação entre as metodologias de isolamento em produtos cárneos comercializados em supermercados comercializados na cidade de Gioânia, Goiás**. 1992, 210p. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, USP, São Paulo.
- SMITH, J.L.; ARCHER, D.L. Heat-induced injury in *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Microbiology**, Amsterdam, v. 3, p. 105-110, 1988.
- SILVA, M.C.D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 61, n .3, p. 354-356, 1998.
- SILVA, M.C.D.; VILARDI, T.C C, TIBANA, A. Avaliação de Métodos para detecção de *Listeria* em queijos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 2, 1998.
- SILVA, W.P. et al. Aspectos higiênicos da fabricação artesanal de Mussarela. **Revista de Pesquisa e Pós-Graduação**, Erechim, v. 1, p. 31-44, 2000.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela. 1997. 317p.

SILVA, J.V. et al. Monitoramento da qualidade microbiológica de queijos tipo minas frescal fabricados artesanalmente. **Revista Indústria de Laticínios do Instituto Cândido Tostes**, Juiz de Fora, n.34, p. 71-75, 2001.

SIPPY, N. et al. Rapide electrochemical detection and identification of catalase positive microorganisms. **Biosensors and Bioelectronics**, Essex, v. 18, p. 741-749, 2003.

SOBERÓN-MOBARAK, A. et al. Absence of shedding of two *B. abortus* strains in goats after vaccination with live vaccines. **Vaccine**, Kidlington, v. 18, p. 3018-3020, 2000.

SOBRINO, O.J. et al. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausages. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 13, p. 1-10, 1991.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 8, p. 35-40, 1997.

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

SOUZA, C.F.V. **Evolução das características microbiológicas durante a elaboração e maturação do queijo Serrano**. Porto Alegre, 2002. 139p. Dissertação (Mestrado) - Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

STRACHAN, N.J.C.; FENLON, D.R.; OGDEN, I.D. Modelling the vector pathway and infection of humans in an environmental outbreak of *Escherichia coli* O157. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 203, p. 69-73, 2001.

TANIWAKI, M.H.; Van DENDER, A.G.F. Occurrence of toxigenic molds in Brazilian cheese. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 55, n. 3, p. 187-191, 1992.

- TORNADIJO, M.E. Study of Enterobacteriaceae during the manufacture and ripening of San Simón cheese. **Food microbiology**, Londres, v. 18, p. 499-504, 2001.
- TRAN, T.T; HITCHINS, A.D. Evaluation of selective enrichment most probable number enumeration method for viable *Listeria* sp. in dairy products. **Journal Food Protection**, Iowa, v. 59, n. 9, p. 928-931, 1996.
- TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: UFSM, 1997. 380p.
- U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION. Center for Food safety & Applied Nutrition. **Bacteriological analytical manual online**. Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. Rockville, 2002. Disponível em: [http:// www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov). Acesso em: 20/05/2005.
- U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION. Center for Food safety & Applied Nutrition. **Bacteriological analytical manual online**. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods, Rockville, 2003. Disponível em: <http:// www.cfsan.fda.gov>. Acesso em: 12/03/2004.
- VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium for the microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219p.
- VIEIRA, A.B. et al. Comportamento de *L. monocytogenes* em queijo minas frescal. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. **Resumos**. Santos, 1993.
- VIEIRA, A.P. et al. Caracterização de queijos coloniais comercializados em feiras livres da cidade de Pelotas-RS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17, 2000, Fortaleza-CE. **Resumos**. Fortaleza. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal do Ceará, v. 1, p. 4.85, 2000.
- VIZCAÍNO, N. et al. DNA polymorphism in the *omp25/omp31* family of *Brucella* spp.: identification of a 1.7-kb inversion in *Brucella cetaceae* and of a 15.1kb genomic island, absent from *Brucella ovis*, related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide. **Microbes and Infection**, Paris, v. 6, p. 821-834, 2004.

