

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

***LISTERIA* SPP. E COLIFORMES A 35°C E A 45°C EM AMOSTRAS DE
LEITE CRU REFRIGERADO, PASTEURIZADO TIPO C E QUEIJOS TIPO
MUSSARELA E COALHO EM LATICÍNIOS INSPECIONADOS NO ESTADO
DO MARANHÃO**

Joyce Bitencourt Athayde Lima

São Luís - MA

2010

Joyce Bitencourt Athayde Lima

***LISTERIA* SPP. E COLIFORMES A 35°C E A 45°C EM AMOSTRAS DE
LEITE CRU REFRIGERADO, PASTEURIZADO TIPO C E QUEIJOS TIPO
MUSSARELA E COALHO EM LATICÍNIOS INSPECIONADOS NO ESTADO
DO MARANHÃO**

Dissertação apresentada como
requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Ciências
Veterinárias.

Área: Sanidade Animal

Orientador: Profa. Dra.
Francisca Neide Costa

São Luís - MA

2010

Lima, Joyce Bitencourt Athayde

Listeria spp. e coliformes a 35°C e a 45°C em amostras de leite cru refrigerado, pasteurizado tipo C e queijos tipo mussarela e coalho em laticínios inspecionados no estado do Maranhão / Joyce Bitencourt Athayde Lima. – São Luís, 2010.

61 f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Maranhão, 2010.

Orientador: Profa. Dra. Francisca Neide Costa

Normas para apresentação da Dissertação do Mestrado em Ciências Veterinárias/UEMA
Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em ___/___/___ pela banca examinadora
composta pelos seguintes membros:

1º Membro

2º Membro

Orientador

Aos meus pais dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus minha fonte de fé e força;

Aos meus amigos e familiares, principalmente os que contribuíram diretamente com a realização desta pesquisa;

À minha orientadora Profa. Dra. Francisca Neide Costa.

Ao grupo de pesquisa Medicina Veterinária Preventiva em especial Thamiza Carla e Lidiane Soares;

A minha turma do mestrado em especial Selma Cristina;

Aos amigos Manoel Moura e Fernando Almeida pelo apoio na pesquisa;

À secretária e amiga Caroline Romão;

À amiga Alessandra Nicácio pela hospedagem em São Paulo;

Aos representantes dos laticínios em especial o amigo Paulo Victor;

Aos colegas André, Fabíola, Hermílton e Gardel pelo apoio no município de Imperatriz durante o projeto piloto;

Às colegas dos laboratórios de Microbiologia de Alimentos e Água da Universidade Estadual do Maranhão - UEMA e de Higiene Alimentar da Universidade de São Paulo-USP;

Ao programa PROCAD AMAZÔNIA pela concessão do treinamento na USP;

À Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Maranhão (AGED);

Aos professores Lúcia Alves pela contribuição na elaboração do projeto de pesquisa e José Ribamar da Silva Júnior pela contribuição na dissertação;

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa;

Ao Programa de doutorado interinstitucional – DINTER pelo apoio financeiro na pesquisa;

LIMA, J.B.A. ***Listeria* spp. e coliformes a 35°C e a 45° em amostras de leite cru refrigerado, pasteurizado tipo C e queijos tipo mussarela e coalho em laticínios inspecionados no estado do Maranhão.** [*Listeria* spp. and coliforms at 35 ° C and 45 ° samples of refrigerated raw milk, pasteurized type C and mozzarella cheese curd and dairy products inspected in the state of Maranhao.] 2010. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2010.

RESUMO

Microrganismos como *Listeria* spp. podem ser veiculados por alimentos como o leite e seus derivados onde, o ambiente industrial é o principal fator que contribui para a contaminação pós-pasteurização do leite nos laticínios. Com o objetivo de determinar o Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35°C e a 45°C e identificar as espécies do gênero *Listeria* isoladas em amostras de leite cru refrigerado, pasteurizado e queijo além de, verificar associação entre os microrganismos detectados na matéria-prima (leite) e o produto final (queijo) e conhecer as condições higiênico sanitárias dos laticínios através de um check list, foram analisadas um total de 90 amostras destes produtos. Os resultados para a determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35°C nas amostras de leite cru refrigerado variaram de 23 a >1.100 e para coliformes a 45°C de <3 a >1.100. Para o leite pasteurizado tipo C estes resultados variam de <3 a >1.100 para ambos os microrganismos. Quanto às amostras de queijo estes resultados variaram de 15 a >1.100 para coliformes a 35°C e de <3 a >1.100 para coliformes a 45°C. Para os resultados da pesquisa para identificação das espécies de *Listeria* identificou-se as espécies *L. welshimeri* em oito amostras e *L. seeligeri* em duas amostras das 90 analisadas. Pelo teste exato de Fisher para interdependência observou-se que existiu uma associação estatística significativa entre as variáveis contaminação por coliformes a 35°C, a 45°C e a presença de *Listeria* spp. no leite cru refrigerado, pasteurizado tipo C e queijos. De acordo com os dados encontrados no check list, verificou-se que o número e percentual de conformidades foram superiores ao número e percentual de requisitos não conformes. Portanto, foi possível concluir que as amostras analisadas aprestam condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, estando impróprias para o consumo e riscos de veicular *Listeria* para os consumidores. Além disso, concluiu-se que a matéria-prima uma vez contaminada se não passar por um processo de pasteurização adequado não eliminará os microrganismos indicadores e patogênicos. E, para se obter uma matéria-prima e subprodutos de qualidade microbiológica, devem-se adotar as boas práticas de fabricação desde a obtenção higiênica do leite até o processamento final.

Palavras-chave: *Listeria* spp., coliformes, produtos lácteos, Indústria de laticínios.

LIMA, J.B.A. ***Listeria* spp. and coliforms at 35 ° C and 45 ° samples of refrigerated raw milk, pasteurized type C and mozzarella cheese curd and dairy products inspected in the state of Maranhao.** [*Listeria* sp. e coliformes a 35°C e a 45°C em amostras de leite cru refrigerado, pasteurizado tipo C e queijos tipo mussarela e coalho em laticínios inspecionados no estado do Maranhão]. 2010. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2010.

ABSTRACT

Microorganisms such as *Listeria* spp. can be transmitted by foods such as milk and dairy products where the industrial environment is the main factor that contributes to post-pasteurization contamination of milk in dairy products. Aiming to determine the most probable number (MPN) of coliforms at 35 ° C and 45 ° C and identify the species of the genus *Listeria* isolated from samples of refrigerated raw milk, pasteurized cheese and beyond, to assess the association between the microorganisms detected in raw material (milk) and the final product (cheese) and meet the hygienic sanitary dairy through a check list, we analyzed a total of 90 samples of these products. The results for determining the most probable number (MPN) of coliforms at 35 ° C in refrigerated raw milk samples ranged from 23 to 1,100 and for coliforms at 45 ° C, <3 to> 1,100. For pasteurized type C these results vary from <3 to> 1100 for both microorganisms. Regarding these results cheese samples ranged from 15 to 1,100 for coliforms at 35 ° C and <3 to> 1100 for coliforms at 45 ° C. For the survey results to identify the species of *Listeria* was identified species *L. welshimeri* in eight samples and *L. seeligeri* in two of the 90 samples analyzed. By Fisher's exact test for interdependence was observed that there was a statistically significant association between the variables coliform contamination at 35 ° C, 45 ° C and the presence of *Listeria* spp. in refrigerated raw milk, pasteurized type C and cheeses. According to the data found in the check list, it was found that the number and percentage of compliance were higher than the number and percentage of non-compliant requirements. Therefore, we concluded that the samples getting ready inadequate sanitary conditions, being unfit for consumption and the risk of *Listeria* convey to consumers. Moreover, it was concluded that the raw material once contaminated if not go through a pasteurization process does not eliminate the appropriate indicator microorganisms and pathogens. And to obtain a raw material and products of microbiological quality, one must adopt good manufacturing practices since getting hygienic milk until final processing.

Keywords: *Listeria* spp., coliforms, dairy, dairy Industry.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. Características do leite e do queijo.....	16
2.2. Leite e Queijo como veículo de patógenos.....	18
2.3. Cenário do leite e seus derivados no Brasil e estado do Maranhão.....	19
2.4. Microrganismos indicadores das condições higiênico-sanitárias.....	20
2.5. <i>Listeria</i> spp.....	22
2.5.1. Taxonomia e características.....	22
2.5.2. Fatores que interferem na sobrevivência e o desenvolvimento de <i>Listeria</i> spp.	24
2.5.3. Importância na saúde pública.....	26
2.5.3.1. Epidemiologia da listeriose.....	26
2.5.3.2. Quadro clínico da listeriose.....	27
2.5.3.3. Fontes da <i>L. monocytogenes</i>	28
2.5.3.4. Ocorrência no leite e no queijo.....	29
2.5.3.5. Formas de transmissão.....	30
2.5.3.6. Virulência e Patogenicidade.....	31
2.5.3.7. Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Risco.....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1. Colheita das amostras.....	33
3.2. Análises Microbiológicas do Leite e do Queijo.....	34
3.2.1. Determinação do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes a 35°C e a 45°C.....	34
3.2.2. Pesquisa do gênero <i>Listeria</i>	35
3.2.2.1. Confirmação de <i>Listeria</i> spp.....	35
3.2.2.1.1. Prova de Catalase e Teste de Gram.....	36
3.2.2.1.2. Teste de Motilidade e Redução de Nitrato....	36
3.2.2.1.3. Teste do Vermelho de Metila - Voges Prokauer (VM-VP).....	36
3.2.2.2. Identificação das espécies de <i>Listeria</i>	37
3.2.2.2.1 Produção de β -hemólise.....	37
3.2.2.2.2 CAMP teste.....	37
3.2.2.2.3 Fermentação de carboidratos.....	37
3.3. Check List.....	37
3.4. Teste Estatístico.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38

5. CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXO.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35°C e a 45°C em amostras de leite cru refrigerado, provenientes da plataforma de recepção de laticínios inspecionados, 2010.....	39
Tabela 2: Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35°C e a 45°C em amostras de leite pasteurizado tipo C provenientes de laticínios inspecionados, 2010.....	40
Tabela 3: Número e percentual de amostras de leite pasteurizado tipo C provenientes de laticínios inspecionados que estão de acordo e em desacordo com a legislação vigente para coliformes a 35°C e a 45°C, 2010.....	41
Tabela 4: Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35°C e a 45°C em amostras de queijos tipo mussarela e coalho provenientes de laticínios inspecionados, 2010.....	42
Tabela 5: Espécies do gênero <i>Listeria</i> isoladas de amostras de leite cru refrigerado, pasteurizado tipo C e queijos tipo mussarela e coalho de laticínios inspecionados, 2010.....	44
Tabela 6: Associação entre os microrganismos detectados no leite cru refrigerado, pasteurizado tipo C e queijos tipo mussarela e coalho e as etapas do processamento destes produtos em laticínios inspecionados, 2010.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AO: Ágar Oxford

AP: Ágar Palcam

APPCC: Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

D.O.B: Demanda Biológica de Oxigênio

BPA: Boas Práticas Agrícolas

BPF: Boas Práticas de Fabricação

ASDC: Agar Sangue Desfibrinado de Carneiro

EUA: Estados Unidos da América

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IN: Instrução Normativa

LEB: Caldo para Enriquecimento de Listaria

MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

NMP: Número Mais Provável

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

SIE: Sistema de Inspeção Estadual

SIF: Serviço de Inspeção Federal

ATS: Agar triptose de soja

UFC: Unidades Formadoras de Colônias

VM-VP: Vermelho de Metila-Voges Proskauer

1 INTRODUÇÃO

Os produtos lácteos por sua composição são alimentos indispensáveis para a alimentação humana, pois, são altamente nutritivos, entretanto, são suscetíveis de contaminação (SOUSA et al., 2006). De modo que os cuidados higiênicos para evitar a contaminação do leite e seus derivados devem ser adotados desde a ordenha até a obtenção do produto final (CATÃO & CABALOS, 2002).

Os principais microrganismos indicadores da qualidade higiênico-sanitária do leite e seus derivados são os coliformes a 35°C e a 45°C. Estes microrganismos quando presentes no alimento indicam falhas no processamento ou contaminação pós-processamento em alimentos pasteurizados, pois, não devem sobreviver ao tratamento térmico (SILVA, 2007). A contaminação do queijo por esses microrganismos indica deficiência higiênica durante a elaboração do produto. Além disso, a presença de microrganismos indicadores pode fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, a provável presença de patógenos ou a deteriorização potencial do alimento (LANDEGRAF, 1999).

