

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA**

**LAURA NUNES DE SOUZA**

**DETECÇÃO DE *Listeria monocytogenes* EM QUEIJOS COLONIAIS  
COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE PORTO ALEGRE**

Porto Alegre

2016

LAURA NUNES DE SOUZA

**DETECÇÃO DE *Listeria monocytogenes* EM QUEIJOS COLONIAIS  
COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE PORTO ALEGRE**

Trabalho de Conclusão de Curso da graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

Porto Alegre

2016

LAURA NUNES DE SOUZA

**DETECÇÃO DE *Listeria monocytogenes* EM QUEIJOS COLONIAIS  
COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE PORTO ALEGRE**

Trabalho de Conclusão de Curso da  
graduação em Ciências Biológicas da  
Universidade Federal do Rio Grande  
do Sul, como requisito parcial para  
obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

Aprovada em: \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016.

Banca Examinadora:

---

Ms. Thais de Campos Ausani

---

Dra. Caroline Pissetti

---

Prof. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso  
(Orientadora)

Porto Alegre

2016

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| RESUMO.....  | 5  |
| ABSTRACT.....  | 6  |
| LISTA DE FIGURAS.....  | 7  |
| LISTA DE TABELA.....   | 8  |
| 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....                                       | 9  |
| 2. POBLEMAS DE PESQUISA.....   | 11 |
| 3. HIPÓTESES.....  | 12 |
| 4. OBJETIVO.....   | 13 |
| 4.1 Geral.....   | 13 |
| 4.2 Específicos.....   | 13 |
| 5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....  | 14 |
| 5.1 Características do queijo.....                                       | 14 |
| 5.2 Características do queijo colonial.....                              | 14 |
| 5.3 Gênero <i>Listeria</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> .....         | 15 |
| 5.4 Listeriose.....  | 17 |
| 5.5 <i>Listeria monocytogenes</i> e a resistência a antimicrobianos..... | 19 |
| 6. MATERIAIS E MÉTODOS.....  | 21 |
| 6.1 Amostragem.....  | 21 |
| 6.2 Análise microbiológica.....  | 21 |
| 6.2.1 Detecção de <i>Listeria</i> sp.....                                | 21 |
| 6.2.2 Identificação de espécies do gênero <i>Listeria</i> .....          | 22 |
| 7. RESULTADOS.....   | 23 |
| 8. DISCUSSÃO.....  | 26 |
| 9. PERSPECTIVAS.....   | 28 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 29 |

## RESUMO

O queijo colonial é um importante derivado do leite, o qual apresenta características sensoriais marcantes e alto valor nutricional. Durante sua elaboração, estocagem, transporte e comercialização pode ocorrer contaminação por microrganismos de diferentes origens (ambiente, animal e humano). *Listeria monocytogenes* é um microrganismo que pode ser encontrado em uma grande variedade de alimentos, tanto crus quanto processados nos quais o microrganismo tem capacidade de multiplicação em temperatura de refrigeração, sendo capaz de sobreviver e multiplicar-se durante a estocagem. *Listeria monocytogenes* é responsável por infecções oportunistas, afetando principalmente indivíduos imunocomprometidos, recém-nascidos, idosos e gestantes. O presente estudo teve como objetivo investigar a presença de *L. monocytogenes* em queijos coloniais fiscalizados por órgão estadual ou municipal, comercializados em Feiras Modelo e Mercado Público de Porto Alegre, utilizando a metodologia de acordo com o documento ISO 11290-1. Nas 205 amostras de queijo coletados foi realizado enriquecimento primário e secundário para o isolamento de *Listeria* sp. e posteriormente, a realização de testes fenotípicos como coloração de Gram, teste de catalase e oxidase, teste de motilidade, fermentação de carboidratos, presença de  $\beta$ -hemólise e teste de CAMP para confirmação de *L. monocytogenes*. Foi possível constatar que 25 queijos tinham a presença de *Listeria* spp., sendo que, um deles apresentou duas espécies diferentes. *Listeria monocytogenes* estava presente em seis dos queijos amostrados revelando que o produto estava fora dos padrões exigidos pela legislação para queijos de média umidade. Conclui-se que há queijos coloniais comercializados em Feiras Modelo e no Mercado Público que podem oferecer risco aos consumidores, principalmente aos que pertencem ao grupo de risco.

## ABSTRACT

Colonial cheese is an important dairy product, which has remarkable sensorial characteristics and a high nutritional value. During its fabrication, storage, transportation and commercialization, contamination by microorganisms of different origins (environment, animal and human) can occur. *Listeria monocytogenes* is a microorganism that can be found in a wide variety of foods, both raw and processed. The bacteria has the capacity to multiply in low temperatures, being able to survive and multiply during the storage under refrigeration. *Listeria monocytogenes* is responsible for opportunistic infections, mainly affecting immunocompromised individuals, newborns, the elderly and pregnant women. The present study aimed to investigate the presence of *L. monocytogenes* in colonial cheese inspected by state or municipal agencies, sold at street fairs and at the Municipal Central Market in Porto Alegre. The detection was conducted according to the ISO 11290-1 methodology. A total of 205 samples of cheese were collected, and subjected to primary and secondary enrichment for the isolation of *Listeria* sp. Subsequently, phenotypic tests such as Gram stain, catalase and oxidase tests, motility test, carbohydrate fermentation, presence of  $\beta$ -hemolysis and CAMP test were performed in order to identify *L. monocytogenes*. In 25 cheese samples the presence of *Listeria* spp. was detected; one sample presented two different species of this genus. *Listeria monocytogenes* was present in six cheese samples indicating that the product was not complying with the legislation for medium moisture cheeses. It is concluded that there are colonial cheeses purchased in street fairs and in at the Municipal Central Market, which may offer risk to consumers, especially those belonging to the most susceptible group.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> - Coloração de Gram de <i>Listeria monocytogenes</i> .....       | 15 |
| <b>Figura 2</b> - Colônias de <i>Listeria monocytogenes</i> em ágar sangue ..... | 16 |
| <b>Figura 3</b> - Ágar PALCAM com colônias de <i>Listeria</i> spp. ....          | 23 |
| <b>Figura 4</b> - Teste de motilidade de <i>Listeria</i> spp. ....               | 24 |
| <b>Figura 5</b> - Teste de fermentação de ramnose e xilose.....                  | 24 |
| <b>Figura 6</b> - Teste de CAMP.....   | 25 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> – Interpretação de testes fenotípicos para <i>Listeria</i> spp. .... | 22 |
|--|----|

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O leite e seus derivados são considerados alimentos altamente nutritivos, apresentando em sua composição gorduras, vitaminas, carboidratos, sais minerais, proteínas e água, nutrientes essenciais ao organismo humano. Esses produtos, porém, oferecem excelente substrato para o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos, que podem comprometer a qualidade do produto, transformando-o em possível veículo de patógenos (SILVA et al., 2008). O queijo colonial ainda não possui padrão técnico estabelecido sobre sua qualidade e identidade; porém, está enquadrado no padrão microbiológico descrito na RDC ° 12 de 2001 estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para queijos de média umidade.

