

Utilização da técnica Multiplex-PCR na diferenciação dos principais grupos de sorovares de *Listeria monocytogenes* isolados de queijo minas frescal

Rafaela Moledo de Vasconcelos

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientador: Dr. Victor Augustus Marin

Rio de Janeiro

2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Utilização da técnica Multiplex-PCR na diferenciação dos principais grupos de sorovares de *Listeria monocytogenes* isolados de queijo minas frescal

Rafaela Moledo de Vasconcelos

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovada:

_____ (INCQS/FIOCRUZ)

Dr^a Paola Cardarelli Leite

_____ (DM/UERJ)

Dr. João Ramos Costa Andrade

_____ (INCQS/FIOCRUZ)

Dr^a Verônica Viana Vieira

Orientador:

_____ (INCQS/FIOCRUZ)

Dr. Victor Augustus Marin

Rio de Janeiro

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Vasconcelos, Rafaela Moledo

Utilização da técnica Multiplex-PCR na diferenciação dos principais grupos de sorovares de *Listeria monocytogenes* isolados de queijo minas frescal./ Rafaela Moledo de Vasconcelos. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2008.

xviii, 108 p., il., tab.

Dissertação de Mestrado em Vigilância Sanitária, Prog. Pós-Graduação em Vigilância Sanitária/INCQS, 2008. Orientador: Victor Augustus Marin.

1. *Listeria monocytogenes*. 2. Queijo minas frescal. 3. Microbiologia de Alimentos. 4. Multiplex-PCR. I. Título

Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by Multiplex PCR isolated from minas frescal cheese.

À Deus, meu mestre.

“Todas as realizações dignas de valor têm um preço a ser pago. A questão é se você está disposto a pagar o preço para atingi-las – em esforço, sacrifício, paciência, fé e resistência.”

John Maxwell

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado coragem, paciência, sabedoria para seguir adiante e concluir mais uma etapa da minha vida.

À todos que amo pela paciência e colaboração durante esse tempo.

Ao meu orientador Victor Augustus Marin pela atenção, dedicação e inestimáveis conhecimentos transmitidos.

À toda equipe da Coordenação de Pós-Graduação e ao diretor do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

À Célia Maria Romão, chefe do Departamento de Microbiologia (DM), e Isabela Fernandes Delgado, chefe do Departamento de Imunologia (DI) por todo apoio logístico.

À Carla, Márcia, Valéria e Marcelo, do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (DM) pela ajuda, apoio, dedicação, carinho, amizade e disponibilidade de uso do laboratório. Não há palavras para expressar meus sinceros agradecimentos.

À Maria Aparecida e Humberto, do Laboratório de Vacinas Bacterianas II (DI) pela ajuda, apoio, dedicação e disponibilidade de uso do laboratório.

À Paola, Regina, Renata e Érica, do Laboratório de Biologia Molecular (DM), pelo ajuda e disponibilidade de uso do laboratório.

À Cátia, Maysa, Neide, Maria Helena, do DM, pelo apoio logístico.

Ao Eugenio, do DM, pela confiança depositada no meu trabalho.

À Regina, do DI, pela amizade, ajuda, carinho e companheirismo. À todos do DI pelo apoio.

Ao setores de Culturas de Referência, Preparação de Meios de Cultura e de Esterilização de Vidrarias pelo auxílio e disponibilidade.

À todos os funcionários do INCQS, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Ernesto Hofer, do Laboratório de Zoonoses Bacterianas (IOC/FIOCRUZ), pela ajuda técnica.

Aos meus amigos, alunos de Mestrado e Doutorado do INCQS, pela amizade e companheirismo.

Ao apoio do Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

RESUMO

Das espécies existentes de *Listeria*, a *Listeria monocytogenes* é considerada patogênica e está envolvida em casos de listeriose. O sorotipo 4b é mais comum entre cepas responsáveis por surtos e casos esporádicos de doença. Há dois tipos de listeriose: a invasiva que pode até afetar o SNC (Sistema Nervoso Central) e, a não-invasiva. Existem vários registros da presença desse patógeno em leite e derivados como o queijo, assim como diversos surtos de doenças graves associadas à ingestão desses alimentos contaminados. A infecção patogênica por *L. monocytogenes* pode afetar indivíduos saudáveis, e principalmente aqueles pré-dispostos através de doenças que afetam o sistema imunológico, como câncer ou AIDS, e também outros indivíduos susceptíveis como idosos, mulheres grávidas, recém-nascidos ou fetos. Na maioria dos casos os sintomas são diarreia, febre, dor de cabeça e mialgia, e em alguns casos gastroenterite. De acordo com a Resolução – RDC nº 12, de 02/01/2001, do Ministério da Saúde, foi estabelecida ausência de *L. monocytogenes* em 25 g de amostra de queijo minas frescal. O objetivo principal deste trabalho foi fazer o isolamento de *L. monocytogenes* em amostras de queijo tipo minas frescal, utilizando a caracterização fenotípica baseada na ISO11290-1 e a caracterização molecular através da Multiplex-PCR otimizada por Doumith et al (2004). Foram utilizados os meios Oxford, Palcam e Cromogênico para cultura, e 5 pares de primers específicos para Multiplex-PCR. Das 30 amostras analisadas, 14 amostras (47%) apresentaram *Listeria spp.* e 5 (17%) apresentaram *L. monocytogenes*, que pertence ao grupo dos sorovares 1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e, sendo provavelmente o sorovar 1/2b e/ou 3b o encontrado nas amostras analisadas. Tanto a caracterização fenotípica como a caracterização molecular foram eficazes na identificação de *L. monocytogenes*, porém a primeira metodologia requer mais tempo para obtenção de resultados conclusivos.