Microrganismos patogênicos como a *Listeria monocytogenes* podem ser encontrados contaminando leite e seus derivados. A transmissão de *Listeria* spp. pode ocorrer tanto por contato direto quanto indireto, por via oral, ocular, cutânea, respiratória e urogenital. O organismo pode estar presente na secreção nasal e purulenta da epiderme e na urina, em placenta de bovino infectado, em outros tecidos como fezes e sangue. Entretanto, a veiculação desse microrganismo por alimentos é considerada a forma mais importante de desencadear a doença em humanos (MARTH, 1996).

Por esse motivo microrganismos do gênero *Listeria* e a espécie *monocytogenes*, em especial, vêm ocupando nos últimos anos destaque no controle de qualidade na indústria alimentícia, visto às dificuldades de sua eliminação, assim como a possibilidade de causar uma doença grave no consumidor, a listeriose (LANDGRAF, 1999).

A listeriose é uma doença de notificação compulsória e, apesar de poucos registros oficiais de sua presença, representa grande preocupação para as autoridades de saúde pública, pois, apresenta alta taxa de mortalidade e atinge preferencialmente gestantes, idosos e indivíduos imunocomprometidos (GANASOV et al., 2005).

Esta doença caracteriza-se por ser de origem alimentar atípica, despertando grande interesse para a saúde pública. A síndrome apresenta-se com um quadro de alta severidade e natureza não-entérica (meningite, septicemia, aborto). Contudo, existem vários registros de surtos de listeriose caracterizados por síndrome gastrintestinais, envolvendo indivíduos saudáveis (GUERRA et al. 2001).

Catão & Ceballos (2002) sugerem que é freqüente no Brasil a incidência de *Listeria* spp. em leite cru , independente da região geográfica, bem como, em outros países. A maioria dos alimentos responsáveis por casos esporádicos e pelos surtos de listeriose é produzida industrialmente onde, o ambiente industrial é o principal fator que contribui para a contaminação pós-pasteurização em laticínios (FIGUEIREDO, 2000).

A presença de *Listeria* spp. é mais um indicativo de que os produtos analisados ou suas matérias-primas não foram submetidos aos procedimentos higiênico-sanitários e tecnológicos adequados (ZAFFARI et al., 2007). Salas de produção muito úmidas, contaminação do ar acentuada e resfriamento lento favorecem a recontaminação do queijo, principalmente em sua superfície (ESPER et al., 2007). Nas primeiras 24 horas após a produção do alimento, todos os grupos microbianos tendem a se desenvolver e atingir números viáveis, mas posteriormente, somente os psicrotóxicos encontram condições para multiplicação (PINTADO et al., 2001).

Esper et al. (2007) afirmam que a presença dessa bactéria em produtos lácteos pode ser devida a pasteurização ineficiente ou contaminação pós-pasteurização e que a redução da incidência de listeriose requer controles na cadeia produtiva para minimizar a probabilidade de que o alimento seja contaminado.

Apesar da grande freqüência de *Listeria* spp. no leite e seus derivados, principalmente no queijo, relatada por diversos autores, evidenciando a importância desses alimentos na cadeia epidemiológica de transmissão do microrganismo existem poucos estudos relacionados à pesquisa destes, em estabelecimentos inspecionados.

A detecção de *Listeria* spp. em três amostra de leite *in natura* tipo C provenientes da região do Médio Mearim-MA encontrada por Almeida (2008), comprova a ocorrência da bactéria no rebanho bovino do estado. Desta forma, é de extrema importância a investigação da presença da *Listeria* spp. em leite e seus derivados, bem como, dos microrganismos indicadores de contaminação fecal no leite e derivados produzidos no estado do Maranhão.

Existe um considerável número de laticínios sob inspeção no estado, com produção diversificada de derivados lácteos: doces, sorvetes e queijos. São onze laticínios sob inspeção com produção de queijo, sendo quatro sob o Serviço de Inspeção Estadual (SIE) e sete sob o Serviço de Inspeção Federal (SIF). Dos laticínios produtores de queijo sob SIE um está localizado no município de Itapecuru Mirim, um no município de Cidelândia, outro no município de Açailândia e um no município de Imperatriz. Já os laticínios sob o SIF, um está localizado no município de Itapecuru Mirim, quatro no município de Açailândia, um no município de São José de Ribamar e o outro em Nova Olinda do Maranhão. Estes laticínios têm como principal produção os queijos tipo coalho e tipo mussarela.

O trabalho teve como objetivo determinar o Número Mais Provável de coliformes a 35°C e a 45°C, identificar as espécies do gênero *Listeria* isoladas em amostras de leite cru refrigerado, pasteurizado tipo C e queijos tipo mussarela e coalho; verificar associação entre os microrganismos detectados na matéria-prima (leite) e o produto final (queijo) e conhecer as condições higiênicas sanitárias dos laticínios através de check list.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características do leite e do queijo

Segundo a Instrução Normativa (IN) número 51 de 18 de setembro de 2002 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) entende-se por leite, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas; e por leite cru refrigerado, o produto, refrigerado e transportado da propriedade rural para um posto de refrigeração de leite ou estabelecimento industrial adequado em carro-tanque isotérmico para ser processado (BRASIL, 2002).

Já o leite pasteurizado tipo C, é o leite fluido elaborado a partir do leite cru, refrigerado na propriedade rural, que apresente as especificações de produção, de coleta e de qualidade da matéria-prima e que tenha sido transportado a granel até o estabelecimento processador. O produto deve ser classificado quanto ao teor de gordura como integral, padronizado a 3% m/m (três por cento massa por massa), semidesnatado ou desnatado, submetido à temperatura de 72 a 75°C (setenta e dois a setenta e cinco graus Celsius) durante 15 a 20s (quinze a vinte segundos), em equipamento de pasteurização a placas; resfriado imediato em aparelhagem a placas até a temperatura igual ou inferior a 4°C (quatro graus Celsius) e envase no menor prazo possível, sob condições que minimizem contaminações (BRASIL, 2002).

O leite é considerado um alimento complexo por possuir alto valor biológico, uma vez que é composto de carboidratos, proteínas, vitaminas e sais minerais. É utilizado para o preparo de derivados, os quais mantêm em sua composição praticamente todos os componentes nutritivos do leite (OLIVEIRA et al., 2001). Devido à riqueza de sua composição, o leite é um excelente meio de cultivo para a maioria dos microrganismos sendo um produto extremamente perecível que pode sofrer alterações nas suas qualidades físico-químicas e microbiológicas tornando-se, nessas situações, inadequado para o consumo (NETTO et al., 2005).

De acordo com a Portaria N° 146, de 7 de março de 1996 do MAPA, entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, enzimas específicas de bactéria específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL, 1996).

Dentre os queijos produzidos no nordeste brasileiro, o queijo tipo coalho é o de maior tradição e um dos mais difundidos, apresentando elevado consumo nos estados dessa região (BENEVIDES, 1999). Apesar da grande importância socioeconômica do queijo tipo coalho para a região nordeste, muitas vezes o produto é elaborado sem que sejam observados os padrões higiênico-sanitários. Dessa forma, seu consumo pode oferecer consideráveis riscos à saúde pública (LEITE JR. et al., 2000).

Já o mussarela é o queijo de massa filada mais consumido no mundo (FURTADO, 1991). É definido segundo a Portaria N° 364, de 4 de setembro de 1997 do MAPA, como o queijo que se obtém por filtragem de uma massa acidificada, (produto intermediário obtido por coagulação do leite por meio de coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas), completada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas. É classificado como um queijo de média, alta ou muito alta umidade e extragordo, gordo ou semigordo (BRASIL, 1997).

No Brasil, a produção e o consumo de queijo mussarela têm apresentado índices elevados de crescimento nos últimos anos. Porém, alguns problemas têm limitado esse crescimento, sendo a sazonalidade da produção leiteira o principal deles, uma vez que, durante os meses de abril a setembro (entressafra), tem-se um menor volume de leite disponível para a produção de queijos e, conseqüentemente, uma diminuição na oferta do produto no mercado (PRIMO, 1996).

2.2 Leite e Queijo como veículo de patógenos

A maioria dos alimentos, principalmente os de origem animal, como o leite e produtos lácteos, está sujeita a contaminação por microrganismos capazes de produzir algumas doenças no ser humano. Isto pode ocorrer devido uma deficiência na higiene durante o processo de obtenção, manipulação, fabricação e conservação dos mesmos (ALMEIDA & FRANCO, 2003).

Dentre os produtos derivados do leite, o queijo é considerado um veículo freqüente de patógenos de origem alimentar sendo que a contaminação microbiana desse produto assume destacada relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças veiculadas por alimentos (FEITOSA, 2003).

A qualidade do leite cru e por conseqüência, dos leites pasteurizados, assim como de derivados, está relacionada a vários fatores como deficiências no manejo e higiene da ordenha, índices elevados de mastites, manutenção e desinfecção inadequadas dos equipamentos, refrigeração ineficiente ou até inexistente, e mão de obra desqualificada (BRAMLEY & MCKINNON, 1990).

Tem sido cada vez mais exigida a qualidade de produtos lácteos pelo mercado consumidor, agregada aos recursos tecnológicos das agroindústrias, as quais necessitam aprimorar suas estratégias para obter uma melhora na produção desde a obtenção da matéria-prima, processamento, manipulação do produto, armazenamento até chegar à mesa do consumidor. A segurança quanto à qualidade higiênico-sanitária dos produtos alimentícios deve ser estabelecida em todas estas etapas (LAMB & FREO, 2008).

Além disso, a qualidade da matéria-prima é uma das formas de elevar a competitividade do setor alimentício, de forma a obter melhores preços junto à indústria, uma vez que, aumenta a produtividade, a vida útil dos equipamentos, reduz custos de mão-de-obra e melhora a qualidade do produto (SABÓIA, 1999).

Dada a importância da matéria-prima, a utilização das Boas Práticas Agrícolas (BPA) e a implantação do sistema de Análise de Perigos e Pontos

Críticos de Controle (APPCC) no campo, torna-se importante para elevar a qualidade do leite que chega à indústria, resultando no aumento da qualidade de todos os derivados (NASSU et al., 2007). Assim como, a utilização das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e APPCC no controle de qualidade dos alimentos durante o processo industrial, garantindo a segurança e inocuidade dos alimentos (NASCIMENTO & BARBOSA, 2007).

As Portarias N° 326 de 30 de junho de 1997 e N° 368 de 04 de setembro de 1997 do Ministério da Saúde estabelecem o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação (BPF) para estabelecimentos elaboradores e industrializadores de alimentos. Sendo, portanto, as BPF obrigatórias pela legislação para todas as indústrias e estabelecimentos de alimentos (BRASIL, 1997). Já a Portaria N° 46 de 10 de fevereiro de 1998 do MAPA, institui o sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) a ser implantado, gradativamente, nas indústrias de produtos de origem animal sob regime do serviço de inspeção federal – SIF (BRASIL, 1998).

2.3 Produção leiteira no Brasil e estado do Maranhão

A abertura dos mercados, resultante da globalização, fez com que os setores produtivos mundiais enfrentassem o grande desafio da competitividade. O setor leiteiro brasileiro apresenta problemas de qualidade da matéria-prima e, por isso, perde em competitividade (RIBEIRO et al., 2000).

O Brasil é o sexto maior produtor de gado de leite no mundo. O volume médio por propriedade passou de 28 litros/dia para 52 litros/dia no ano de 2008, que resulta em um crescimento de 85,2%. Apesar do alto crescimento, a produção por propriedade ainda é muito baixa em relação a alguns países, como os Estados Unidos, que a média supera 2 mil litros/dia. Na Nova Zelândia e Austrália, a média diária é de 3 mil litros por fazenda. No Brasil o mais comum são sistemas de produção extensivos ou semi-extensivos, com animais de baixa produção e pouca suplementação volumosa no período da seca (ZOCCAL, 2008).

A maioria dos produtores brasileiros – cerca de 66,6% – produzem até 50 litros de leite por dia, equivalentes a 30,2% da produção nacional; os 34,4% restantes produzem acima de 50 litros por dia, representando 69,8% do total (BITENCOURT et al., 2000).

Dados do Censo 2006 mostram que a produção de leite no país foi de 25 bilhões naquele ano. Comparando com o censo de 1996, ou seja, no período de 10 anos, esse volume representa um crescimento de 6,9 bilhões de litros com crescimento médio anual de 3,7%. Os estados do Acre, Pará e Maranhão foram os que mais cresceram, em torno de 150% (ZOCCAL, 2008).