Doenças associadas à ingestão de alimentos contaminados constituem um sério problema mundial, podendo o queijo ser veículo de patógenos causadores de surtos e casos de infecção e intoxicação (BOOR, 1997; FAGUNDES E OLIVEIRA, 2004; LUNDÉN et al., 2004; DENNY E McLAUHLIN, 2008). Dentre os patógenos que podem ser veiculados por alimentos, *L. monocytogenes* ganha destaque por ser o agente causador da listeriose, severa doença que acomete diversos animais e os seres humanos (ALLERBERGER E WAGNER, 2010). Em humanos, a listeriose pode acometer qualquer indivíduo suscetível, entretanto, os grupos mais propensos a desenvolver sérias complicações (septicemia, aborto, meningites, encefalites) são os imunocomprometidos, gestantes, recém-nascidos e idosos (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001). O prognóstico da listeriose depende, também, da administração precoce de antimicrobianos que tenham rápida atividade bactericida contra *L. monocytogenes*.

*Listeria monocytogenes* é um microrganismo amplamente distribuído no ambiente, pois apresenta características que favorecem sua sobrevivência como tolerância aos ácidos e baixa atividade de água (ROCOURT E BUCHRIESER, 2007), bem como a habilidade de formar biofilmes e a capacidade de multiplicação em temperatura de refrigeração (SWAMINATHAN E GERNER-SMIDT, 2007). Devido a ampla distribuição dessa espécie patogênica, o monitoramento e o controle são necessários em todas as etapas da elaboração do produto, do transporte, armazenamento e comercialização para evitar que os produtos se tornem veículos dessa bactéria.

Avaliar as condições microbiológicas no produto final disponível para o consumidor e determinar a ocorrência dos principais microrganismos com potencial patogênico para os seres humanos em alimentos consumidos no Brasil, são de extrema importância para a saúde

pública. Apesar do elevado consumo de queijo colonial no município de Porto Alegre, ainda são escassos os estudos que investigam a inocuidade desse produto. Diante do exposto, este estudo teve por objetivo avaliar a presença de *Listeria monocytogenes* em queijos coloniais sob inspeção oficial, comercializados em Feiras Livres e Mercado Público de Porto Alegre.

## 2. PROBLEMA DE PESQUISA

Os queijos coloniais comercializados em Porto Alegre podem ter presença de *Listeria* spp.?

Quais as espécies de *Listeria* spp. podem ser encontradas nos queijos coloniais?

Queijos coloniais são possíveis veiculadores de *Listeria monocytogenes*?

### 3. HIPÓTESES

Os queijos coloniais podem ter presença de diferentes espécies de *Listeria* spp.

*Listeria monocytogenes* está presente em queijos coloniais comercializados no município de Porto Alegre.

## 4. OBJETIVO

### 4.1 Geral

Avaliar a presença de *Listeria* spp. em queijos coloniais, sob inspeção oficial, comercializados em Feiras Modelos e Mercado Público de Porto Alegre.

### 4.2 Específicos

- Identificar por métodos fenotípicos preconizados pela ISO 11290-1 as espécies de gênero *Listeria* presentes nas amostras de queijo colonial;
- Confirmar a presença de *Listeria monocytogenes* entre os isolados de *Listeria* spp.

## **5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **5.1 Características do queijo**

O queijo é um alimento popular em todo o mundo e tem como matéria prima o leite, geralmente de origem bovina (AQUARONE, 2001). Pode ser fresco ou maturado, com produção realizada através de coagulação natural do leite ou por meio de enzimas específicas (RODRIGUES, 2011). No Brasil, o consumo médio per capita de queijos é de apenas 5,1 quilos por ano. Entre 2005 e 2013 houve um crescimento de 76% no seu consumo e as estimativas indicam que o mesmo deverá alcançar 11 quilos em 2030. Atualmente 70% dos queijos consumidos no Brasil são dos tipos mussarela, prato e requeijão, mostrando que há potencial para a diversificação (ABIQ, 2014).

O queijo encontra-se entre os alimentos mais completos e recomendáveis para a dieta humana pelo seu valor nutritivo; apresenta em sua composição sais minerais, vitaminas, gordura e alta concentração de proteínas. Nesse sentido, o valor nutritivo do queijo é semelhante ao da carne. (ABIQ, 2005).

### **5.2 Características do queijo colonial**

A elaboração de queijo colonial originou-se da região de imigração italiana e alemã do Rio Grande do Sul. Produzido a partir de leite cru, era fabricado para o próprio consumo familiar ou usado em permutas de mercadorias (NEVES, 2007). Atualmente, é produzido em todo o sul do Brasil, elaborado industrialmente a partir de leite pasteurizado. Devido a suas características sensoriais, possui grande aceitação entre os consumidores (OLIVEIRA, 2011). O processo de maturação, que varia de 30 a 75 dias, proporciona ao queijo características marcantes: média umidade, sabor láctico levemente picante e ácido, massa interior com textura macia de coloração amarelo pálido, envolto por casca firme de coloração amarelo forte (OLIVEIRA, 2011). Até o momento, não existe padrão de técnicas de fabricação ou Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) para o queijo tipo colonial (FARIÑA et al., 2012; SILVA E SILVA, 2011).

De acordo com Correia e Roncada (1997), deve haver ao alcance da população, alimentos com qualidade, dentro de padrões pré-estabelecidos tanto em valores nutricionais quanto em condições higiênicas que propiciem segurança ao consumidor. No queijo, pode ocorrer a presença de matérias estranhas, de origem biológica ou não, através de leite obtido em ordenha inadequada, durante o processo de fabricação e nas etapas de armazenamento e transporte. A

resolução RDC n° 12, de 02 de janeiro de 2001, elaborada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece como padrão microbiológico para queijos de média umidade (queijo colonial) limites máximos de  $1,0 \times 10^3$  UFC/g de *Staphylococcus* coagulase positiva,  $1,0 \times 10^3$  NMP/g de coliformes termotolerantes e ausência de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em 25 gramas de alimento.