ABSTRACT

Of the species of *Listeria*, *Listeria monocytogenes* is considered pathogenic and is involved in cases of listeriosis. The serotype 4b is more common among strains responsible for outbreaks and sporadic cases of disease. There are two types of listeriosis: the invasive that may affect the CNS (Central Nervous System), and the non-invasive. There are many reports of the presence of this pathogen in milk and derivatives such cheese, as well as several outbreaks of serious diseases associated with the intake of these contaminated food. The pathogenic infection by *L. monocytogenes* can affect great public health and susceptible individuals through illness that affect the immune system, such as cancer or AIDS, and other individuals likely as elderly, pregnant women, newborns or fetuses. In most cases the symptoms are diarrhea, fever, headache and myalgia, and in some cases gastroenteritis. According to the Resolution - RDC N°. 12, 02/01/2001, of the Ministry of Health, were established absence of *L. monocytogenes* in 25 g sample of cheese frescal. The main objective of this study was to the isolation of *L. monocytogenes* in samples of minas frescal type cheese, using conventional microbiology based on standard method ISO11290-1, and molecular biology through Multiplex-PCR optimized by Doumith et al (2004). Were used Oxford, Palcam and Chromogenic media for culture, and 5 pairs of specific primers for Multiplex-PCR. Of the 30 samples, 14 samples (47%) showed *Listeria spp.* and 5 (17%) showed *L. monocytogenes*, which belongs to the group of serovars 1/2b, 3b, 4b, 4d and 4e, being probably the serovar 1/2b and/or 3b found in the samples. As much the phenotypic characterization as a molecular characterization were effective in the identification of *L. monocytogenes*, but the first method requires more time to obtain conclusive results.

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijo

APPCC - Análise dos Pontos Críticos de Controle

Aw – Atividade Aquosa

BAM - *Bacterial Analytical Manual*

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

FDA/CFSAN - *Food and Drug Administration's Center for Food Safety and Applied Nutrition*

FSIS - *Food Safety and Inspection Service*

IFT - *Institute of Food Technologists*

MRA - *Microbiological Risk Assessment*

NMP – Número mais Provável

OMC - Organização Mundial de Comércio

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PIQ - Padrão de Identidade e Qualidade

SIF - Serviço de Inspeção Federal

SUS - Sistema Único de Saúde

UFC/g – Unidades Formadoras de Colônias por grama

WHO/FAO - *World Health Organization/Food and Agriculture Organization*

WTO/SPS - *World Trade Organization/Sanitary and Phytosanitary Agreement*

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Limites de crescimento e sobrevivência para <i>L. monocytogenes</i>	7
Tabela 2 - Nº de casos de listeriose humana em diversos países de 1999-2001	9
Tabela 3 - Sequências de iniciadores utilizados para amplificação dos genes, tamanho (pb) e especificidade do sorovar de <i>Listeria</i> spp.	36
Quadro 1 - Coloração do meio de cultura <i>Half Fraser</i> (Marca A) após incubação por 24h a 30°C	38
Quadro 2 – Aspecto do caldo BHI (Marca A) após incubação por 5h a 35°C	39
Quadro 3 - Coloração do meio de cultura <i>Fraser</i> (Marca A) após incubação por 48h a 35°C	39
Quadro 4 - Características das colônias obtidas nos meios Oxford, Palcam e Cromogênico (Marca A) após incubação por 48h a 35°C	40
Quadro 5 – Indicação de hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas do meio Oxford (Marca A).....	41
Quadro 6 – Indicação de hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas do meio Palcam (Marca A).....	41
Quadro 7 – Indicação de hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas do meio Cromogênico (Marca A)	42
Quadro 8 - Multiplex-PCR de isolados obtidos de amostra de queijo minas frescal, controles positivos e negativo, e cepas de referência (Marca A).....	43
Quadro 9 - Coloração do meio de cultura <i>Half Fraser</i> (Marca B) após incubação por 24h a 30°C	44
Quadro 10 – Aspecto do caldo BHI (Marca B) após incubação por 5h a 35°C ..	45
Quadro 11 - Coloração do meio de cultura <i>Fraser</i> (Marca B) após incubação por 48h a 35°C	45