De acordo com informações do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no ano de 2008, o rebanho bovino no estado do Maranhão era composto de 6.816.338 cabeças, sendo 549.266 vacas ordenhadas e uma produção leiteira de 365.564 litros/ano. O município de Itapecuru Mirim aparece com um rebanho de 22.855 bovinos, dos quais 2.028 são bovinos leiteiros com uma produção de 1.371 litros de leite/ano. Já o município de Nova Olinda do Maranhão, aparece com 42.890 cabeças de bovinos, 3.511 vacas ordenhadas e uma produção leiteira de 2.984 litros de leite/ano. Enquanto que, o município de São José de Ribamar aponta 1.080 cabeças de bovinos, 142 cabeças de vacas ordenhadas e uma produção leiteira de 205 mil litros.

Segundo o censo agropecuário de 2006 o estado do Maranhão tem 16.537 estabelecimentos produtores de leite, sendo a quantidade de leite cru beneficiado nestes estabelecimentos, correspondente a 10.575 litros. Onde os municípios de Nova Olinda do Maranhão e São José de Ribamar produzem 96 mil litros e 1 mil litros de leite cru beneficiado, respectivamente. O censo não mostra dados referentes a este indicador para o município de Itapecuru Mirim, bem como, dados referentes ao leite pasteurizado para ambos os municípios.

2.4 Microrganismos indicadores das condições higiênico-sanitárias

Os principais microrganismos indicadores da qualidade higiênico-sanitária do leite e seus derivados como o queijo são os coliformes a 35°C (totais) e coliformes a 45°C (fecais). Esses microrganismos quando presentes

indicam falhas higiênicas ao longo do processamento e armazenamento do produto ou deficiência do tratamento térmico (PICOLI et al., 2006). Além disso, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deteriorização potencial do alimento (LANDEGRAF, 1999).

O grupo dos coliformes totais é um subgrupo da família *Enterobacteriaceae* e que inclui 44 gêneros e 176 espécies. No grupo dos coliformes totais estão as enterobactérias capazes de fermentar a lactose com formação de gás em 24 a 48 horas a 35°C. Mais de 20 espécies se encaixam nessa definição, dentre as quais estão tanto bactérias originárias do trato gastrointestinal de humanos e outros animais de sangue quente, como também bactérias não entéricas (ZOCHE et al., 2002).

O grupo dos coliformes termotolerantes, comumente chamado de coliformes fecais, é um subgrupo dos coliformes totais, restrito aos membros capazes de fermentar a lactose em 24 horas a 44,5-45,5°C, com produção de gás. Essa definição objetivou, em princípio, selecionar apenas as enterobactérias originárias do trato gastrointestinal (*Escherichia coli*), porém, atualmente sabe-se que o grupo inclui membros de origem não fecal (várias cepas *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter freundii*). Em função disso, o termo “coliformes fecais” tem sido gradativamente, substituído por coliformes termotolerantes (SILVA et al., 2007).

A contaminação por coliformes no leite *in natura* é consideravelmente mais elevada do que no leite pasteurizado como verificado por Moraes et al. (2005), que estudando a qualidade microbiológica de leite *in natura* produzido em cinco municípios do estado do Rio Grande do Sul detectaram a presença de coliformes totais em todas as propriedades.

Almeida (2008) pesquisando as condições higiênicas sanitárias do leite *in natura* e pasteurizado tipo C provenientes da bacia leiteira do Médio Mearim, MA encontrou nas 30 amostras analisadas, 29 (96,66%) e 27 (90%) amostras, respectivamente, fora dos padrões microbiológicos para coliformes a 35°C e a 45°C.

Quanto à presença desses microrganismos no queijo, estes sido encontrados com freqüência por diversos pesquisadores. Zaffari et al. (2007), avaliando a qualidade bacteriológica de queijos no Rio Grande do Sul encontrou coliformes em todas as amostras analisadas, sendo a contagem de coliformes totais entre 3,18 e $>6 \log.UFC g^{-1}$ e coliformes fecais entre 2,73 e 3,7 $\log.UFC g^{-1}$.

Duarte (2005) relata os índices de contaminação por coliformes a 35°C em 127 amostras de queijo analisadas, encontrou 56 (44,1%) amostras com contagens maiores de 500UFC/g, estando o produto fora dos padrões de qualidade higiênico-sanitários determinados pela legislação vigente.

Vale ressaltar que os coliformes fazem parte de um subgrupo de bactérias que atuam como indicadores de contaminação fecal, devido à sua ocorrência restrita às fezes do homem e de animais homeotérmicos, sua presença evidencia o risco da presença de organismos patogênicos de origem fecal, tendo como principal representante deste grupo a *Escherichia coli* (SILVA JR., 1995).

2.5 *Listeria* spp.

2.5.1 Taxonomia e características

As primeiras descobertas sobre o gênero *Listeria* datam de 1924, quando E.G.D. Murray isolou bastonetes Gram positivos, a partir do sangue de animais de laboratório que não se classificavam em nenhum gênero estudado até então, (HOF, 2003). Em 1940, Piere, trabalhando com amostras de ambientes, de alimentos e de sangue humano, incluiu o bastonete Gram positivo, catalase positivo, no gênero *Listeria* (ALLERBERGER, 2002).

Seeliger & Jones (1996) descrevem o gênero *Listeria* como bactérias Gram positivas, não esporogênicas, móveis a temperatura entre 20°C e 25°C, apresenta crescimento entre 1°C e 45°C, com ótimo desenvolvimento na temperatura entre 30°C e 37°C. Multiplica-se em atividade de água (Aw) mínima de 0,90, com ótimo entre 0,94 e 0,99 e toleram potencial hidrogeniônico

(pH) entre 4,3 e 9,6 (FABER & HARWING, 1996). Segundo Faber & Peterkin (1991), bactérias do gênero *Listeria* são psicotróficas e podem se multiplicar em temperaturas entre - 4°C e 50°C.

A característica psicotrófica depende da integridade celular e do sistema de transporte energético resistente ao frio, que estimula o metabolismo sob baixas temperaturas, propiciando altas concentrações de substratos intracelulares e uma fase lag prolongada, em temperaturas de refrigeração (OLIVEIRA, 1993). Além disso, bactérias do gênero *Listeria* podem ocorrer isoladamente em cadeias curtas ou arranjadas em ângulos formando “V” entre si ou em grupos que se mantêm paralelos ao longo dos eixos (TODAR, 2003).

Em relação às características bioquímicas, a *Listeria* spp. é catalase positiva, oxidase negativa, móvel a 20°C; algumas espécies são hemolíticas em ágar sangue (*L. monocytogenes*, *L. seeligeri* e *L. ivanovii*), D-xilose negativo, D-manitol negativo, L-ramnose positivo, metil-D-manosídio positivo, fermentam a glicose, vermelho de metila positivo, Voges Proskauer positivo, indol negativo, esculina positivo e não reduzem o nitrato (LOVETT & TWEDT, 1988).

Antes do surto ocorrido em recém-nascidos, na Alemanha em 1949, a bactéria não representava grande importância clínica. Classificada, inicialmente, como *Corynebacterium*, foi identificada em surtos ocorridos na Alemanha, sendo, a seguir, corretamente classificada dentro do gênero *Listeria*, em função de sua motilidade incompatível com o gênero *Corynebacterium*. Foi nesse momento que se iniciou o estudo da listeriose humana (ARRUDA et al., 2007).

Por muito tempo acreditou-se existir uma única espécie de *Listeria*, denominada *monocytogenes*. Mas, a partir de 1983, métodos bioquímicos e mais recentemente, métodos moleculares, classificaram outras espécies da bactéria (ROCOURT et al., 2003).

A *Listeria monocytogenes* é considerada a única espécie patogênica diferente das demais: *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. ivanovii*, *L. grayi* e *L. murray*, esta última considerada atualmente pertencente à espécie *grayi* (HOF, 2003). Todavia, Jay (2005), afirma que *L. monocytogenes* é o agente etiológico de aproximadamente 98% dos casos que ocorrem em

peessoas e 85% dos casos que ocorrem nos animais, mas pelo menos três casos de enfermidade em seres humanos foram causados por *L. ivanovii* e somente um por *L. seeligeri*. Todar (2003) afirma que *L. ivanovii* também é patogênica, entretanto, causadora de doença apenas em animais, principalmente em ovinos.

A *L. monocytogenes* está representada por 13 sorovares, alguns dos quais são comuns a *L. innocua* e *L. seeligeri*. Embora *L. innocua* esteja representada somente por três sorovares, muitas vezes esta é considerada uma variante não patogênica de *L. monocytogenes* (JAY, 2005). A grande heterogeneidade de *L. monocytogenes* pode está relacionada com o grande número de hospedeiros animais nos quais é capaz de multiplicar-se (MANTILLA et al., 2009).

Essa espécie apresenta mobilidade devido à presença de flagelos peritríquios, apresentando movimento característico, denominado tombamento ou turbilhonamento que auxilia na sua identificação, mas a 37°C a produção de flagelos é reduzida, notavelmente (TODAR, 2003).

2.5.2 Fatores que interferem na sobrevivência e o desenvolvimento de *Listeria* spp.

São vários os fatores que podem afetar o desenvolvimento, a sobrevivência e a multiplicação da *Listeria* em alimentos, dentre eles: temperatura, pH, atividade de água, cloreto de sódio, nitrito de sódio, conservantes, atmosfera modificada, ação intracelular da bactéria entre outros (KASNOWSKI et al., 2007).

As bactérias do gênero *Listeria* suportam repetidos congelamentos e descongelamentos (GERMANO & GERMANO, 2001). Além da sua característica psicotrófica, diversos autores mencionam a sua capacidade de termotolerância (LOUGUERCIO et al., 2001).

A característica de termotolerância observada em um surto ocorrido no ano de 1983, em Boston, relacionado com o consumo de leite pasteurizado provocou dúvidas a respeito da eficácia da pasteurização e fez com que alguns

autores levantassem a hipótese de que a posição intracelular de *L. monocytogenes* nos leucócitos lhe conferia alguma proteção térmica (FLEMING et al., 1985). Atualmente, considera-se que estes dados conduziram a conclusões controversas devido a metodologia adotada nos ensaios (DONNELLY et al., 1987). Segundo Lou & You-sef (1999), de uma maneira geral, os procedimentos convencionais de pasteurização do leite são considerados adequados para a inativação de *L. monocytogenes*.

Estudos indicam que a localização intracelular da bactéria é uma das principais causas que dificultam a terapêutica por meio de antibióticos, embora *L. monocytogenes* seja sensível a grande parte deles (HOF, 2003). Recentemente alguns relatos têm descrito cepas resistentes a clorafenicol, eritromicina, estreptomicina, tetraciclina, vancomicina e trimetropim. Esse perfil de resistência também tem sido comum em cepas isoladas de alimentos, indicando que a bactéria está se tornando, lentamente, resistente aos antibióticos (AURELI, 2003).

Quanto ao pH, a multiplicação de *L. monocytogenes* em valores de pH baixos depende de fatores como, temperatura de incubação, a natureza do agente acidificante e a composição do substrato (KOUTSOUMANIS & SOFOS 2004). Foi relatado a ocorrência do microrganismo em pH 4,3 e 4,8, segundo Louguercio et al. (2001), embora o pH ótimo para crescimento esteja numa faixa entre 6,0 e 8,0 (MARTINS et al., 1997).

Em relação à concentração de NaCl, observou-se a sobrevivência, desse patógeno em 10,5% e 13% quando incubada a 37°C por 15 a 10 dias, respectivamente. Em concentrações de 20 e 30% de NaCl, o tempo de sobrevivência foi reduzido para cinco dias. E, em temperatura reduzida a 4°C, a bactéria pode sobreviver por mais de 100 dias em concentrações entre 10,5 e 30,5% de NaCl. A atividade de água é outro fator de interferência na sobrevivência e desenvolvimento de *Listeria*. O valor ótimo de crescimento é próximo de 0,97 Aw; mas, já foi observada sua sobrevivência em alimentos desidratados com atividade de água inferior a 0,93 Aw (FRANCO & LANDEGRAF, 1996).

Outro fator de importância é a capacidade da bactéria de tolerar concentrações de nitrito de sódio de ordem de 15ppm, máximo permitido nos Estados Unidos (UBOLDI EIROA, 1990). Além disso, o crescimento de *Listeria* é estimulado por baixas concentrações de oxigênio e pela suplementação com dióxido de carbono (LOUGUERCIO et al., 2001). E ainda, apresenta capacidade de resistência à nisina, comprometendo a eficiência desse inibidor de crescimento bacteriano aprovado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para uso na indústria de alimentos (MARTINS et al., 1997).