### 5.3 Gênero *Listeria* e *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* compreende bactérias Gram positivas, em forma de bacilos curtos com extremidades arredondadas (Figura 1), podem ocorrer isoladamente ou em cadeias curtas e em menor frequência em longos filamentos, não formam esporos ou cápsula. São microrganismos anaeróbios facultativos, catalase positiva e oxidase negativa. Possuem temperatura ótima para crescimento de 30 a 37°C, mas a motilidade só ocorre quando são cultivados a 20-25°C. As colônias em ágar sangue são planas e ligeiramente achatadas, não possuem pigmentação e há presença de  $\beta$ -hemólise (Figura 2) (HOLT, 1994). Atualmente o gênero compreende 19 espécies e 6 subespécies (<http://www.bacterio.net/listeria.html>). São microrganismos suscetíveis aos desinfetantes comuns, porém, são resistentes à desidratação e a ciclos de congelamento e descongelamento, podendo sobreviver por meses no alimento. Sua ampla distribuição no ambiente é favorecida pela capacidade de se desenvolver em temperaturas de 0°C a 44°C (DIMAIO, 2000).



Figura 1 – Morfologia celular de *Listeria monocytogenes* coradas pelo Gram. (Fonte: Microbe Canvas – *Listeria monocytogenes*).



Figura 2 – Morfologia colonial de *Listeria monocytogenes* em ágar sangue (Fonte: Microbe Canvas – *Listeria monocytogenes*).

Dentre as espécies do gênero *Listeria*, duas já foram descritas como potencialmente patogênicas: *L. ivanovii*, com importância restrita a ruminantes; e *L. monocytogenes*, capaz de infectar uma grande variedade de espécies animais, e os seres humanos (RYSER E MARTH, 2007; SWAMINATHAN E GERNER-SMIDT, 2007). Apesar de apenas *L. monocytogenes* ser considerada patogênica para o homem dentro do gênero *Listeria*, existem relatos de infecções ocasionais por *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. ivanovii* (CHAMBEL et al., 2007).

*Listeria monocytogenes* foi identificada por E.G.D. Murray, em 1924, como o microrganismo responsável por casos epidêmicos de mononucleose em animais de laboratório, sendo denominada *Bacterium monocytogenes*. Posteriormente, foi reconhecida como um patógeno oportunista e de origem alimentar podendo ser encontrada tanto em alimentos crus quanto processados (GASANOV et al., 2005; JANZTEN et al., 2006; LIU, 2006; JEYALETCHUMI et al., 2010; VÄLIMAA et al., 2015). Devido a sua capacidade de sobreviver sob condições de processamento, como pH extremo, baixa atividade de água, temperaturas de refrigeração e altas concentrações de sal, ela vem assumindo importância para a indústria de alimentos. (LIU, 2006; ZUNABOVIC et al., 2011). *Listeria monocytogenes* é eliminada pelo processo de pasteurização, entretanto, a contaminação do alimento por esse microrganismo pode ocorrer após o processamento ou após a pasteurização através da formação de biofilmes no ambiente e por contaminação cruzada (JADHAV et al., 2012). Os biofilmes formados no ambiente de processamento de alimentos podem resistir a longos períodos e auxiliam *L. monocytogenes* a tolerar ambientes hostis e a ação de desinfetantes. (JADHAV et al., 2012; DA SILVA E DE MARTINIS, 2013; VÄLIMAA et al., 2015). Esse fato pode resultar

na contaminação das superfícies de contato com os alimentos durante e/ou após o processamento (JEMMI E STEPHAN, 2006). Esse conjunto de características torna *L. monocytogenes* um patógeno emergente na indústria de alimentos e que ganha destaque pela dificuldade de sua eliminação (LANDGRAF, 1997; NOJIMOTO, 1994; CATÃO e CEBALLOS, 2001). Diversos estudos comprovam a presença de *L. monocytogenes* em diferentes alimentos: carne de aves, carne bovina e suína, pescados, embutidos, vegetais, leite e derivados (KORSAK et al., 2012; KRAMARENKO et al., 2013; MIYASAKI et al., 2009; SANT'ANA et al., 2012; WIECZOREK et al., 2012).

*Listeria monocytogenes* está subdividida em sorotipos com base nos antígenos somáticos e flagelares. Treze sorovares já foram identificados: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7; sendo que os sorotipos envolvidos em mais de 95% dos casos de listeriose humana são 1/2a, 1/2b e 4b (DOUMITH et al., 2004; SWAMINATHAN E GERNER-SMIDT, 2007). Apesar dos sorotipos 1/2a e 1/2b serem os mais isolados de alimentos, são as cepas 4b que causam mais de 50% dos casos de listeriose em todo o mundo (BORUCKI et al., 2003). Visto isso, duas hipóteses poderiam explicar a predominância desses sorotipos: (1) geralmente os humanos são mais expostos a esses sorotipos de *L. monocytogenes*; e (2) esses são os sorotipos que possuem potencial patogênico para o homem (WIEDMANN et al., 2002).

Schwab et al. (1996), no Rio Grande do Sul, conseguiram isolar *L. monocytogenes* e *L. innocua* de amostras de queijos coloniais comercializados em Porto Alegre. Por outro lado, em estudo feito com 75 amostras de queijo colonial provenientes da região noroeste do estado, não houve detecção de *L. monocytogenes*, sendo que *L. innocua* ocorreu somente em uma amostra (SCHITTLER, 2002). Na região serrana do Rio Grande Sul, foram analisadas 100 amostras de queijo colonial e *L. innocua* foi detectada em seis amostras (PIANTA, 2003). Em estudo realizado na cidade de Pelotas, *L. innocua* foi detectada em todas as três amostras de queijo artesanal analisadas (JANTZEN et al, 2004).

#### **5.4 Listeriose**

A listeriose é causada por *L. monocytogenes* (McLAUHLIN et al., 2004), geralmente associada à ingestão de alimentos processados, armazenados por longos períodos sob refrigeração e consumidos sem aquecimento prévio como ocorre com produtos de laticínios, contaminados por esse patógeno (McLAUHLIN, 1996). Apesar da listeriose ter menor frequência entre as Doenças Transmitidas por Alimentos, é responsável por 19% dos óbitos causados por esse grupo de enfermidades nos Estados Unidos (SCALLAN et al., 2011).

A doença apresenta um período variável de incubação (3 a 70 dias), o que dificulta a identificação do agente causador e a origem da contaminação do alimento (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2003). No Brasil, a listeriose humana é subdiagnosticada e subnotificada (SILVA et al., 2007). De acordo com Hofer et al. (2006), o alimento contaminado com *L. monocytogenes* é o provável responsável por casos esporádicos em humanos, o que reforça a necessidade de identificar os possíveis alimentos envolvidos e a fonte da contaminação.

O primeiro surto de listeriose documentado ocorreu em 1981, no Canadá, acometendo 41 pacientes dos quais 11 vieram a óbito. O surto foi relacionado com a ingestão de repolho contaminado a partir de dejetos *in natura* de ovinos (SCHLECH III et al., 1983). Em Boston (EUA) foi relatado o primeiro surto veiculado por produtos lácteos, em que foram registrados 42 casos. Na Califórnia (EUA), um surto de listeriose com 142 casos e 48 óbitos, no ano de 1985, teve o queijo tipo mexicano como a provável fonte de contaminação. Na Suíça, *L. monocytogenes* presente em um queijo macio foi responsável por um surto que envolveu 122 pacientes (ROCOURTE, 1997).