Quadro 12 - Características das colônias obtidas nos meios Oxford, Palcam e Cromogênico (Marca B) após incubação por 48h a 35°C	45
Quadro 13 – Indicação de hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas do meio Oxford (Marca B).....	46
Quadro 14 - Multiplex-PCR de isolados obtidos de amostra de queijo minas frescal, controles positivos e negativo, e cepas de referência (Marca B)	47
Quadro 15 - Coloração do meio de cultura <i>Half Fraser</i> (Marca C) após incubação por 24h a 30°C	48
Quadro 16 – Aspecto do caldo BHI (Marca C) após incubação por 5h a 35°C ..	49
Quadro 17 - Coloração do meio de cultura Fraser (Marca C) após incubação por 48h a 35°C	49
Quadro 18 - Características das colônias obtidas nos meios Oxford, Palcam e Cromogênico (Marca C) após incubação por 48h a 35°C	50
Quadro 19 – Indicação de hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas do meio Oxford (Marca C).....	50
Quadro 20 – Indicação de hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas do meio Palcam (Marca C)	51
Quadro 21 – Indicação de hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas do meio Cromogênico (Marca C).....	51
Quadro 22 - Multiplex-PCR de isolados obtidos de amostra de queijo minas frescal, controles positivos e negativo (Marca C)	52
Quadro 23 - Multiplex-PCR de isolados obtidos de amostra de queijo minas frescal, cujo DNA foi extraído pelo Kit Qiagen, controles positivos e negativo (Marca C)	53
Quadro 24 - Coloração do meio de cultura <i>Half Fraser</i> (Marca D) após incubação por 24h a 30°C	55

Quadro 25 – Aspecto do caldo BHI (Marca D) após incubação por 5h a 35°C .	55
Quadro 26 - Coloração do meio de cultura <i>Fraser</i> (Marca D) após incubação por 48h a 35°C	56
Quadro 27 - Características das colônias obtidas nos meios Oxford, Palcam e Cromogênico (Marca D) após incubação por 48h a 35°C	56
Quadro 28 - Multiplex-PCR de isolados obtidos de amostra de queijo minas fresco, controles positivos e negativo, e cepas de referência (Marca D).....	57
Quadro 29 - Coloração do meio de cultura <i>Half Fraser</i> (Marca E) após incubação por 24h a 30°C	58
Quadro 30 – Aspecto do caldo BHI (Marca E) após incubação por 5h a 35°C .	59
Quadro 31 - Coloração do meio de cultura <i>Fraser</i> (Marca E) após incubação por 48h a 35°C	59
Quadro 32 - Características das colônias obtidas nos meios Oxford, Palcam e Cromogênico (Marca E) após incubação por 48h a 35°C	60
Quadro 33 – Indicação de hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas do meio Oxford (Marca E).....	61
Quadro 34 – Indicação de hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas do meio Palcam (Marca E).....	62
Quadro 35 – Indicação de hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas do meio Cromogênico (Marca E)	63
Quadro 36 - Multiplex-PCR de isolados obtidos de amostra de queijo minas fresco, controles positivos e negativo, e cepas de referência (Marca E)	65
Quadro 37 - Coloração do meio de cultura <i>Half Fraser</i> (Marca F) após incubação por 24h a 30°C	67
Quadro 38 – Aspecto do caldo BHI (Marca F) após incubação por 5h a 35°C ..	67

Quadro 39 - Coloração do meio de cultura <i>Fraser</i> (Marca F) após incubação por 48h a 35°C	68
Quadro 40 - Características das colônias obtidas nos meios Oxford, Palcam e Cromogênico (Marca F) após incubação por 48h a 35°C	68
Quadro 41 – Indicação de hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas do meio Oxford (Marca F).....	69
Quadro 42 – Indicação de hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas do meio Palcam (Marca F).....	70
Quadro 43 – Indicação de hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas do meio Cromogênico (Marca F)	70
Quadro 44 - Multiplex-PCR de isolados obtidos de amostra de queijo minas frescal, controle positivo e negativo (Marca F)	71
Quadro 45 - Multiplex-PCR de isolados obtidos de amostra de queijo minas frescal e controles positivos (Marca E) - Caldo <i>Half Fraser</i>	72
Quadro 46 - Multiplex-PCR de isolados obtidos de amostra de queijo minas frescal e controles positivos (Marca A) - Caldo <i>Fraser</i>	74
Quadro 47 - Informações sobre a rotulagem dos queijos e percentual (%) de amostras com <i>Listeria spp.</i>	76