- YU, L.S.L.; FUNG, D.Y.C. Evaluation of FDA and USDA procedures for enumerating *Listeria monocytogenes* in ground beef. **Food Microbiology**, Londres, v. 8, p. 69-74, 1991.
- YU, L.S.L.; PRASAI, R.K.; FUNG, D.Y. C. Most Probable Numbers of *Listeria* species in raw meats detected by selective mobility enrichment. **Journal Food Protection**, Iowa, v. 58, n. 9, p. 943-945, 1995.
- WALDROUP, A.L. Contamination of raw poultry with pathogens. **World's Poultry Science**. Londres, v. 52, p. 7-25, 1996.
- WALLACH, J.C.; Urban outbreak of *Brucella melitensis* infection in an Argentina family: clinical and diagnostic aspects. **FEMS Immunol Med. Microbiol**, n. 8, p. 49-56, 1994.
- WEGNER, W. Relatório prático sobre a elaboração dos queijos Estepe e Montanheses com características de Emmenthal e Gruyere em queijarias do Rio Grande do Sul no período de 1980-1983. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 42, p. 29-38, 1987.
- WERNARS, K. et al. Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. **Journal of Applied Bacteriology**, Londres, v. 70, p. 121-126, 1991.
- ZIGMUNT, M.S. et al. Single-step and evaluation of recombinant BP26 protein for serological diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 87, p. 213-220, 2002.

7. ANEXOS

ANEXO 1

Meio de cultura utilizado no pré-enriquecimento seletivo no isolamento de *Listeria monocytogenes*.

Caldo LEB: Caldo de enriquecimento para *Listeria*

Proteose Peptona	17,0g
Extrato de Levedura	6,0g
Cloreto de Sódio	5,0g
Fosfato dipotássico	6,0g
Cicloeximidina	0,05g
Acriflavina	0,015g
Ácido nalidíxico	0,04g
Água destilada	1000mL

Dissolver os reagentes, distribuir em Erlenmeyer e autoclavar a 121°C, por 15 minutos (pH final: 7,4 ± 0,2).

ANEXO 2

Meios de Cultura sólidos seletivos utilizados no isolamento de
Listeria monocytogenes.

1) Ágar Oxford Modificado (MOX)

1.1) Meio Base Oxford

Ágar Base Columbia	39,0g
Esculina	1,0g
Citrato Férrico de Amônia	0,5g
Cloreto de lítio	15,0g
Agar	2,0g
Água destilada	1000mL

Dissolver os reagentes, autoclavar 121°C por 15 minutos
(pH final: 7,0 ± 0,2).

1.2) Suplemento Seletivo Listeria (MOX) (g/500mL) Código:SR 157

Colistina	5,0mg
Moxalactan	7,5mg

Dissolver em água destilada e adicionar no momento do plaqueamento,
1mL do suplemento para cada 100mL de Meio Base Oxford.

2) Ágar Base Palcam (PALCAM)

Peptona	23,0g
Extrato de Levedura	3,0g
Cloreto de Sódio	5,0g
Citrato Férrico de Amônia	0,5g
D- manitol	10,0g
Esculina	0,8g
Glicose	0,5g
Cloreto de Lítio	.15,0g
Agar	.13,0g
Vermelho de Fenol	0,08g
Água destilada	. 1000mL

Dissolver os reagentes, autoclavar 121^oC por 15 minutos
(pH final: 7,0 ± 0,2).

2.1) Suplemento Seletivo PALCAM (g/2,5L) Código: SR150B

Polimixina B	25mg
Hidrocloreto de Acriflavina	12,5mg
Ceftazidina	50mg

Dissolver em água destilada e adicionar, no momento do plaqueamento,
1mL do suplemento para cada 100ml de ágar Base PALCAM.

ANEXO 3

Ágar Uréia Christense

1) Ágar Uréia Christense

Peptona	1,0g
Dextrose	1,0g
Cloreto de Sódio	5,0g
Fosfato monopotássico	2,0g
Uréia	20,0g
Vermelho de fenol (sol. 0,2%)	0,012g
Água destilada	1000mL

Dissolver os ingredientes em 100mL água destilada e esterilizar por filtração. Separadamente, preparar 900 mL de ágar a 1,5%, autoclavar a 121^oC por 15 minutos. Resfriar o ágar a 50-55^oC e adicinal 100mL do caldo esterilizado previamente. Distribuir em tubos estéreis e inclinar com rampa longa e fundo curto.