A listeriose apresenta-se sob três formas: gastroenterite febril, listeriose materno-fetal/neonatal ou bacteremia com ou sem acometimento do sistema nervoso central (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001). Na sua forma invasiva, a listeriose é severa e acomete pessoas em grupo de risco como os imunocomprometidos, idosos, mulheres grávidas e neonatos (SWAMINATHAN E GERNER-SMIDT, 2007). Em gestantes, a infecção apresenta sintomas de gripe, febre e dor de cabeça, sendo as complicações mais comuns o aborto espontâneo ou natimorto. Em casos de gastroenterite os sintomas são: diarreia, febre, dor de cabeça, mialgias e dor abdominal. Os pacientes afetados geralmente são indivíduos saudáveis e o período de incubação em média é 24 horas, em geral esse paciente não necessita ser submetido à antibioticoterapia. Em recém-nascidos existem duas formas de listeriose: a precoce e a tardia. A tardia ocorre após duas semanas de vida e está associada com meningites; enquanto que a precoce está associada com sintomas respiratórios e bacteremia. A listeriose é reconhecida como uma das duas principais causas de meningite em recém-nascidos. (LAMONT et al., 2011; SLUTSKER E SCHUCHAT, 1999; SWAMINATHAN E GERNER-SMIDT, 2007). A maioria das infecções em adultos ocorre em pacientes com mais de 50 anos de idade e causa meningite, meningoencefalite, tromboencefalite e abscessos no cérebro devido ao tropismo da bactéria pelo sistema nervoso central (DISSON E LECUIT, 2012).

A rápida detecção de surtos, a educação do consumidor e a implantação de medidas preventivas em indústrias processadoras de alimentos contribuíram para a redução da incidência

de listeriose na década de 90 na Europa (LUNDE et al., 2004). Entretanto, o aumento da população suscetível, mudanças na cadeia de produção de alimentos como nas condições de armazenamento de temperatura de refrigeração e vida de prateleira, alteração nos hábitos alimentares e na formulação de alimentos contribuíram para o aumento do número de casos (DENNY E McLAUHLIN, 2008).

Nos EUA, estima-se que pelo menos 500 óbitos registrados anualmente são ocasionados pela listeriose (WILLIAMS et al, 2011). Na Europa, houve aumento do número de casos, 1.645 confirmados em 2009, e taxa de letalidade de 16,6% (EFSA, 2009). Dentre os patógenos de origem alimentar, *L. monocytogenes* é responsável pela mais elevada taxa de internação hospitalar (90%), além de apresentar alta taxa de letalidade (20 a 30%) (ZHANG et al., 2004).

### **5.5 *Listeria monocytogenes* e resistência a antimicrobianos**

A utilização de agentes antimicrobianos influencia os níveis de resistência a antibióticos (WANG et al., 2013), portanto, o acompanhamento da suscetibilidade de *L. monocytogenes* aos antimicrobianos nas diferentes regiões geográficas é importante para a eleição do tratamento da listeriose (ABDOLLAHZADEH et al., 2016).

De acordo com Hof (2003) e Troxler et al (2000) *L. monocytogenes* já possui resistência natural às quinolonas de primeira geração, cefalosporinas de terceira geração e a fosfomicina, sendo geralmente suscetíveis às classes de antimicrobianos ativas contra bactérias gram-positivas relevantes clinicamente, como, por exemplo, as bactérias pertencentes aos gêneros de *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*. A terapia primária para a listeriose humana tem sido uma combinação de amoxicilina ou ampicilina com gentamicina (HOF, 2004; WANG et al., 2013). Em estudo conduzido na França, entre 4.816 isolados clínicos de *L. monocytogenes*, apenas 1,27% apresentou resistência, evidenciando que este microrganismo é normalmente suscetível a uma vasta gama de antimicrobianos. Entretanto, um aumento contínuo da resistência de *L. monocytogenes* aos antimicrobianos tem sido relatada (CUNHA et al., 2016).

O primeiro relato de *L. monocytogenes* resistente a antimicrobianos ocorreu em 1988, quando cepas resistentes a concentrações superiores a 10 µg/mL de tetraciclina foram identificadas (POYART-SALMERON et al., 1990). Nessa mesma época, surgiu o relato de cepa multirresistente isolada a partir de um paciente com meningoencefalite na França. (POYART-SALMERON et al., 1990). Desde então, têm sido descritas diversas cepas de *L. monocytogenes* isoladas de diferentes origens que apresentam resistência a um ou mais antimicrobianos (CHARPENTIER E COURVALIN, 1999; CONTER et al., 2009; GRANIER

et al., 2011; LI et al., 2007; MORVAN et al., 2010; PRAZAK et al., 2002; RODAS-SUÁREZ et al., 2006; SAFDAR E ARMSTRONG, 2003; SRINIVASAN et al., 2005; VELA et al., 2001; WALSH et al., 2001; YAN et al., 2010; ZHANG et al., 2007).

A resistência a antimicrobianos em *L. monocytogenes* é relacionada, principalmente, à presença de elementos genéticos móveis: plasmídeos mobilizáveis, plasmídeos autotransferíveis e transposons conjugativos. Além disso, a presença de bombas de efluxo já foram relatadas em *Listeria* (LUNGU et al., 2011). Portanto, os fatores que influenciam a transferência de genes podem desempenhar um papel importante para a aquisição de genes de resistência neste patógeno (ALLEN et al., 2016). Como exemplo, podemos citar o plasmídeo pAM $\beta$ 1, que é responsável por conferir a resistência a eritromicina e pode ser transferido por conjugação a partir de *Enterococcus faecalis* para *L. monocytogenes* (LUNGU et al., 2011).

Em estudo realizado no Irã, quatro isolados de *L. monocytogenes* obtidos a partir de frutos do mar (57%) e cinco isolados clínicos (71,4%) foram resistentes a penicilina (ABDOLLAHZADEH, 2016). Em estudo de Issa et al. (2011), a maioria dos isolados de *L. monocytogenes* de alimentos eram resistentes a penicilina e ampicilina. Os níveis elevados de resistência a esses dois antimicrobianos poderia ser explicado pelo fato de que são a primeira opção no tratamento de listeriose (ALLEN et al., 2016; DOMÉNECH et al., 2015).

## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 Amostragem

No presente estudo foram avaliadas amostras de queijos coloniais, sob inspeção estadual (CISPOA) ou municipal (SIM), comercializados em Feiras Modelo e Mercado Público de Porto Alegre. Para o cálculo do número de amostras foi utilizado como parâmetro a detecção de *Listeria monocytogenes*, reportado na literatura. Para que houvesse uma probabilidade de 99% de detecção de *Listeria* sp. em um universo amostral que considera todos os queijos presentes nas bancas de feira num determinado momento, foi necessário a coleta de 205 amostras de queijo. Para que a distribuição da amostra fosse representativa, a coleta de amostras foi realizada em sete bancas que comercializam queijos coloniais no Mercado Público de Porto Alegre, e em bancas de 8 grupos de Feiras Modelo de Porto Alegre. A coleta das amostras de queijos foi realizada em quatro ciclos de amostragem, no período de outubro de 2014 a março de 2015, adquirindo pelo menos 250 g de todos os queijos disponíveis para a venda em cada banca.

### 6.2 Análise microbiológica

#### 6.2.1 Detecção de *Listeria* sp.

A metodologia utilizada para detecção de *Listeria* sp. foi baseada de acordo com a ISO 11290-1:1996, emenda 1:2004. A etapa de enriquecimento primário foi realizada utilizando 25g da amostra adicionadas a 225 mL de Caldo Half-Fraser, homogeneizada e incubada a 30°C durante 24 horas; após esse período, uma alíquota de 0,1 mL foi inoculada em 10 mL de Caldo Fraser e incubadas a 37°C durante 48 horas para o enriquecimento secundário. Para o isolamento em meio sólido seletivo, alíquotas de 10µL do Caldo Half-Fraser e do Caldo Fraser foram inoculados separadamente em placas contendo Ágar *Listeria* Ottaviani & Agosti (ALOA) e em Ágar PALCAM. Ambos os meios foram incubados a 37°C durante 24-48 horas. Após esse período, foram selecionadas cinco colônias típicas para semeadura individual em Ágar TSA-YE, incubadas durante 18-24 horas a 37°C. As colônias suspeitas de *Listeria* sp. foram estocadas em criocultivo a -20°C.

#### 6.2.2 Identificação de espécie do gênero *Listeria*

As colônias suspeitas de *Listeria* spp. estocadas em criocultivo foram recuperadas em caldo BHI contendo extrato de levedura, incubados durante 18 horas a 37°C. Após o

crescimento, foram semeadas em Agar TSA-YE e incubadas durante 18-24 horas a 37°C para realização da identificação fenotípica pelo teste da catalase e da oxidase, coloração de Gram, teste de motilidade, teste de observação da presença de  $\beta$ -hemólise em ágar sangue, teste de fermentação de xilose e rhamnose e teste de CAMP (Christie, Atkins e Munch-Petersen). O teste de CAMP mostra a interação que ocorre entre os isolados de *Listeria* sp. com *Staphylococcus aureus* e *Rodococcus equi*. Nesse teste também é possível visualizar a presença de  $\beta$ -hemólise, que é caracterizada pelo aparecimento de zona clara transparente ao redor das colônias. *Listeria monocytogenes* deve ter um pequeno aumento da zona de hemólise (2 mm) na região da intersecção com *S. aureus* e formação de pequena hemólise que se estende somente cerca de 1mm na intersecção da cepa de *L. monocytogenes* com a zona de difusão da cultura de *R. equi*. Os testes foram conduzidos conforme descrito no documento ISO 11290-1:1996, emenda 1:2004 e sua interpretação está descrita conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1: interpretação dos testes fenotípicos para as espécies de *Listeria* sp.

| Espécie                                     | Hemólise | Produção de ácidos |        | CAMP teste       |                |
|---|----------|--------------------|--------|------------------|----------------|
|   |          | Ramnose            | Xilose | <i>S. aureus</i> | <i>R. equi</i> |
| <i>Listeria monocytogenes</i>               | +        | +                  | -      | +                | -              |
| <i>Listeria innocua</i>                     | -        | V                  | -      | -                | -              |
| <i>Listeria ivanovii</i>                    | +        | -                  | +      | -                | +              |
| <i>Listeria seeligeri</i>                   | (+)      | -                  | +      | (+)              | -              |
| <i>Listeria welshimeri</i>                  | -        | V                  | +      | -                | -              |
| <i>Listeria grayi</i> subsp. <i>grayi</i>   | -        | -                  | -      | -                | -              |
| <i>Listeria grayi</i> subsp. <i>murrayi</i> | -        | V                  | -      | -                | -              |

V: reação variável; (+): reação fraca; "+": mais de 90% de reações positivas; "-": sem reação.

## 7. RESULTADOS

No ágar ALOA o gênero *Listeria* sp. apresenta colônia típica com coloração azul/verde devido a produção da enzima  $\beta$ -glicosidase. Em ágar PALCAM as colônias típicas são pequenas e de coloração verde/cinza; após 48 horas de incubação ocorre o desenvolvimento de uma depressão central na colônia (Figura 3). Das 205 amostras de queijo colonial analisadas, 25 apresentaram colônias típicas do gênero *Listeria* sp. em ágar ALOA e em ágar PALCAM.

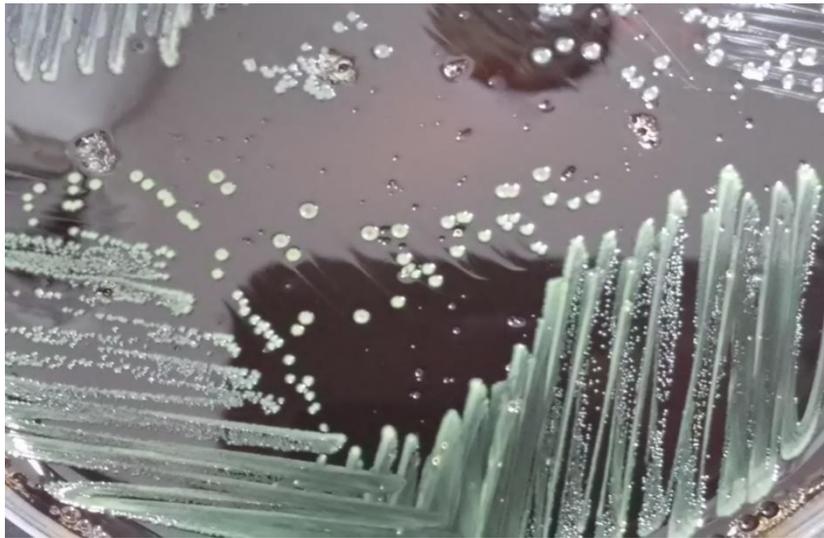


Figura 3 - Ágar PALCAM com colônias características de *Listeria* sp.