2.5.3 Importância na saúde pública

2.5.3.1 Epidemiologia da listeriose

A listeriose apresenta distribuição geográfica mundial, sendo aparentemente mais freqüente nos climas temperados que nos tropicais. Ocorre em todas as espécies de animais domésticos, sendo mais comum em ruminantes, coelhos e aves (CORRÊA & CORRÊA, 1992). Constitui uma doença de notificação compulsória e, apesar de poucos registros oficiais de sua ocorrência, representa grande preocupação para as autoridades de saúde pública, uma vez que tem alta taxa de mortalidade e atinge, preferencialmente, gestantes, idosos e indivíduos imunocomprometidos (GASANOV et al., 2005).

O primeiro surto de listeriose humana veiculada por alimentos data de 1979, nos EUA, quando 20 pacientes internados apresentaram a doença atribuída ao consumo de saladas de alface, tomate e salsa (LOUGUERCIO et al., 2001). Mas, o surto que despertou os microbiologistas para o problema, ocorreu no Canadá, e o alimento envolvido foi a salada de repolho cru que era cultivado em campos fertilizados com fezes de ovinos, portadores da doença (KASNOWSKI et al., 2007).

Nos EUA, são confirmados 7,4 casos por milhão de habitantes/ano de listeriose invasiva; 16 casos de listeriose perinatal a cada 100 mil nascimentos, sendo 23,0% responsáveis por morte fetal, representando 2,0% das mortes fetais em geral. No Chile, a incidência entre os anos de 1982 a

1987 foi de 0,42% por mil nascidos vivos, com uma letalidade de 17,6% (CISTERNAS et al., 2002).

O número de casos informados de listeriose vem aumentando, provavelmente devido a um melhor diagnóstico laboratorial, juntamente com um aumento da população suscetível; alta prevalência da bactéria no ambiente e hábitos de manuseio preparo e armazenamento dos alimentos (CRESPO et al., 2003).

Nos últimos anos vem sendo utilizado o método da sorotipagem para o diagnóstico de listeriose, entretanto este apresenta limitações em relação ao tempo exigido para a obtenção de resultados e, principalmente, em relação a sua eficiência na detecção de todos os sorotipos presentes nas amostras analisadas (BEUMER et al., 2003).

A dificuldade de recuperar organismos envolvidos nos surtos, a subnotificação e a demora na realização das análises convencionais são alguns dos importantes fatores que retardam ou impedem a notificação em situações de emergência (ARRUDA et al., 2007). Todavia, técnicas moleculares vêm promovendo um grande avanço na precisão e rapidez para a obtenção de dados relativos ao patógeno (BUCHRIESER et al., 2003).

2.5.3.2 Quadro clínico da listeriose

A listeriose ocorre em qualquer faixa etária, sendo mais freqüente em recém-nascidos, crianças e pessoas idosas. Nestes dois últimos a mortalidade é bastante alta, em média de 70% (CASTRO, 1989).

No início da infecção, a listeriose assemelha-se a um resfriado comum, acompanhado de febre, dores musculares e distúrbios gastrintestinais. Quando a infecção atinge o sistema nervoso, podem ocorrer sintomas como dor de cabeça, torcicolo, confusão mental, perda de equilíbrio e convulsões (ARRUDA et al., 2007).

A septicemia, geralmente sem infecção localizada, caracteriza-se por febre, náuseas, vômito e mal-estar. Pode ainda causar infecções localizadas como conjuntivite, dermatite e linfadenite, que podem originar

complicações como: peritonite, colédoco, cistite, hepatite, pleurite, abscesso esplênico, pericardite, osteomielite e endoftalmite (VASQUEZ-BOLAND et al., 2001).

A infecção no sistema nervoso central é caracterizada por tropismo pelo cérebro e medula, o que justifica a alta incidência de meningite e meningoencefalite, acompanhada por febre alta, rigidez na nuca e desordens motoras. Tem sido observada também endocardite em 8,0% dos pacientes adultos acometidos, os quais apresentam aproximadamente 50,0% de taxa de mortalidade. Adultos saudáveis que se infectam por *L. monocytogenes* podem apresentar gastroenterite febril autolimitante, após 24 a 48 horas de incubação (DOGANAY, 2003).

Em mulheres grávidas os sintomas mais comuns são: febre, dores de cabeça, mialgia, artralgia e mal-estar (DOGANAY, 2003). Mas pode haver invasão do feto e, dependendo do estágio em que a gravidez se encontra, pode ocorrer aborto, parto prematuro, nascimento de natimorto, septicemia neonatal ou meningite, em recém nascido (FRANCO & LANDEGRAF, 1996).

A listeriose do recém-nascido, também conhecida como granulomatose infantisséptica, apresenta sinais clínicos variados como: dispnéia, falência cardíaca, cianose, regurgitação de líquidos, vômitos; convulsões, choro baixo; expulsão precoce do mecônio, fezes com muco, hiper ou hipotermia (VARNMAN & EVANS, 1996).

2.5.3.3 Fontes da *L. monocytogenes*

A *L. monocytogenes* encontra-se amplamente disseminada na natureza. O homem, os animais e o ambiente servem como reservatórios. No ser humano, o isolamento a partir de indivíduos assintomáticos, provavelmente, é consequência da colonização do trato intestinal (FRANCO & LANDEGRAF, 1996). Pode ser encontrada no solo, na vegetação, na água e no esgoto. Foi isolada de no mínimo 37 espécies de mamíferos, assim como de 17 espécies de pássaros e possivelmente em algumas espécies de peixes e crustáceos (HOF, 2003).

De acordo com a literatura, 32% dos casos de listeriose são atribuídos ao consumo de alimentos crus e processados contaminados (GRESPO et al., 2003), incluindo-se leite e queijos, supostamente pasteurizados; carnes e produtos cárneos; vegetais crus; frutos do mar e pescado (LACIR et al., 1999).

Alimentos processados devem ser considerados fontes potenciais do patógeno devido sua ampla distribuição nos ambientes de processamento e pela sua capacidade de sobrevivência e multiplicação em temperaturas de refrigeração (ALPAS & BOZOGLU, 2003). A colonização de equipamentos e utensílios tem sido relatada como a principal causa de contaminação do produto acabado (NAKAMURA et al., 2004).

Quando o microrganismo está presente nos alimentos, sua concentração é geralmente baixa, cerca de 10^2 células/mL ou grama de alimento, sendo que, muitas vezes, seu crescimento pode ser inibido pela microbiota acompanhante, porém, quando em condições adequadas, o patógeno pode atingir altas contagens (DYKES, 2003). Estima-se que uma única célula de *L. monocytogenes* possa se constituir dose infectante (ROCOURT et al., 2003).

Estudos concluíram que o perfil genético do microrganismo no produto acabado não é o mesmo da contaminação inicial da matéria-prima, mas, em muitos casos, é semelhante aos isolados de máquinas e utensílios utilizados na produção (AGUADO et al., 2004).

2.5.3.4 Ocorrência no leite e no queijo

A ocorrência de *L. monocytogenes* tem sido relatada em diversos estados do Brasil, apesar da sua notificação não ser freqüente no país. Foi encontrada no leite *in natura* em 12,7% das amostras analisadas por Moura et al. (1993), no estado de São Paulo e, em 30% das amostras analisadas por Catão & Ceballos (2002), no estado da Paraíba.

Também foi detectada presença desse microrganismo em queijos analisados nos estados do Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Tocantins,

Ceará, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba e Amazonas com ocorrência variando entre 9,0 e 64,0% das amostras analisadas (RAMOS & COSTA, 2003).

Além disso, Branco et al. (2003), encontraram presença de *L. monocytogenes* em cinco (5,9%) das 84 amostras de queijo analisadas, sendo este produzido industrialmente. Zaffari (2007) encontrou 13 (16%) das 80 amostras de queijo analisadas contaminadas por *Listeria* spp.

No estado do Maranhão, Almeida (2008) pesquisando as condições higiênicas sanitárias do leite *in natura* e pasteurizado tipo C, provenientes da bacia leiteira do Médio Mearim, não isolou *Listeria* spp. nas amostras de leite pasteurizado tipo C, mas detectou *Listeria* spp. em três (10%) das 30 amostras de leite *in natura*.

No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde, nº 12, de 2 de janeiro de 2001, determina ausência de *L. monocytogenes* em 25g de queijos de diferentes (BRASIL, 2001). Assim como, a Portaria N° 146, de 07 de março de 1996 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), que contempla o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos, que também determina a ausência de *L. monocytogenes* em 25g do produto (BRASIL, 1996).

Já nos países desenvolvidos as legislações vigentes não permitem a presença do microrganismo em nenhum tipo de alimento para consumo humano (ROCCOURT et al., 2003).

2.5.3.5 Formas de transmissão

A transmissão pode ocorrer tanto por contato direto como indireto com fontes contaminadas; por via oral, ocular, cutânea, respiratória e urogenital (SILVA, 1996). Os portadores assintomáticos podem eliminar o microrganismo nas fezes por um tempo indeterminado, aumentando o risco de transmissão de pessoa a pessoa (NASCIMENTO & CULLOR, 1994).

Quanto à transmissão pela ingestão de alimentos contaminados, a resistência a fatores adversos como a habilidade do microrganismo em se multiplicar à temperatura de refrigeração, podendo ser recuperado após longos períodos de congelamento, indica um fator crítico, pois, o processo mais freqüente usado na conservação de alimentos de origem animal é a refrigeração (VASQUEZ-BOLAND et al., 2001).

2.5.3.6 Virulência e Patogenicidade

A *L. monocytogenes* após entrar no organismo hospedeiro por via oral, atinge o trato intestinal, aderindo e invadindo a mucosa. Em seguida, a célula bacteriana é fagocitada por macrófagos e após a lise da membrana, é liberada no citoplasma da célula do hospedeiro onde se multiplica rapidamente (GERMANO & GERMANO, 2001).

A bactéria produz algumas toxinas, dentre estas se destacam as toxinas hemolíticas (hemolisinas) e as toxinas lipolíticas; responsáveis pelo aumento na produção de monócitos e pela depressão na atividade de linfócitos. Dentre as toxinas já isoladas estão uma toxina hemorrágica, uma fração pirogênica e uma toxina capaz de causar alterações eletrocardiográficas. Além disso, os componentes da parede celular parecem estar também envolvidos no mecanismo de patogenicidade (MARTH, 1996).

Franco & Landegraf (1996), destacam como fatores de virulência a listeriolisina O (LLO), que tem como função mediar a lise dos vacúolos que contém a célula bacteriana; fosfolipases, que hidrolisam os lipídeos da membrana causando ruptura da célula; p60 (60KDa), que é uma proteína associada à capacidade invasiva da bactéria; internalina, também associada ao mecanismo de invasão celular do hospedeiro.

A tipagem de *L. monocytogenes* é necessária para identificação de fatores de virulência, que determinam a patogenia da cepa (ARRUDA et al., 2007). Alguns achados revelam que o sorotipo que provoca a doença não é o mesmo encontrado em alimentos incriminados em surtos, o que pode estar

relacionando à diferença de capacidade de sobrevivência e adaptação de determinados sorotipos no alimento (WAGNER & ALLBERGER, 2003).

Entre os sorotipos virulentos, como tem sido demonstrado pelos estudos de patogenicidade em animais de laboratório, está bem evidenciado que o 1 e o 4 causam a maioria das infecções humanas (KASNOWSKI et al., 2007).

2.5.3.7 Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Risco

A qualidade sanitária dos alimentos, principalmente os de origem animal, está intimamente ligada à monitoração e controle dos riscos de contaminação em toda a cadeia produtiva. Este controle é eficaz quando executado por mão-de-obra treinada, capacitada e habilitada para tal, sendo supervisionada rigorosamente por técnico especializado (FORSYTHE, 2002). Por isso, a importância da adoção das ferramentas de controle da qualidade na produção de alimentos. As Boas Práticas de Fabricação (BPF) e o APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) mostram-se eficientes no controle da listeriose e são aplicados e reconhecidos em âmbito mundial (CHOI & HONG, 2003).

Visando essa importância, o MAPA, através da Instrução Normativa Nº 9, de 8 de abril de 2009 contempla os Procedimentos de Controle da *L. monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo com o objetivo de monitorar e assegurar a inocuidade destes produtos.