ANEXO 4

Análise Estatística

1) Médias de Coliformes Totais, Coliformes Fecais e tipos de queijos

ANOVA

		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
log_ct	Between Groups	18,021	3	6,007	6,883	,000
	Within Groups	66,330	76	,873		
	Total	84,352	79			
log_cf	Between Groups	7,750	3	2,583	5,685	,002
	Within Groups	26,359	58	,454		
	Total	34,109	61			

Multiple Comparisons

Dependent Variable		(I) tpqueijo	(J) tpqueijo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
log_ct	Tukey HSD	1 colonial	2 provolone	1,32284(*)	,31836	,000
			3 ricota	,40264	,39942	,745
			4 caccio cavalo	1,37450	,67116	,180
		2 provolone	1 colonial	-1,32284(*)	,31836	,000
			3 ricota	-,92020	,48243	,234
			4 caccio cavalo	,05166	,72364	1,000
		3 ricota	1 colonial	-,40264	,39942	,745
			2 provolone	,92020	,48243	,234
			4 caccio cavalo	,97186	,76279	,582
		4 caccio cavalo	1 colonial	-1,37450	,67116	,180
			2 provolone	-,05166	,72364	1,000
			3 ricota	-,97186	,76279	,582
log_cf	Tukey HSD	1 colonial	2 provolone	,87510(*)	,23568	,003
			3 ricota	,33289	,31779	,722
			4 caccio cavalo	1,00764	,48717	,176
		2 provolone	1 colonial	-,87510(*)	,23568	,003
			3 ricota	-,54221	,36924	,463
			4 caccio cavalo	,13254	,52219	,994
		3 ricota	1 colonial	-,33289	,31779	,722
			2 provolone	,54221	,36924	,463

	4 caccio cavalo	,67475	,56403	,632
4 caccio cavalo	1 colonial	-1,00764	,48717	,176
	2 provolone	-,13254	,52219	,994
	3 ricota	-,67475	,56403	,632

* The mean difference is significant at the .05 level.

2) Médias de Coliformes Totais, Coliformes Fecais e tipo armazenamento

Chi-Square Tests

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	19,765(a)	3	,000
Likelihood Ratio	23,148	3	,000
Linear-by-Linear Association	1,782	1	,182
N of Valid Cases	80		

a 5 cells (62,5%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,57.

3) Médias de Coliformes Totais, Coliformes Fecais e estação do ano

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
log_ct	,202	2	77	,817
log_cf	,723	2	59	,490

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
log_ct	Between Groups	1,623	2	,812	,755	,473
	Within Groups	82,729	77	1,074		
	Total	84,352	79			
log_cf	Between Groups	1,386	2	,693	1,250	,294
	Within Groups	32,723	59	,555		
	Total	34,109	61			

4) Médias de Coliformes Totais e Coliformes Fecais e presença de *Listeria sp.*

	Listeria	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
log_ct	0 não	66	5,0436	1,03978	,12799
	1 sim	14	5,1428	1,03642	,27700
log_cf	0 não	52	4,4007	,76735	,10641
	1 sim	10	4,3559	,67187	,21246

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference
		F	Sig.					
log_ct	Equal variances assumed	,092	,762	-,324	78	,747	-,09916	,30579
	Equal variances not assumed			-,325	18,971	,749	-,09916	,30513
log_cf	Equal variances assumed	,280	,599	,172	60	,864	,04489	,26028
	Equal variances not assumed			,189	13,927	,853	,04489	,23762

5) Estação do ano e confirmação de *E. coli*

Crosstab

		E.coli		Total	
		0 não	1 sim		
ESTACAO	1 PRIMAVERA	Count	7	2	9
		% within ESTACAO	77,8%	22,2%	100,0%
	2 VERÃO	Count	30	14	44
		% within ESTACAO	68,2%	31,8%	100,0%
	3 OUTONO	Count	18	9	27
		% within ESTACAO	66,7%	33,3%	100,0%
Total		Count	55	25	80
		% within ESTACAO	68,8%	31,3%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	,403(a)	2	,818
Likelihood Ratio	,424	2	,809
Linear-by-Linear Association	,272	1	,602
N of Valid Cases	80		

a 1 cells (16,7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,81.