Os isolados com colônia típica foram submetidos aos testes de coloração de Gram, catalase, oxidase e prova da motilidade. Vinte e seis isolados apresentaram-se como pequenos bacilos Gram positivos, catalase positiva, oxidase negativa e motilidade em forma de guarda-chuva (Figura 4). Dessa forma, os 26 isolados foram confirmados como *Listeria* spp.

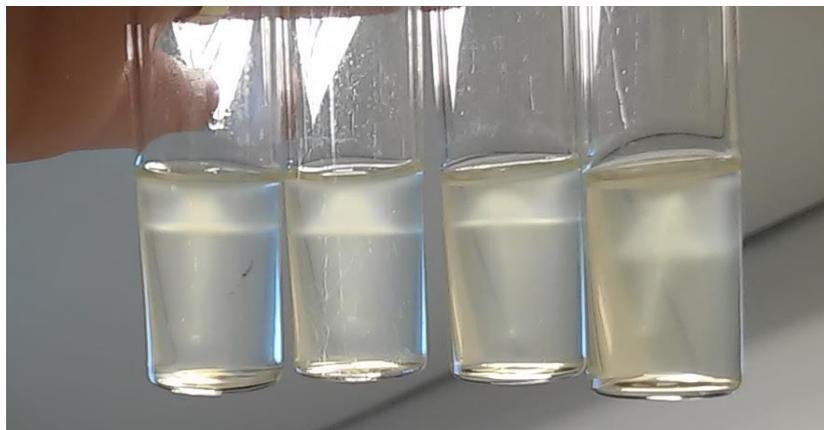


Figura 4 - Teste de motilidade positivo para *Listeria* sp. O gênero apresenta motilidade em forma de “guarda-chuva”.

Os 26 isolados confirmados como *Listeria* spp. foram submetidos a prova de fermentação de xilose e ramnose e ao teste de CAMP para identificação de espécie. Dos isolados testados, 19 produziram ácido a partir de ramnose, mas não a partir de xilose. Esse resultado é compatível com *L. monocytogenes*, entretanto *L. innocua* também não fermenta a xilose, mas é variável para fermentação da ramnose. Portanto, a fermentação destes carboidratos não confirma *L. monocytogenes* fenotipicamente.



Figura 5 - Teste positivo de utilização dos carboidratos para *Listeria monocytogenes*. No tubo amarelo, ocorreu a fermentação da ramnose, enquanto que no tubo vermelho, não houve fermentação da xilose.

Dos 26 isolados de *Listeria* sp. testados, seis apresentaram resultado indicativo de *L. monocytogenes*, tanto no teste de CAMP (Figura 6), quanto há presença de  $\beta$ -hemólise, estando elas entre as 19 positivas no teste de fermentação de carboidratos.



Figura 6 - Teste de CAMP. As amostras que apresentaram interação com o *Staphylococcus aureus* e ausência/fraca interação com *Rhodococcus equi* foram consideradas positivas para *L. monocytogenes*.

De acordo com os resultados, entre as 205 amostras de queijo analisadas, 25 (12,19%) apresentaram a presença do gênero *Listeria*, sendo que uma das amostras apresentou duas espécies diferentes de *Listeria* sp. (Figura 7). Através dos testes fenotípicos de identificação de espécie, foram registrados 23,08% (6/26) de *L. monocytogenes* e 50% (13/26) de *L. innocua*. Não foi possível identificar 26,92% (7/26) dos isolados em espécie utilizando apenas os métodos fenotípicos de identificação.

## 8. DISCUSSÃO

Durante a elaboração de queijos, a boa qualidade da matéria prima, a higiene dos equipamentos e dos utensílios utilizados, o armazenamento em temperatura adequada dos produtos, o transporte de maneira correta e a manipulação correta são fatores que garantem a boa qualidade do alimento. Ocorrer falhas em alguma dessas etapas, pode tornar o queijo um risco ao consumidor pela possível presença de contaminantes microbiológicos (ROOS et al., 2005). Por ser um alimento muito rico e completo em valores nutricionais, o queijo é ambiente propício para o desenvolvimento microbiano.

A presença de *Listeria* sp. em 25 (12,19%) queijos dos 205 amostrados é um resultado importante pois a presença de qualquer espécie deste gênero é indicativa da presença de *L. monocytogenes* ainda que a mesma não seja isolada, pois *L. monocytogenes* é uma má competidora durante o cultivo em qualquer meio de cultura, especialmente na presença de microbiota acompanhante (ZAFFARI et al., 2007). Entre os possíveis competidores, a presença de coliformes, pode impedir a proliferação e dificultar a detecção de *L. monocytogenes* (ARAGON-ALEGRO et al., 2007).

Embora *L. innocua* não apresente patogenicidade para o homem, seu isolamento é de extrema importância já que possui o mesmo habitat que *L. monocytogenes*, podendo-se considerar o risco de contaminação por esse microrganismo (MURRAY et al., 1995). O presente trabalho mostrou que em 25 queijos com presença de *Listeria* sp., em metade tratava-se dessa espécie o que pode indicar falta de condições higiênicas satisfatórias durante o processamento do alimento ou durante as etapas posteriores como armazenamento, transporte e manipulação.

No presente estudo, das 205 amostras de queijo analisadas quanto à presença de *L. monocytogenes*, seis foram positivas. O resultado obtido corrobora com outros estudos realizados anteriormente, como o conduzido por Zaffari et al (2007), que analisou seis amostras de queijo tipo ricota no Rio Grande do Sul, e em três encontraram *L. monocytogenes*. Todos os queijos analisados durante o projeto estavam sob inspeção estadual ou municipal, ou seja, devem atender ao padrão microbiológico definido pela legislação brasileira em vigência: queijos de média umidade – queijos coloniais – devem apresentar ausência de *L. monocytogenes*. Sendo assim, esses seis queijos seriam considerados impróprios para o consumo. É possível supor que os queijos coloniais com presença de *L. monocytogenes* poderiam representar risco para os consumidores, pois esse produto é consumido geralmente sem tratamento térmico.

Tendo em vista a importância de *L. monocytogenes* em relação a segurança alimentar, em outros países existem planos governamentais específicos para reduzir os surtos alimentares causados por esse microrganismo (FDA, 2005a). De acordo com o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) (2008), órgão do governo americano, anualmente são registrados cerca de 2,5 mil casos de listeriose nos Estados Unidos, sendo que 90% desses casos levam a hospitalizações e 20% a óbitos. Estudos apontam que *L. monocytogenes* é possivelmente o principal microrganismo responsável pelos óbitos relacionadas com doenças transmitidas por alimentos ocorridos nos Estados Unidos (Oliveira et al, 2010). No Brasil, a notificação de listeriose não é obrigatória, acarretando na ausência de estatísticas oficiais sobre os casos dessa enfermidade. Visto o resultado do presente estudo, em que 12,19% dos queijos tinham presença de *Listeria* spp. e 2,93% eram *L. monocytogenes*, sugere-se que haja uma atenção especial dos órgãos de saúde pública quanto à notificação de casos de listeriose, além de uma fiscalização mais incisiva desses produtos.