A análise de risco é uma poderosa ferramenta delineada a partir do estudo de dados obtidos ao longo da cadeia produtiva, do cultivo até o consumo e sua relação com as doenças veiculadas por alimentos, com a finalidade de mensurar o impacto de determinado alimento contaminado. Para *L. monocytogenes* a análise de risco propõe-se a determinar três principais aspectos relacionados a alimentos prontos para o consumo: análise de risco para populações suscetíveis; análise de risco para diferentes alimentos, quanto à capacidade de multiplicação da bactéria e; determinar limites de contagem

microbiana, quando da não presença em 25 gramas ou mililitros de alimentos (ARRUDA et al., 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Colheita das amostras

As amostras foram adquiridas de três laticínios inspecionados, localizados no Estado do Maranhão, sendo dois sob responsabilidade do Serviço de Inspeção Federal (SIF) e um inspecionado pelo Serviço de Inspeção Estadual (SIE). Os laticínios foram identificados como laticínio 01, 02 e 03. O laticínio 01(SIF) encontra-se localizado no município de São José de Ribamar, MA, o laticínio 02 (SIF) localizado no município de Nova Olinda do Maranhão, MA, e o laticínio 03 (SIE) encontra-se localizado no município de Itapecuru Mirim, MA. A colheita das amostras ocorreu no período de junho a dezembro de 2009 e de janeiro a março de 2010. Para cada laticínio foram selecionados cinco lotes e destes, colhidas duas unidades analíticas de amostras de leite cru refrigerado, duas de leite pasteurizado tipo C e duas de queijo (do mesmo lote), resultando em 30 unidades analíticas de amostras por laticínio, totalizando 90 analisadas. As amostras do leite cru refrigerado foram colhidas em frascos de 250mL, previamente esterilizados, obtidas diretamente do tanque de recepção, e as amostras de leite pasteurizado tipo C foram colhidas diretamente do pasteurizador. Já as amostras de queijo foram colhidas após embalagem de 250g, própria das indústrias de laticínios. As amostras foram estocadas em caixas isotérmicas, contendo gelo, a uma temperatura de aproximadamente 4,4°C, monitorada pelo termômetro. A partir de então, foram transportadas ao laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, onde foram analisadas quanto à determinação do NMP de coliformes a 35°C e a 45°C, de acordo com o Manual de Métodos de Análises Microbiológica de Alimentos (SILVA et al., 2007). A pesquisa de *Listeria* spp. foi realizada, utilizando-se a metodologia adotada pelo Manual de Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para o controle de Produtos de

Origem Animal e Água, Instrução Normativa N° 62 de 26 de agosto de 2003–MAPA (BRASIL, 2003).

O tipo de queijo analisado foi determinado de acordo com a produção dos laticínios, que ocorre mediante a demanda do mercado consumidor. Partindo desse princípio, o tipo de queijo analisado dos laticínios 01 e 03 foi queijo tipo mussarela e do laticínio 02 foi o tipo coalho.

3.2 Análises Microbiológicas do Leite e do Queijo

3.2.1 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes a 35°C e a 45°C

De cada amostra de leite foi transferido 1mL do produto para tubos de ensaio contendo 9mL de água peptonada, obtendo-se, a diluição 10^{-1} , realizando-se diluições sucessivas até 10^{-3} . Para a determinação do NMP de coliformes a 35°C foram inoculados 1mL de cada diluição, em três séries de três tubos, contendo caldo verde brilhante bile lactose 2% e incubados em estufa bacteriológica de 35°C por 24-48 horas. Após esse período, alíquotas das amostras positivas foram transportadas para tubos contendo caldo EC e incubados em banho-maria a 45°C por 24-48 horas. Foram considerados positivos os tubos com produção de gás e turvação do meio. Para a leitura dos resultados foi utilizada a tabela de Hoskins (APHA, 2001). Para a determinação do NMP de coliformes a 35°C nas amostras de queijo, foram pesadas 25g de cada amostra e transferidas para frascos contendo 225 mL de água peptonada a 0,1%, obtendo-se a diluição 10^{-1} e preparadas as diluições sucessivas até 10^{-3} , transferindo em seguida 1mL das diluições para três séries de três tubos contendo caldo laril, incubados a 35°C por 24-48 horas. Dos cultivos positivos foi transferida uma alíquota para tubos contendo caldo verde brilhante bile lactose 2% e incubados em estufa de 35°C por 24-48 horas. A determinação de NMP de coliformes a 45°C foi realizada através da transferência de uma alíquota de cada cultivo positivo no caldo verde brilhante bile lactose 2% para tubos contendo caldo EC, incubados em banho-maria a 45°C por 24-48 horas. Foram considerados positivos os cultivos que produziram gás e com turvação

do meio. A leitura dos resultados foi realizada através da tabela do Hoskins (APHA, 2001).

3.2.2 Pesquisa do gênero *Listeria*

Foram acrescentados à alíquota de 25g (queijo) ou 25 mL (leite) de cada amostra, 225 mL de caldo para Enriquecimento de *Listeria* (LEB) suplementado com acriflavina. As alíquotas preparadas foram homogeneizadas e incubadas a 30°C por 24 horas. Após a incubação, foi transferido 0,1 mL da cultura para tubo contendo 10mL de caldo Fraser suplementado com citrato de amônio e ferro III e incubado a 30°C por 24 a 48 horas. A seguir os cultivos foram repicados do caldo Fraser para placas contendo Ágar Oxford (AO), suplementado com cicloheximide e sulfato de colistina e para placas contendo Ágar Palcam (AP), suplementado de polimixina, acriflavina e ceftazisime. Posteriormente foram incubadas a 30°C por 24-48 horas. As colônias sugestivas de pertencerem ao gênero *Listeria* (negras rodeadas por halo escuro em AO e verde-amareladas rodeadas por zona escura, ou verde-acinzentadas, em AP) foram selecionadas com auxílio de contador de colônias e repicadas para placas contendo Ágar Triptose de Soja (TSA) para dar prosseguimento às provas de confirmação da presença de *Listeria* spp.

3.2.2.1 Confirmação de *Listeria* spp.

As placas contendo Ágar Triptose de Soja (TSA) inoculadas foram incubadas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após este período as placas foram observadas, usando fonte de luz branca na parte inferior, posicionadas em ângulo de 45° em relação à fonte de luz. Colônias azuladas típicas, bem isoladas foram transferidas para tubos contendo TSA inclinados para posteriormente realizar as provas de confirmação e identificação.

3.2.2.1.1 Prova de Catalase e Teste de Gram

Em uma placa de Petri, foi depositada uma gota de peróxido de hidrogênio 3%, adicionando-se uma alíquota do cultivo e homogeneizado. A presença de catalase se traduz pela liberação de oxigênio, moléculas em forma de borbulhas (catalase positiva). As culturas catalase positivas foram submetidas ao teste da coloração de Gram e em seguida foram observadas ao microscópio óptico a fim de visualizar as características da *Listeria* spp. que se apresenta como bastonete curto ou na forma de cocobacilo, Gram positivo.

3.2.2.1.2 Teste de Motilidade e Redução de Nitrato

As amostras positivas na prova de catalase e no teste de Gram foram inoculadas em ágar motilidade e incubadas a 25°C em estufa de B. O. D. (Demanda Bioquímica de Oxigênio) por 2 a 5 dias. Após incubação, foi observado o tipo de crescimento, móvel em forma de guarda-chuva.

As amostras motilidade positiva foram submetidas ao teste de Redução de Nitrato, adicionando-se a cada amostra 2 a 3 gotas de alfa-naftilamina 0,5% e 2 a 3 gotas de ácido sulfanílico a 0,8%. As amostras com coloração rosa foram consideradas positivas para esta prova.

3.2.2.1.3 Teste do Vermelho de Metila - Voges Prokauer (VM-VP)

As amostras positivas nas provas anteriores foram inoculadas em caldo VM-VP e incubadas a 36°C, por 5 dias. Após a incubação, foram pipetadas alíquotas de 5 e 1 mL da cultura para dois tubos estéreis. No tubo contendo 5 mL foram adicionadas 2 a 3 gotas de solução de vermelho de metila a 0,06%, observando-se a cor vermelha nas amostras VM positivas. No tubo contendo 1 mL, foram adicionados 0,6 mL de alfa-naftol solução alcoólica 5% e em seguida 0,2 mL de hidróxido de potássio solução aquosa 40% agitando-se os tubos seguidos de repouso por 1 a 2 horas. Após este período, as amostras positivas apresentaram cor vermelho escura.

3.2.2.2 Identificação das espécies de *Listeria*

As culturas características do gênero *Listeria* foram testadas para identificação das espécies por meio das seguintes provas bioquímicas:

3.2.2.2.1 Produção de β -hemólise

Os cultivos confirmados como pertencentes ao gênero *Listeria* foram semeados em placas contendo ágar sangue desfibrinado de carneiro, incubados a 36°C por 24 a 48 horas. Após este período, o surgimento de zona clara transparente (β -hemólise) ao redor das colônias era considerado positivo.

3.2.2.2.2 CAMP teste

Os cultivos positivos no teste da β -hemólise foram repicados para o ágar Columbia contendo ácido nalidíxico, adicionado de 5% de sangue de carneiro desfibrinado (CNAS), traçando-se uma linha perpendicular à linha previamente semeada com *S. aureus*. Em seguida, incubados a 36°C por 72 horas, em atmosfera de 2 a 5% de dióxido de carbono (CO₂).

3.2.2.2.3 Fermentação de carboidratos

Foram inoculados 3 tubos, contendo caldo vermelho de fenol-base, adicionados, respectivamente de xilose, manitol e ramnose. Em seguida, incubados a 30 ± 1°C por 36 horas. A viragem de cor do indicador vermelho de fenol para amarelo indicava a fermentação do açúcar presente.

3.3 Check List

Foi realizado um check list abordando as condições higiênico-sanitárias de cada laticínio em estudo. O check list abordava cinco categorias com os seguintes itens de avaliação: Aspectos Gerais Referentes aos

Recursos Humanos (7 itens avaliados), Aspectos Gerais de Instalações, Edificações e Saneamento (9 itens), Aspectos Gerais de Equipamentos (2 itens), Aspectos Gerais de Sanitização (06 itens) e Aspectos Gerais de Produção (8 itens), conforme anexo.

3.4 Teste Estatístico

Foi realizado o Teste Estatístico de Fisher para determinar se houve associação entre os microrganismos detectados na matéria-prima (leite cru refrigerado) e o produto final (queijo) em laticínios inspecionados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises do leite cru refrigerado e leite pasteurizado foram interpretados segundo a IN N° 51, de 18 de setembro de 2002 do MAPA, que determina como padrão para coliformes a 35°C no leite pasteurizado tipo C um limite máximo aceitável de 4 NMP/mL e para coliformes a 45°C de 2 NMP/mL (BRASIL, 2002). Quanto ao leite cru refrigerado a referida Instrução Normativa não determina padrão para coliformes a 35°C e a 45°C, bem como, para a presença de *Listeria monocytogenes* nos dois tipos de leite analisados. Quanto à presença de *Listeria spp.* em queijos, os resultados foram avaliados de acordo com a Portaria N° 146, de 7 de março de 1996 do MAPA, que para coliformes determina padrão por contagem de colônias e não por NMP, metodologia utilizada na pesquisa. Quanto à pesquisa de *L. monocytogenes*, determina ausência deste microrganismo em 25g do produto, para os dois tipos de queijo analisados.

Os resultados encontrados na determinação do NMP de coliformes a 35°C e a 45°C em amostras de leite cru refrigerado e pasteurizado tipo C estão dispostos nas tabelas 1, 2 e 3. Pelos dados apresentados na tabela 1, verifica-se que o NMP de coliformes a 35°C variou de 23 a >1.100 e de <3 a >1.100 para coliformes a 45°C, nas amostras de leite cru, considerando os três laticínios.

TABELA 1: Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35°C e a 45°C em amostras de leite cru refrigerado, provenientes da plataforma de recepção de laticínios inspecionados, 2010.