6) Estação do ano e presença de *Listeria* sp.

Crosstab

		Listeria		Total	
		0 não	1 sim		
ESTACAO	1 PRIMAVERA	Count	3	6	9
		% within ESTACAO	33,3%	66,7%	100,0%
	2 VERÃO	Count	42	2	44
		% within ESTACAO	95,5%	4,5%	100,0%
	3 OUTONO	Count	21	6	27
		% within ESTACAO	77,8%	22,2%	100,0%
Total		Count	66	14	80
		% within ESTACAO	82,5%	17,5%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	20,601(a)	2	,000
Likelihood Ratio	17,863	2	,000
Linear-by-Linear Association	2,124	1	,145
N of Valid Cases	80		

a 2 cells (33,3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,58.

7) Presença de *E. coli* e presença de *Listeria* sp.

		E.coli		Total	
		0 não	1 sim		
Listeria	0 não	Count	46	20	66
		% within Listeria	69,7%	30,3%	100,0%
	1 sim	% within E.coli	83,6%	80,0%	82,5%
		Count	9	5	14
Total		% within Listeria	64,3%	35,7%	100,0%
		% within E.coli	16,4%	20,0%	17,5%
		Count	55	25	80
		% within Listeria	68,8%	31,3%	100,0%
		% within E.coli	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,157(b)	1	,692		
Continuity Correction(a)	,006	1	,937		
Likelihood Ratio	,155	1	,694		
Fisher's Exact Test				,755	,458
Linear-by-Linear Association	,155	1	,693		
N of Valid Cases	80				

a Computed only for a 2x2 table

b 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count

ANEXO 5

Provas bioquímicas realizadas para comprovação de *Pseudomonas aeruginosa*

Amostra	Gram	Maconkey	Oxidase	Lipase	Lecitina	cresc. 41°C	PAB brometo de amônio	PAB sulfato de ferro amôni	Uréia	Nitrato
54	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
56	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
66	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+

Amostra	Argidolase	Esculina	motilidade	indol	citrato	Oxidação	Fermentação
54	+	+	+	-	+	+	-
56	+	+	+	-	+	+	-
66	+	+	+	-	+	+	-

8. APÊNDICE

APÊNDICE 1

VITA

8.1 Dados Pessoais

Nome: Cristiana Bergman Zaffari

Nascimento: 18/04/1976, Erexim/RS – Brasil

Endereço Residencial: Av. Goeth, 16, apt 604, Rio Branco,
CEP 90.430-070, Porto Alegre, RS

Telefone:(51) 3331-8072

E-mail: criszaffari@zipmail.com.br

8.2 Formação Acadêmica / Titulação

2004-2005 - Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, RS, Brasil

2001-2002 – Especialização em Clínica Médica em Pequenos Animais

Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, RS, Brasil

1995-2000- Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, RS, Brasil

8.3) Áreas de Atuação

1. Clínica de Pequenos Animais e Animais Silvestres

2. Bacteriologia

3. Microbiologia Aplicada

4. Microbiologia de Alimentos

5. Microbiologia Veterinária

8.4 Produção Científica

ZAFFARI, Cristina Bergman; HENNEMANN, Carla; OLIVEIRA, Sergio. Uso do Lufenurum no Tratamento de Infecções Fungicas causadas por *Microsporium* sp. em gatos. **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, 10 a 14 de outubro, Gramado-RS, 2002.

Morais, C. da R.; Fuentefria, A.M; Zaffari, C.B; Conte, M.; Rocha, J.P; Spanaberg, A.; Silva, P.V.; Corção, G.; Costa, M. Qualidade Microbiológica do Leite Cru Produzido em cinco municípios do Estado do Rio Grande do Sul. **ACTA Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, n. 3, 2005.

ZAFFARI, Cristina Bergman; MELLO, Jozi Fagundes; COSTA, Marisa Da. Detecção de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Brucella* sp. em queijos artesanais na região litorânea d Rio Grande do Sul. **I MOSTRA UFRGS-Mostra** de Pesquisa e Pós-Graduação, promovida pela UFRGS, no período de 11 a 14 de maio de 2005.Porto Alegre-RS