## 9. PERSPECTIVAS

Como perspectiva deste trabalho está a realização de sorotipagem das amostras confirmadas para *Listeria monocytogenes*, a fim de se determinar quais os sorotipos que foram encontrados nos queijos comercializados. Também a realização do perfil de resistência dessas cepas aos antimicrobianos pode ser uma informação importante.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOLLAHZADEH, E. et al. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from seafood and humans in Iran. **Microbial Pathogenesis**, v. 100, p. 70-74, 2016.
- ABIQ. Benefícios nutricionais dos queijos. Associação Brasileira das Indústrias de Queijo, 2005. Disponível em <<http://www.abiq.com.br/>>. Acesso em: 01 out. 2016.
- ABIQ. Mercado de queijos cresce no país e atrai estrangeiros. Associação Brasileira das Indústrias de Queijo, 2014. Disponível em <<http://www.abiq.com.br/>>. Acesso em: 05 out. 2016.
- ALLEN, K. J. et al. *Listeria monocytogenes*—An examination of food chain factors potentially contributing to antimicrobial resistance. **Food Microbiology**, v. 54, p. 178-189, 2016.
- ALLERBERGER, F.; WAGNER, M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 1, p. 16-23, 2010.
- ANVISA – Monitoramento e Prevenção da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde, Brasília, 2006.
- ARAGON-ALEGRO, L. C. **Influência dos coliformes no comportamento de *Listeria monocytogenes* em queijo minas frescal**. 2007. Tese de Doutorado.
- AQUARONE, E. et al. Biotecnología Industrial: Biotecnologia na produção de alimentos, Vol. 4. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001.
- BOOR, K. J. Pathogenic microorganisms of concern to the dairy industry. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.17, n.11, p.714-717, 1997.
- BORUCKI, M. K.; CALL, D. R. *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5537-5540, 2003.
- CATÃO, R. M. R.; de CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de alimentos**, v. 21, n. 3, p. 281-287, 2001.
- CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Outbreak of *Listeria monocytogenes* infections associated with pasteurized milk from a local dairy – Massachussets, 2007. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v. 57 (40) p. 10971100, 2008.
- CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Informações sobre doenças transmitidas por água e alimentos. *Listeria monocytogenes*/listeriose. 2003. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Listeria.htm>>. Acesso em: 07 out. 2016.
- CHAMBEL, L. et al. Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial–temporal mapping along production cycle. **International journal of food microbiology**, v. 116, n. 1, p. 52-63, 2007.

CHARPENTIER, E.; COURVALIN, P. Antibiotic Resistance in *Listeria* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 9, p. 2103-2108, 1999.

CONTER, M. et al. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. **International journal of food microbiology**, v. 128, n. 3, p. 497-500, 2009.

CORREIA, M.; RONCADA, M. J. Características microscópicas de queijos prato, mussarela e mineiro comercializados em feiras livres da Cidade de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 3, p. 296-301, 1997.

CUNHA, S. et al. Characterization of clinical and food *Listeria monocytogenes* isolates with diferente antibiotic resistance patterns through simulated gastrointestinal tract conditions and environmental stresses. **Microbial risk analysis**, v.1, p. 40-46, 2016.

DA SILVA, E. P.; DE MARTINIS, E. C. P. Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 957-968, 2013.

DE LAS HERAS, A. et al. Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. **Current opinion in microbiology**, v. 14, n. 2, p. 118-127, 2011.

DENNY, J.; MCLAUCHLIN, J. Human *Listeria monocytogenes* infections in Europe--an opportunity for improved European surveillance. **Euro surveillance: bulletin européen sur les maladies transmissibles= European communicable disease bulletin**, v. 13, n. 13, p. 1854-1861, 2008.

DESTRO, M. T. ***Listeria monocytogenes* na cadeia produtiva de alimentos: da produção primária ao consumidor final**. 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

DIMAIO, H. *Listeria* infection in women. **Primary care update for OB/GYNs**, v. 7, n. 1, p. 40-45, 2000.

DISSON, O.; LECUIT, M. Targeting of the central nervous system by *Listeria monocytogenes*. **Virulence**, v. 3, n. 2, p. 213-221, 2012.

DOMÉNECH, E. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains isolated in ready-to-eat foods in Eastern Spain. **Food Control**, v. 47, p. 120-125, 2015.

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

EFSA, ECDC. The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007. **EFSA J**, v. 223, p. 312, 2009.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p. 1315-1320, 2004.

FARIÑA, L. O. et al. **Análise de composição e avaliação da acidez do queijo colonial produzidos por agricultores familiares de Céu Azul- PR.** In: 3º Congresso De Ciências Farmacêuticas e 3º Simpósio Em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Mercosul, 2012.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Centers for Disease Control and Prevention. **Reducing the Risk of *Listeria monocytogenes*** FDA/CDC 2003, 2005a.

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

GRANIER, S. A. et al. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 8, p. 2788-2790, 2011.

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

HOF, H. An update on the medical management of listeriosis. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 5, n. 8, p. 1727-1735, 2004.

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

HOLT, J. G. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

ISSA, Z. M. et al. Antibiogram profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from foods. In: **Proceedings of the 2nd International Conference on Biotechnology and Food Science.** 2011. p. 133-137.

JADHAV, S.; BHAVE, M.; PALOMBO, E. A. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. **Journal of microbiological methods**, v. 88, n. 3, p. 327-341, 2012.

JANTZEN, M. M. Bactérias potencialmente enteropatogênicas em queijo e carne moída comercializados em Pelotas/RS. In: **Simpósio de Segurança Alimentar.** 2004. p.83.

JANTZEN, M. M. et al. Review. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods: from chromogenic media to real-time PCR. **Spanish journal of agricultural research**, v. 4, n. 3, p. 235-247, 2006.

JEMMI, T.; STEPHAN, R. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. **Rev Sci Tech**, v. 25, n. 2, p. 571-580, 2006.

JEYALETCHUMI, P. et al. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. **International Food Research Journal**, v. 17, n. 1, p. 1-11, 2010.

KORSAK, D. et al. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environment in Poland. **International journal of food microbiology**, v. 158, n. 3, p. 203-208, 2012.

KRAMARENKO, T. et al. *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. **Food Control**, v. 30, n. 1, p. 24-29, 2013.

LAMONT, R. F. et al. Listeriosis in human pregnancy: a systematic review. **Journal of perinatal medicine**, v. 39, n. 3, p. 227-236, 2011.

LI, Q.; SHERWOOD, J. S.; LOGUE, C. M. Antimicrobial resistance of *Listeria* spp. recovered from processed bison. **Letters in applied microbiology**, v. 44, n. 1, p. 86-91, 2007.

LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 645-659, 2006.

LUNDÉN, J.; TOLVANEN, R.; KORKEALA, H. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. E6-E12, 2004.

LUNGU, B. et al. *Listeria monocytogenes*: antibiotic resistance in food production. **Foodborne pathogens and disease**, v. 8, n. 5, p. 569-578, 2011.

MCLAUCHLIN, J. et al. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. **International journal of food microbiology**, v. 92, n. 1, p. 15-33, 2004.

MCLAUCHLIN, J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. **Food control**, v. 7, n. 4, p. 187-193, 1996.

MICROBE CANVAS. Microbiology on the go. Dept. Medical Microbiology and Infectious diseases. Disponível em: <<http://microbe-canvas.com>> Acesso em: 13 nov. 2016.

MIYASAKI, K. N. et al. High prevalence, low counts and uncommon serotypes of *Listeria monocytogenes* in linguíça, a Brazilian fresh pork sausage. **Meat science**, v. 83, n. 3, p. 523-527, 2009.

MORVAN, A. et al. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2728-2731, 2010.

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

MURRAY, P. R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 6.ed. American Society for Microbiology Press, 1995.

NEVES, R. Queijos com sotaque nacional. Fonte: Gazeta Mercantil, 2007. Disponível em: <<http://www.terraviva.com.br/terraviva/file/1/454.htm>> Acesso em: 06 out. 2016.

OLIVEIRA, D. F. **Estudo da interferência da sazonalidade na composição centesimal e qualidade microbiológica de queijos coloniais**, 2011. Trabalho de Conclusão de Curso.

OLIVEIRA, D. F. et al. Análise da composição físico-química, conteúdo lipídico e qualidade higiênico-sanitária de queijos coloniais. In: XXVII Congresso Nacional de Laticínios, 2010.

PIANTA, C. **Calidad Higiénico-Sanitaria del queso colonial**. 2003. Tese de Doutorado.

POYART-SALMERON, C. et al. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. **The Lancet**, v. 335, n. 8703, p. 1422-1426, 1990.

PRAZAK, A. M. et al. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from various cabbage farms and packing sheds in Texas. **Journal of Food Protection®**, v. 65, n. 11, p. 1796-1799, 2002.

ROCOURT, J.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. Em: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. ASM Press, p. 337-351, 1997.

ROCOURT, J.; BUCHRIESER, C. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. **FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-**, v. 161, p. 1-20, 2007.

RODAS-SUÁREZ, O. R. et al. Occurrence and antibiotic sensitivity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from oysters, fish, and estuarine water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7410-7412, 2006.

RODRIGUES, D. A. et al. Avaliação da eficiência de três ágaros seletivos no isolamento de *Listeria monocytogenes*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 87-92, 2003.

RODRIGUES, J. et al. Levantamento das características físico-químicas e microbiológicas de queijo minas frescal e mussarela produzidos no entorno de Goiânia-Go. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 9, n. 3, p. 30-34, 2011.

ROOS, T. B. et al. Avaliação microbiológica de queijo colonial produzido na cidade de Três Passos, RS. **Hig. aliment**, v. 19, n. 132, p. 94-96, 2005.

RYSER, E. T.; MARTH, E. H. (Ed.). **Listeria, listeriosis, and food safety**. CRC Press, 2007.

SAFDAR, A.; ARMSTRONG, D. Antimicrobial activities against 84 *Listeria monocytogenes* isolates from patients with systemic listeriosis at a comprehensive cancer center (1955-1997). **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 1, p. 483-485, 2003.

SANT'ANA, A. S. et al. Prevalence, populations and pheno-and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat vegetables marketed in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, n. 1, p. 1-9, 2012.

SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 17, n. 1, 2011.

SCHITTLER, L. et al. Avaliação da incidência de *Listeria monocytogenes* em queijos coloniais. In: **XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 2002.

SCHLECH III, W. F. et al. Epidemic listeriosis—evidence for transmission by food. **New england journal of medicine**, v. 308, n. 4, p. 203-206, 1983.

SCHWAB, J. P.; BECHTEL, M. A. B.; SCHUCH, D. M. T. *Listeria monocytogenes* em queijo colonial artesanal comercializado em Porto Alegre. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 1996.

SILVA, F.; SILVA, D. **Estudo da interferência da sazonalidade na composição centesimal e qualidade microbiológica de queijos coloniais**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso.

SILVA, J. G. **Características físicas, físico-químicas e sensoriais do queijo minas artesanal da canastra**. 2007. 198 f. 2007. Dissertação de mestrado.

SILVA, M. C. D. da et al. Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. **Ciênc Tecnol Aliment**, v. 28, n. 1, p. 226-30, 2008.

SLUTSKER, L.; SCHUCHAT, A. Listeriosis in humans. **FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-**, p. 75-96, 1999.

SRINIVASAN, V. et al. Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms. **Foodborne Pathogens & Disease**, v. 2, n. 3, p. 201-211, 2005.

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

TROXLER, R. et al. Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligerii* and *L. welshimerii* strains. **Clinical Microbiology Infection**, v. 6, p. 525-535, 2000.

VÄLIMAA, A. L.; TILSALA-TIMISJÄRVI, A.; VIRTANEN, E. Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain—a review. **Food Control**, v. 55, p. 103-114, 2015.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 3, p. 584-640, 2001.

VELA, A. I. et al. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from meningoencephalitis in sheep. **International journal of antimicrobial agents**, v. 17, n. 3, p. 215-220, 2001.

WALSH, D. et al. Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 4, p. 517-522, 2001.

WANG, X. M. et al. Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates from retail raw foods. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 153-158, 2013.

WIECZOREK, K.; DMOWSKA, K.; OSEK, J. Prevalence, characterization, and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from bovine hides and carcasses. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 6, p. 2043-2045, 2012.

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

WILLIAMS, R. C.; GOLDEN, D. A. Influence of modified atmospheric storage, lactic acid, and NaCl on survival of sublethally heat-injured *Listeria monocytogenes*. **International journal of food microbiology**, v. 64, n. 3, p. 379-386, 2001.

YAN, H. et al. Prevalence and characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes* isolates in Hebei province of Northern China, 2005–2007. **International journal of food microbiology**, v. 144, n. 2, p. 310-316, 2010.

ZAFFARI, C. B. et al. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, 2007.

ZHANG, W.; JAYARAO, B. M.; KNABEL, S. J. Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 913-920, 2004.

ZHANG, Y. et al. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods. **International journal of food microbiology**, v. 113, n. 1, p. 47-53, 2007.

ZUNABOVIC, M.; DOMIG, K. J.; KNEIFEL, W. Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments—A review. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 351-362, 2011.