Laticínios	Lotes	Coliformes a 35°C		Coliformes a 45°C	
		A1	A2	A1	A2
01(SIF) /10	1	1.100	>1.100	>1.100	>1.100
	2	>1.100	>1.100	120	43
	3	>1.100	>1.100	9,4	21
	4	>1.100	>1.100	1.100	>1.100
	5	>1.100	>1.100	>1.100	150
02(SIF) /10	1	23	240	7,4	3
	2	1.100	>1.100	23	23
	3	>1.100	>1.100	240	93
	4	>1.100	>1.100	>1.100	>1.100
	5	>1.100	240	<3	<3
03(SIE) /10	1	>1.100	>1.100	>1.100	>1.100
	2	>1.100	>1.100	210	1.100
	3	>1.100	>1.100	>1.100	>1.100
	4	>1.100	>1.100	93	23
	5	>1.100	>1.100	<3	<3

A1: Amostras 1; **A2:** Amostras 2; **SIF:** Serviço de Inspeção Federal; **SIE:** Serviço de Inspeção Estadual

Apesar da IN 51 não estabelecer padrão para os coliformes no leite cru, ressalta-se a importância de se obter uma matéria-prima de boa qualidade, pois esta afetará o rendimento industrial e a qualidade do produto final. A contaminação do leite cru refrigerado pode estar relacionada com deficiência no manejo sanitário do rebanho e dos equipamentos utilizados na ordenha. Além disso, observou-se durante a colheita das amostras de leite cru refrigerado que os fornecedores do mesmo, em sua maioria, transportavam o produto das propriedades até os laticínios, geralmente utilizando latões em carroças ou carro com carroceria aberta, em temperatura inadequada, o que pode ter contribuído para multiplicação dos microrganismos presentes no produto.

Pelos dados da tabela 1 é possível observar também, que a contaminação por coliformes a 35°C e a 45°C no leite cru refrigerado foi elevada nos três laticínios, independente do tipo de inspeção (SIE ou SIF) realizada no estabelecimento. Estes resultados concordam com Catão &

Ceballos (2002), que encontraram elevada incidência de coliformes no leite cru analisado de uma indústria de laticínios sob inspeção.

TABELA 2: Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35°C e a 45°C em amostras de leite pasteurizado tipo C provenientes de laticínios inspecionados, 2010.

Laticínios	Lotes	Coliformes a 35°C (NMP)		Coliformes a 45°C (NMP)	
		A1	A2	A1	A2
01 (SIF) /10	1	240	93	240	93
	2	240	43	<3	<3
	3	460	460	11	7,2
	4	210	11	3,6	9,2
	5	>1.100	>1.100	43	>1.100
02 (SIF) /10	1	>1.100	150	<3	<3
	2	<3	<3	<3	<3
	3	>1.100	>1.100	31	120
	4	23	23	<3	23
	5	>1.100	240	<3	23
03 (SIE) /10	1	>1.100	150	23	23
	2	<3	<3	<3	<3
	3	23	28	<3	<3
	4	93	43	<3	<3
	5	>1.100	>1.100	<3	<3

A1: Amostras 1; **A2:** Amostras 2 **SIF:** Serviço de Inspeção Federal; **SIE:** Serviço de Inspeção Estadual

De acordo com os dados expostos na tabela 2 verifica-se que os resultados da determinação do NMP para coliformes a 35°C e a 45°C, nas amostras de leite pasteurizado, variaram de <3 a >1.100 nos três laticínios.

Fazendo-se um paralelo dos dados da tabela 2 (leite pasteurizado) com os dados da tabela 1 (leite cru refrigerado) verifica-se que houve diminuição dos níveis de contaminação das amostras por coliformes, após o processo de pasteurização. Entretanto, um grande número de amostras, mesmo pasteurizadas, apresentou contaminação por coliformes, evidenciando que a pasteurização não foi satisfatória na eliminação dos microrganismos, sugerindo falhas durante o processo de pasteurização do leite ou contaminação pós-pasteurização, durante o armazenamento do produto, já que, um ambiente industrial contaminado pode contribuir para a contaminação do alimento.

TABELA 3: Número e percentual de amostras de leite pasteurizado tipo C provenientes de laticínios inspecionados que estão de acordo e em desacordo com a legislação vigente para coliformes a 35°C e a 45°C, 2010.

	Coliformes a 35°C				Coliformes a 45°C			
	De acordo		Em desacordo		De acordo		Em Desacordo	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
L 01 (SIF)	0	0	10	100	2	20	8	80
L 02 (SIF)	2	20	8	80	6	60	4	40
L 03 (SIE)	2	20	8	80	8	80	2	20

L01: Laticínio 01; **L02:** Laticínio 02; **L03:** Laticínio 03; **SIF:** Serviço de Inspeção Federal; **SIE:** Serviço de Inspeção Estadual.

Pelos dados apresentados na tabela 3 observa-se que, para coliformes a 35°C 100% das amostras de leite do laticínio 01 apresentaram-se em desacordo com a IN N° 51. Enquanto que os laticínios 02 e 03, respectivamente apresentaram 80% de amostras fora dos padrões estabelecidos pela referida Instrução Normativa. Já para coliformes a 45°C oito (80%) amostras do laticínio 01 estão em desacordo com a legislação. Nos laticínios 02 (40%) e 03 (20%) estavam fora dos padrões. O laticínio 01 apresentou maior número de amostras impróprias para o consumo, e a contaminação que pode ser atribuída à falta de cuidados higiênicos na manipulação dos equipamentos e do produto.

Estes resultados discordam dos encontrados por Oliveira & Gallo (2008), que não encontraram contaminação por coliformes no leite pasteurizado tipo C. Já Catão & Caballos (2002) encontraram percentual de amostras de leite pasteurizado tipo C em desacordo com a IN N° 51 superiores aos encontrados na presente pesquisa, em torno de 60%.

TABELA 4: Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35°C e a 45°C em amostras de queijos de diferentes tipos provenientes de laticínios inspecionados, 2010.

Laticínios	Lotes	Coliformes a 35°C (NMP)		Coliformes a 45°C (NMP)	
		A1	A2	A1	A2
01 (SIF) /10 (mussarela)	1	>1.100	>1.100	>1.100	>1.100
	2	15	>1.100	<3,0	<3,0
	3	>1.100	>1.100	290	>1.100
	4	>1.100	>1.100	3,6	9,2
	5	>1.100	>1.100	>1.100	>1.100
02 (SIF) /10 (coalho)	1	>1.100	>1.100	<3,0	11
	2	>1.100	>1.100	>1.100	>1.100
	3	>1.100	>1.100	240	15
	4	>1.100	>1.100	3,0	<3,0
	5	>1.100	>1.100	6,1	9,4
03 (SIE) /10 (mussarela)	1	>1.100	>1.100	<3,0	<3,0
	2	>1.100	>1.100	<3,0	<3,0
	3	>1.100	>1.100	>1.100	>1.100
	4	>1.100	>1.100	<3,0	93
	5	>1.100	>1.100	>1.100	>1.100

A1: Amostras 1; **A2:** Amostras 2; **SIF:** Serviço de Inspeção Federal; **SIE:** Serviço de Inspeção Estadual

No estado do Maranhão os queijos tipo coalho e mussarela são os tipos mais fabricados pelos laticínios, devido à demanda ser superior a dos demais tipos de queijo. Estes dois tipos de queijos são produzidos com teor de umidade semelhante, média umidade, (36%<umidade<46%), segundo informações dos laticínios, por esse motivo o fator físico-químico não apresenta diferença na influência dos resultados microbiológicos, não havendo necessidade de comparação destes resultados entre os dois tipos de queijos.

A tabela 4 mostra que os valores da determinação do NMP de coliformes a 35°C nos queijos tipo mussarela e tipo coalho, variaram de 15 a >1.100 e para coliformes a 45°C de < 3 a >1.100. A contaminação dos queijos por esses microrganismos pode ter ocorrido pela utilização de matéria-prima contaminada, contaminação pelos manipuladores, durante o processo de elaboração ou mesmo contaminação pós-processamento. Durante o processamento do queijo, o manipulador destaca-se como veiculador de microrganismos, principalmente os de origem fecal, o que se torna um perigo biológico em potencial, quando, este não adota hábitos higiênicos adequados

no ambiente industrial, como por exemplo, lavar as mãos após uso do banheiro, tossir ou espirrar, além de não fazer uso de máscaras e luvas, quando necessários.

Foi observado, durante as visitas aos laticínios, que os manipuladores, em sua maioria, não realizavam a higienização das mãos de forma adequada e não utilizavam luvas, o que pode ter contribuído para a elevada contaminação do queijo. Além da contaminação veiculada pelo manipulador, pode ter ocorrido ainda contaminação cruzada pelo uso de utensílios precariamente higienizados, como bandejas e facas. Assim como, uso de somente uma mesa de processamento do produto para elaboração de vários lotes em seqüência, sem a devida higienização prévia, características observadas em ambos os laticínios visitados. É importante ressaltar que os coliformes a 45°C são indicadores de contaminação fecal, devido à ocorrência restrita às fezes do ser humano e de animais homeotérmicos. Além de evidenciar risco de contaminação por microrganismos patogênicos de origem fecal. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Feitosa et al. (2006), e Zaffari et al. (2007), que encontraram 100% de amostras de queijos contaminadas por coliformes.

Quanto aos resultados da pesquisa para identificação das espécies de *Listeria* identificaram-se as espécies *L. welshimeri* e *L. seeligeri* conforme mostra a tabela 5.

TABELA 5: Espécies do gênero *Listeria* isoladas de amostras de leite cru refrigerado, pasteurizado tipo C e queijos tipo mussarela e coalho de laticínios inspecionados, 2010.

Laticínios	Lotes	Amostras	Espécies isoladas
01(SIF)	1	Q2	<i>L. welshimeri</i>
		LC1	<i>L. welshimeri</i>
	2	LP1	<i>L. welshimeri</i>
		LP2	<i>L. welshimeri</i>
02(SIF)	2	Q1	<i>L. seeligeri</i>
		Q2	<i>L. welshimeri</i>
03(SIE)	1	Q1	<i>L. welshimeri</i>
		Q2	<i>L. welshimeri</i>
	4	LC2	<i>L. seeligeri</i>
		5	LC1

LC1: leite cru amostra 1; **LC2:** leite cru amostra 2; **LP1:** leite pasteurizado amostra 1; **LP2:** leite pasteurizado amostra 2; **Q1:** queijo amostra 1; **Q2:** queijo amostra 2; **SIF:** Serviço de Inspeção Federal; **SIE:** Serviço de Inspeção Estadual

De acordo com os dados da tabela 5 observa-se que não houve isolamento de *L. monocytogenes* e a espécie isolada com maior frequência foi *L. welshimeri*. Segundo dados da literatura esta espécie não tem importância para a saúde pública, pois não é considerada patogênica, mas é bastante comum no ambiente industrial. Já a espécie *L. seeligeri*, isolada de duas amostras, segundo Jay (2005), já foi envolvida em pelo menos um caso de enfermidade em humanos. É possível observar também, pela tabela, que as espécies foram isoladas de todos os produtos analisados sugerindo que a matéria-prima estava contaminada e que a pasteurização não foi capaz de eliminar o patógeno ou a contaminação ocorreu pós-processamento.

O fato de não ter sido isolada *L. monocytogenes* não significa que não exista a presença da bactéria no ambiente industrial, pois, *L. monocytogenes* apesar de ser bastante resistente aos fatores que interferem na sua sobrevivência, no ambiente industrial e no produto, é pouco competitiva com as outras bactérias, inclusive com as espécies do seu gênero. Segundo Ryser & Donnelly (2001), a não detecção de *L. monocytogenes* pode estar muitas vezes relacionada a fatores de estresse celular, ou pelo fato de que durante as análises bioquímicas todas as espécies se apresentaram com características semelhantes.

A presença de outras espécies do mesmo gênero é um alerta para o controle da espécie patogênica, por ser de grande importância para saúde pública, uma vez que, causa listeriose, doença de notificação compulsória que pode levar a morte, principalmente de indivíduos imunocomprometidos, idosos e gestantes.

Os resultados de *Listeria* spp. em leite cru refrigerado concordam com os encontrados por Almeida (2008), que detectou a presença do gênero em três (10%) das 30 amostras de leite analisadas.

Segundo Guerra & Bernardo (1999), a embalagem plástica que envolve o queijo, conjugada ao armazenamento prolongado em baixas temperaturas favorecem a multiplicação de bactérias do gênero *Listeria* nos queijos embalados e refrigerados.

Quanto à pesquisa de *L. monocytogenes* os resultados encontrados em queijos discordam dos encontrados por Branco et al. (2003), que detectaram essa espécie em 5 (5,9%) das 84 amostras de queijo analisadas, sendo esse produzido industrialmente. Entretanto, concordam com os de Zaffari (2007), que encontrou 13 (16%) das 80 amostras de queijos analisadas, contaminadas por *Listeria* spp.

A tabela 6 mostra a relação da contaminação das amostras analisadas microbiologicamente quanto à presença de microrganismos indicadores e *Listeria* spp. na matéria-prima (leite cru refrigerado) e o produto final (queijo).

TABELA 6: Associação entre os microrganismos detectados no leite cru refrigerado, pasteurizado tipo C e queijos tipo mussarela e coalho e as etapas do processamento destes produtos em laticínios inspecionados, 2010.

Produto	Coliformes a 35°C		Coliformes a 45°C		<i>Listeria</i> spp.	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
LC	30	100,00 ^a	26	86,66 ^a	3	10,00 ^a
LP	26	86,66 ^a	14	46,66 ^b	2	6,66 ^b
Q	30	100,00 ^a	21	70,00 ^a	5	16,66 ^a

LC: leite cru refrigerado; LP: leite pasteurizado; Q: queijo

Fisher's Exact Test: ^aEstatisticamente significativo $p < 0,0001$; ^bEstatisticamente significativo $p < 0,0009$

Pelo teste exato de Fisher para interdependência observa-se na tabela 6, que existe uma associação estatística significativa entre as variáveis, contaminação por Coliformes a 35°C, Coliformes a 45°C e a presença de *Listeria* spp. no leite cru refrigerado, pasteurizado e queijo. Observa-se que o percentual de contaminação por coliformes e *Listeria* é consideravelmente elevado na matéria-prima (leite cru refrigerado), diminui com o processo de pasteurização e torna a aumentar no produto final (queijo). Esse dado evidencia que existem falhas no processo de pasteurização do leite, como a temperatura insuficiente ou o tratamento térmico não foi completado ou associação dos dois fatores.

A elevada frequência de contaminação dos queijos pesquisados pode estar relacionada com as condições higiênico-sanitárias inadequadas da matéria-prima e concentração de microrganismos, já que, para produção de 1Kg de queijo utiliza-se aproximadamente 10 litros de leite.

Quanto aos dados encontrados quando da aplicação do check list nos laticínios, verificou-se que o número e percentual de conformidades foram superiores ao número e percentual de requisitos não conformes. Entretanto, os produtos provenientes destes laticínios apresentam condições higiênico-sanitárias inadequadas, evidenciando que para o produto ter qualidade microbiológica o local de processamento deve apresentar 100% de conformidades.

É importante ressaltar que durante a visita aos laticínios os proprietários foram informados com antecedência e, apesar do check list ter sido aplicado de forma observacional, os proprietários podem ter realizado higienização nas indústrias antes da visita técnica. Entretanto, adotar medidas higiênicas temporárias não diminui ou elimina a contaminação, a adoção das Boas Práticas de Fabricação (BPF) deve ser permanente.

Os Laticínios 01 e 03 apresentaram maior número de não conformidades, com 10 requisitos não conformes cada um, de um total de 32 requisitos. Já o laticínio 02 apresentou menor número de não conformidade (6 requisitos) o que este laticínio tenha evidenciado menor índices de contaminação por *Listeria*. Já os laticínios 01 e 03 apresentaram resultados

semelhantes quanto à presença de bactérias do gênero *Listeria*, bem como, para a quantidade de requisitos não conformes, dado este que reforça a importância da aplicação das BPF's no ambiente industrial. Já quanto à contaminação por coliformes os três laticínios apresentaram elevada contaminação dos seus produtos, independente dos resultados observados no check list, ressaltando mais uma vez, a importância de todos os itens apresentarem conformidades quanto à prática de higiene.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados encontrados é possível concluir que:

- ✓ As amostras de leite (cru refrigerado e pasteurizado) e queijos (mussarela e coalho) analisadas apresentam condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, portanto estão impróprias para o consumo;
- ✓ O leite e queijo produzidos nos laticínios avaliados, independente do tipo de inspeção adotada, apresentam riscos de veicular *Listeria* para os consumidores;
- ✓ A matéria-prima (leite cru refrigerado) uma vez contaminada se não passar por um processo de pasteurização adequado (binômio tempo e temperatura) estabelecidos pela legislação vigente, não eliminará os microrganismos indicadores e patogênicos;
- ✓ Para se obter uma matéria-prima e subprodutos de qualidade microbiológica, devem-se adotar as boas práticas de fabricação desde a obtenção higiênica do leite até o processamento final.

REFERÊNCIAS

- AGUADO, V.; VITAS, A.; GARCIA-JALON, I. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, suplemento 3/1, p. 341-347, set. 2004.
- ALLERBERGER F. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 35, suplemento 3, p. 183-189, abr. 2002.
- ALMEIDA, P. M. P.; FRANCO, R. M. Avaliação Bacteriológica de queijos tipo Minas Frescal com pesquisa de patógenos importantes a saúde pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e Coliformes Fecais. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 111, p. 79-86, ago, 2003.
- ALMEIDA, V. M. **Condições higiênico-sanitárias do leite *in natura* e pasteurizado tipo C provenientes da bacia leiteira do Médio Mearim-MA.** São Luís, 2008. 56p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)-Departamento de Patologia Animal, Universidade Estadual do Maranhão.
- ALPAS, H. BOZOGLU, F. Efficiency of high pressure treatment for destruction of *Listeria monocytogenes* in fruit juices. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.35, suplemento 3, p. 69-73, abr. 2003.
- APHA. American Public Health Association. In: **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Ed.:Vanderzant, C.; Splittstoesser, D. F. 3ed Washington, 2001.
- ARRUDA, G. A.; GERMANO, P. M. L.; MATTÉ, M. H.; OLIVEIRA, C. J. R. **Listeria e Listeriose: Perigo para as gestantes.** 2. ed. São Paulo, 2007. 146p.
- AURELI, P.; FERRINI, A. M.; MANNONI, V.; HODZIC, S.; WEDELL-WEERGAARD, C.; OLIVA, B. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Italy to antibiotics. **International Journal of Food Microbiology**; v. 83, suplemento 3/25, p. 325-330, jun. 2003.
- BENEVIDES, S. D. Comportamento do queijo de coalho produzido com leite cru e pasteurizado, maturado a temperatura ambiente e sob refrigeração. Fortaleza, 1999, 132p. **Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos** – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará.
- BEUMER, R. R.; HAZELEGER, W. C. *Listeria monocytogenes*: diagnostic problems. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.35, suplemento 3, p. 191-197, abr.2003.

BITENCOURT, D.; PEGORARO, L.M.C.; GOMES, J.F. **Sistemas de pecuária de leite: uma visão na região de Clima Temperado**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2000. 195p.

BRAMLEY, A. J.; MCKINNON, C. H. **Dairy microbiology: the microbiology of milk**. 2 ed. Londres/New York: Elsevier Science Ltda, 1990, p. 163-207.

BRANCO, M. A. D. A. C.; FIGUEIREDO, E. A. T. D.; BORGES, M. D. F.; SILVA, M. C. D. D.; DESTRO, M. T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 392-408, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Análíticos oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 14, 26 ago. 2003. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, p.13, 21 set. 2002. Seção 1.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12 de 2, janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 1-48, 10 jan. 2001. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 46, de 10 de fevereiro de 1998. Institui o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC a ser implantado, gradativamente, nas indústrias de produtos de origem animal sob o regime do serviço de inspeção federal – SIF, de acordo com o manual genérico de procedimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 24, 16 mar. 1998. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 326 de 30 de julho de 1997. Aprova o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação (BPF) para Estabelecimentos Elaboradores / Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, p., 01 ago. 1997a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 364, de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Mozzarella (Muzzarella ou Mussarella). **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 19694, 08 ago. 1997b. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 368, de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico sobre as

Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação (BPF) para Estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 19697, 08 set. 1997c. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 3977, 11 mar. 1996. Seção 1.

BUCHRIESER, C.; RUSNIOK, C.; KUNT, F.; COSSAT, P.; GALSER, P. Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.35, suplemento 3, p. 207-213, abr. 2003.

CASTRO, A. F. P. Listeria. In: _____. **Microbiologia**. 2ed. São Paulo: Atheneu, 1989. 386p. cap. 26, p.131-132.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. DE. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínio no estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 281-287, 2002.

CHOI, W. S.; HONG, C. Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in milk using competitive PCR. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 84, suplemento 1/15, p. 79-85, jul. 2003.

CISTERNAS, A. V.; LAGOS, N. N.; GAISTUCH; GONZÁLES; GARCIA, C. C.; DIAZ, J. T. Infección por *Listeria monocytogenes* y embarazo con buen resultado perinatal. **Revista Chilena de Obstetricia e Ginecología**, Rio de Janeiro, v.67, n. 3, p. 237-241, 2002.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. 943p.

CRESPO M. P.; VÉLEZ, J.D.; CASTAÑEDA, C. R.; HOYOS, F.; LÓPEZ, M. L. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* em um Hospital de tercer Nivel. **Columbia Médica**, v. 30, p. 89-98, 2003. Disponível em: <<http://colombiamedica.univille.edu.co/VOL30NO2/listeria.html>>. Acesso em: 08 jun. 2009, 15:25:25.

DOGANAY, M. Listeriosis: clinica presentation. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.35, suplemento 3, p.73-77, abr. 2003.

DONNELLY, C. W.; BRIGGS, E. H.; DONNELLY, L. S. Comparison of Heat Resistance of *Listeria monocytogenes* in Milk as Determined by Two Methods. **Journal of Food Protection**, Burlington, v. 50, p. 14-17, 1987.

DUARTE, D. A. M. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no Estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n.3, p. 297-302, jul/set, 2005.

DYKES, G. A. Influence of the adaptation of *Listeria monocytogenes* populations to structured or homogeneous habitats on subsequent growth on chilled processed meat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, suplemento 3/25, p. 301-306, ago. 2003.

ESPER, L. M. R.; ROSA, V. P. D.; ROSSI, P.; KUAYE, A. Y.; VIOTTO, W. H. Efeito da adição de culturas protetoras (HOLDBAC™ *LISTERIA*) sobre *Listeria monocytogenes* inoculadas na superfície da ricota. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 21, n. 156, p. 105-116, nov, 2007.

FABER, J. M.; HARWING, J. The Canadian position on *Listeria monocytogenes* in read-to-eat foods. **Food Control**, Ontário, v. 7, n. 4, p. 253- 258,1996.

FABER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. **Microbiological Reviews**, Ottawa, v. 55, n.3, p. 476-511, 1991.

FEITOSA, T. Pesquisa de *Salmonella* spp., *Listeria* spp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitário em queijo de coalho produzido no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 162-165, dez, 2003.

FELEMING, D. W.; STEPHEN, L. C.; MACDONALD, K. L.; BRONDUM, J.; HAYES, P. S.; PLIKAYTIS, B. D.; HOLM, M. B.; AUDURIER, A.; BROOME, C. V.; REINGOLD, A. L. Pasteurized Milk as Vehicle of Infection in an Outbreak of Listeriosis. **New England Journal of Medicine**, v. 312, p. 404-407, 1985.

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

FORSYTHE, F. G.; POUSSHABAN, M.; GIANFRANCESCHI, M.; AURELI, P. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artemed editora, 2002. 532p.

FRANCO, B.D.G.; LANDEGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p. cap. 4, p. 33-82.

FURTADO, M. M. **A arte e a Ciência do Queijo**. 2 ed. São Paulo: Editora Globo, 1991. 297p.

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

GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Varela. 2001. 629p. parte 12, p. 217-227.

GUERRA, M. M.; BERNARDO, F. M. A. Ocorrência natural de *Listeria* spp. em queijos alentejanos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 94, n. 530, p. 63-74, 1999a.

GUERRA, M. M.; McLAUHLIN, F. A.; BERNANRDO, F. M. A. *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. **Food Microbiology**, v. 18, suplemento 4, p. 423-429, 2001.

HOF, H. Therapeutic options. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 35, suplemento 3, p. 203-205, abr. 2003.

JAY, J. M. Listeriose de origem animal. In:___**Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, cap. 25, p.517-542.

KASANOWSKI, M. C.; VALENTE, A. M.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; CARVALHO, J. C. A. P. *Listeria* spp: Um patógenos Emergente. **Higiene Alimentar**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 157, p. 52-57, dez, 2007.

KOUTSOUMANIS, K. P.; SOFOS, J. N. Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* after habituation at different pH conditions. **The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology**, Colorado, v. 38, p. 321-326, jan, 2004.

LACIR, A. L.; CENTORBI, O. N. P. *Listeria* spp em alimentos de origem animal. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 31, p. 25-30, 1999.

LAMB, R. M.; FREO, J. D. Diagnóstico das Agroindústrias de produtos lácteos localizadas na região do médio alto Uruguai, RS. **Higiene Alimentar**, Médio alto Uruguai, v. 22, n. 161, p. 29-35, mai, 2008.

LANDGRAF, M. Surto de Meningite neonatal por *Listeria monocytogeneses*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, n. 1, p. 63-67, 1999.

LEITE JÚNIOR, A. F. S. et al. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado à temperatura ambiente ou sob refrigeração, em Campina Grande-PB. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 73, p. 53-59, 2000.

LOU, Y.; YOU-SEF, A. E. Adaptation to Sublethal Environmental Stresses Protects *Listeria monocytogenes* Against Lethal Preservation Factors. **Applied and Environmental Microbiology**, Columbus, v.63, p. 1252-1255, 1999.

LOUGUERCIO, A. P. et al. *Listeria monocytogenes*: Um importante patógeno de origem alimentar. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n.80/81, p. 39-48, 2001.

LOVETT, J.; TWEDT, R. M. Bactéria associated with foodborne diseases *Listeria*. **Food Technology**. v. 42, n. 2, p. 188-191, 1988.

MANTILLA, S. P. S.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; GOUVÊA, R. Irradiação gama para eliminação de patógenos do gênero *Listeria* presentes naturalmente em carne bovina moída. **Higiene Alimentar**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 168/169, p. 118-123, jan/fev, 2009.

MARTH, E. H. Disease characteristic of *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, v. 42, n. 51, p. 165-168, 1996.

MARTINS, E. C. P.; CRANDALL, A. D.; MAZZOTTA, A. S.; MONTVILLE, T. J. Influence of pH, salt and temperature on nisin resistance in *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 60, n.4, p. 420-423, abr, 1997.

MORAES, C.R., FUENTEFRIA, A. M., ZAFFARI, C.B., CONTE, M. ROCHA, J.P.A.V. Microbiological quality of raw milk produced in five coutiens in Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 3, p. 259-264, 2005.

MOURA, S.M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D.G.M. Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brasil. **International Journal of Food Microbiology**, São Paulo, v. 19, suplemento 3, p. 229-237, ago. 1993.

NAKAMURA, H.; HANTANAKA, M.; OCHI, K.; NAGAO, M.; OGASAWARA, J.; HASE, A. *Listeria monocytogenes* isolated from cold-smoked fish products in Osaka City, Japan. **International Journal of Food Microbiology**, Osaka, v. 94, suplemento 3/1, p. 323-328, ago. 2004.

NASCIMENTO, G. A.; BARBOSA, J. S. BPF – Boas Práticas de Fabricação: Uma revisão. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 21, n. 148, p. 24-30, jan/fev, 2007.

NASCIMENTO, M. G. F.; CULLOR, J. S. Listeriose Humana – Epidemiologia e Fontes de Contaminação. **Higiene Alimentar**, Vitória, v. 8, n.32, p. 13-17, 1994.

NASSU, R. T.; BRITO, J. R. F.; SOUZA, G. N.; CHAPAVAL, L.; MACEDO, B. A.; LIMA, M. H. P. Avaliação das Boas Práticas Agropecuárias do leite para processamento de queijo de coalho. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 21, n. 154, p. 50-56, set, 2007.

NETTO, D.P.; LOPES, M.O.; OLIVEIRA, M.C.S.; NUNES, M.P.; JUNIOR, M.M.; BOSQUIROLI, S.L.; BENATTO, A.; BENINI, A.; BOMBARDELLI, A.L.C.; FILHO, D.V.; MACHADO, E.; BELMONTE, I.L.; ALBERTON, M.; PEDROSO, P.P.; SCUCATO, E.S. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. Maringá. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 27, n.1, p. 145-151, 2005.

OLIVEIRA, A. N. **Bactérias do Gênero *Listeria* em leite e derivados no Comércio Varejista de Goiânia – Goiás**. Belo Horizonte, 1993. 101f.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. In: _____. **Higiene e Vigilância Sanitária dos Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2001, parte 5, p. 91-102.

PICOLI, S. U.; BESSA, M. C.; CASTAGNA, S. M. F.; GOTTARDI, C. P. T.; SCHIMIDT, V.; CARDOSO, M. Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas de produção de queijo frescal de leite de cabra em laticínio. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 01, p. 64-69, jan/mar, 2006.

PINTADO, M. E.; MACEDO, A. C.; MALCATA, F. X. Review: Technology, chemistry and microbiology of whey cheese. **Food Science Technology International**. v. 7, n. 2, p. 105-116, abr, 2001.

PRIMO, W.M. Entressafra no Brasil: Meio século de drama. **Indústria de Laticínios**, v. 1, n. 2, p. 12-14, 1996.

RAMOS, S. N. M.; COSTA, C. A. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijo artesanal tipo coalho comercializado na cidade de Manaus-AM, Brasil. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 33, n. 4, p. 613-618, 2003.

RIBEIRO, M.E.R.; STUMPF JÚNIOR, W.; BUSS, H. Qualidade de leite. In: _____. **Sistemas de pecuária de leite: uma visão na região de Clima Temperado**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2000. p.175-195.

ROCOURT, J.; BENEMBAREK, P.; TOYOFUKU, H.; SHLUNDT, J. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHOP approach. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 35, suplemento 3, p. 263-267, abr, 2003.

RYSER, E. T.; DONNELLY, C. W. Listeria In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington: American Public Health Association, 2001. p. 343-356. Chapter 36.

SABÓIA, F. V. A problemática da produção leiteira do Ceará. In: VILELA, D.; BRESSAN, M.; PIMENTEL, J. C. M.; PAIVA, J. A. J. Identificação de restrições técnicas, econômicas e institucionais ao desenvolvimento do setor leiteiro nacional. Região Nordeste. 1998. Fortaleza. Anais...Brasília: MCT/CNPq/PADCT, Juiz de Fora: EMBRAPA – CNPGL. 1999. p. 1001-104.

SEELIGER, H. P. R.; JONES, D. Genus *Listeria*. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHAPE, M. E. **Bergey's manual of sistematic bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1996. v. 2, p. 1235-1245.

SILVA JR., E.A. **Manual de controle higiênico – sanitário em alimentos**. São Paulo: Varela, 1995. 347p.

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

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análises Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Editora Varela, 2007. 552p.

SOUSA, R. A. DE.; FIGUEIREDO, E. A. T. DE.; MAIA, G. A.; FRIZZO, S. E. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijos de coalho artesanal, comercializado à temperatura ambiente, em Foratleza, CE. **Revista Higiene Alimentar**, v.20, n.138, p.66-69, 2006.

TODAR, K. *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. **Todar's On Line Textbook of Bacteriology**. University of Wisconsin-Madison. Department of Bacteriology. 2003. Disponível em: <<http://www.textbookofbacteriology.net/>> Acesso em: 21 set. 2009.

UBOLDI EIROA, M. N. U. *Listeria monocytogenes* – Características, ocorrência e desenvolvimento em alimentos. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 20, n. 1, p. 13-22, jan/jun, 1990.

VARNMAN, A. H.; EVANS, M. G. *Listeria monocytogenes*. In: Foodborn Pathogens AN. Illustrated Text Manson Publishing LTA: Londres, 1996, 557p, cap. 15, p. 327-345, 1996.

VASQUEZ-BOLAND, J. A.; KUHM, M.; BERCHE, M.; CHAKRABORTY, T.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, G. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 584-640, jul, 2001.

WAGNER, M.; ALLERBERGER, F. Characterization of *Listeria monocytogenes* recovered from 41 cases of sporadic listeriosis in Austria by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 35, suplemento 3, p. 227-234, abr. 2003.

ZAFFARI, C. B.; MELLO, J. F.; COSTA, M. D. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 862-867, mai/jun, 2007.

ZOCCAL, R. **Leite: sobre a produção e cai o número de produtores**. 2008. Disponível em:<<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/sala/noticias/jornaldoleite.php?id=374>>. Acesso em: 16 jun. 2009, 13:45:25.

ZOCHE, F.; BERSOT, L. S.; BARCELLO, V. C.; PARANHOS, J. K. Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na região oeste do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, Palotina, v. 7, n. 2, p. 59–67, 2002.

ANEXO

CHECK LIST PARA DIAGNÓSTICO INICIAL

A) Aspectos Gerais de Recursos Humanos

Nº Requisitos	Requisitos	Conformidade	Descrição da Não Conformidade
01	Os manipuladores recebem treinamento de higiene e boas práticas, compatíveis com as tarefas que irão executar?		
02	Os manipuladores apresentam higiene corporal adequada, cabelos e bigodes protegidos e totalmente cobertos, unhas curtas, limpas e sem esmalte, proibição do uso de adornos (brincos, anéis, pulseiras etc.) e manipuladores barbeados?		
03	Os procedimentos de higienização das mãos encontram-se escritos e disponíveis em lugares visíveis ao funcionário?		
04	Os manipuladores evitam comportamentos, atitudes e gestos (fumar, tossir sobre os alimentos, cuspir, manipular dinheiros, etc.) incorretos durante a manipulação?		
05	Os manipuladores com ferimentos, lesões nas mãos, nos braços, infecções respiratórias, oculares ou gastrintestinais ou afecções que contaminem os alimentos, são orientados a comunicar sua gerência e não manipular alimentos?		
06	Os manipuladores são treinados sobre o uso de EPI (equipamentos de proteção individual)?		
07	As luvas de borracha são mantidas limpas e usadas só para serviços de limpeza?		

B) Aspectos Gerais de Instalações, Edificações e Saneamento

Nº Requisitos	Requisitos	Conformidade	Descrição da Não Conformidade
01	As paredes/divisórias têm superfície lisa e impermeável até altura adequada (mínimo 2 metros) e são de cores claras?		
02	As paredes/divisórias encontram-se em bom estado de conservação?		
03	Ralos e canaletas têm revestimento liso, caimento que facilita o escoamento e possuem proteção contra a entrada de insetos e roedores?		
04	Ralos e canaletas são mantidos limpos e em bom estado de conservação?		
05	Os tetos/forros possuem acabamento liso, impermeável e são de cor clara?		
06	Os tetos/forros são mantidos em bom estado de conservação (livres de trincas, rachaduras, goteiras, umidade, bolor, descascamento e infiltração)?		
07	As janelas são de fácil limpeza, ajustadas aos batentes, de material liso e não absorvente?		
08	As janelas são mantidas em bom estado de conservação?		
09	As janelas possuem telas milimétricas, em bom estado de conservação e facilmente removíveis para limpeza?		

C) Aspectos Gerais de Equipamentos

Nº Requisitos	Requisitos	Conformidade	Descrição da Não Conformidade
01	Os equipamentos apresentam superfícies lisas, impermeáveis, resistentes, não-absorventes, sem riscos de contaminação química ou física, com desenho sanitário (favorecendo a higienização), em bom estado de funcionamento, em bom estado de conservação e dimensionado em número suficiente?		
02	Os utensílios apresentam superfícies lisas, resistentes, não-absorventes, sem riscos de contaminação química ou física, de material apropriado (favorecendo a higienização), em bom estado de conservação e dimensionando em número suficiente?		

D) Aspectos Gerais de Sanitização

Nº Requisitos	Requisitos	Conformidade	Descrição da Não Conformidade
01	Os procedimentos de higienização de utensílios/equipamentos encontram-se escritos, disponíveis, visíveis e corretos?		
02	As etapas de higienização de utensílios/equipamentos são cumpridas, garantindo as condições de limpeza?		
03	A frequência de higienização de utensílios/equipamentos é adequada?		
04	O uso de produtos de limpeza é feito de forma correta (diluição, troca periódica etc.)?		
05	O local e instalação para higienização de utensílios/equipamentos são apropriados para limpeza e sanificação, isolados das áreas de produção, através de barreira física?		
06	Os panos de limpeza, vassouras, rodos, esponjas e escovas são de usos exclusivos para este fim, higienizados após o uso e guardados em local adequado?		

E) Aspectos Gerais de Produção

Nº Requisitos	Requisitos	Conformidade	Descrição da Não Conformidade
01	Existe área adequada para o recebimento e encontra-se em boa condição de higiene, com recursos adequados e em número suficiente?		
02	Os produtos não-conformes são devolvidos imediatamente ou separados e identificados para devolução posterior?		
03	A capacidade física do estoque é suficiente, encontra-se em condição higiênica adequada, com aberturas protegidas por telas milimétricas, com portas de acesso mantidas fechadas, iluminação adequada, temperatura ambiente amena (máxima de 26°C) e armazenamento protegido da luz solar direta?		
04	Os estrados e prateleiras são de material adequado, encontram-se em número suficiente, com equipamento que favorece a circulação de ar?		
05	Os produtos de limpeza são armazenados separados dos gêneros alimentícios e dos produtos descartáveis?		
06	Os alimentos são armazenados de forma a evitar riscos de contaminação cruzada ?		
07	Existem recursos adequados para o cumprimento correto dos procedimentos de porcionamento/envase?		
08	A área de distribuição possui recursos adequados e em número suficiente para o cumprimento dos procedimentos adequados?		