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

- Esquema 1 - Representação do isolamento de *Listeria monocytogenes* de queijo minas frescal, de acordo com a norma ISO 11.290 Part 1 (*International Organisation for Standardisation*, Geneva) adaptado (SCOTTER et al., 2001), e segundo Kaclíková et al. (2003). 37
- Figura 1 - Gel ilustrativo da amplificação pela Multiplex-PCR do DNA extraído de *Listeria spp.* isoladas de amostra de queijo minas frescal (Marca A), controles positivos 1 e 2, controle negativo, cepas de referência 43
- Figura 2 - Gel ilustrativo da amplificação pela Multiplex-PCR do DNA extraído de *Listeria spp.* isoladas de amostra de queijo minas frescal (Marca B), controles positivos 1 e 2, controle negativo, cepas de referência 47
- Figura 3 e 4 - Gel ilustrativo da amplificação pela Multiplex-PCR do DNA extraído de *Listeria spp.* isoladas de amostra de queijo minas frescal (Marca C), controles positivos 1, 2 e controle negativo..... 52
- Figura 5 - Gel ilustrativo da amplificação pela Multiplex-PCR do DNA extraído de *Listeria spp.*, com o Kit Qiagen, isolada de amostra de queijo minas frescal (Marca C), controles positivos 1, 2 e controle negativo. 54
- Figura 6 – Gel ilustrativo da amplificação pela Multiplex-PCR do DNA extraído de *Listeria spp.* isoladas de amostra de queijo minas frescal (Marca D), controles positivos 1 e 2, controle negativo e cepas de referência 57
- Figura 7 e 8 - Gel ilustrativo da amplificação pela Multiplex-PCR do DNA extraído de *Listeria spp.* isoladas de amostra de queijo minas frescal (Marca E), controles positivos 1 e 2, controle negativo e cepas de referência 65
- Figura 9 - Gel ilustrativo da amplificação pela Multiplex-PCR do DNA extraído de *Listeria spp.* isolada de amostra de queijo minas frescal (Marca E), controles positivos 1 e 2, controle negativo e cepas de referência 66
- Figura 10 – Gel ilustrativo da amplificação pela Multiplex-PCR do DNA extraído de *Listeria spp.* isoladas de amostra de queijo minas frescal (Marca F), controle

positivo 2 e controle negativo.....	72
Figura 11 - Gel ilustrativo da amplificação pela Multiplex-PCR do DNA extraído de <i>Listeria spp.</i> isoladas de amostra de queijo minas frescal (Marca A) e controles positivos - Caldo <i>Half Fraser</i>	73
Figura 12 – Gel ilustrativo da amplificação por Simplex-PCR do DNA extraído de <i>Listeria spp.</i> isolada de amostra de queijo minas frescal (Marca A), controles positivos e negativo - Caldo <i>Half Fraser</i>	73
Figura 13 – Gel ilustrativo da amplificação pela Multiplex-PCR do DNA extraído de <i>Listeria spp.</i> isoladas de amostra de queijo minas frescal (Marca A) e controles positivos - Caldo <i>Fraser</i>	74

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O gênero <i>Listeria</i>	1
1.2 A doença – listeriose	4
1.3 Incidência da doença e impacto na economia.....	9
1.4 O leite	10
1.4.1 Produção no Brasil	10
1.4.2 Qualidade do leite.....	11
1.5 Um dos derivados do leite – queijo	13
1.5.1 Histórico	13
1.5.2 Produção no Brasil	14
1.5.3 Contaminação do queijo.....	14
1.6 Estratégias para minimização dos riscos	17
1.6.1 O papel do Governo e da indústria.....	17
1.6.2 Avaliação de risco	21
1.7 Detecção molecular da <i>Listeria monocytogenes</i>	23
1.7.1 Multiplex-PCR.....	26
2 OBJETIVOS	28
3 METODOLOGIA.....	29
3.1 Amostragem.....	29
3.2 Técnica microbiológica baseada na ISO 11290-1.....	29
3.3 Técnica microbiológica baseada em Kaclíková et al. (2003).....	32
3.4 Controle positivo.....	32
3.5 Extração de DNA	33
3.6 Multiplex-PCR.	35

4 RESULTADOS	38
4.1 Marca A.	38
4.1.1 Coleta das amostras.....	38
4.1.2 Ensaio microbiológico.	38
4.1.3 Extração de DNA e Multiplex-PCR.	42
4.2 Marca B.	44
4.2.1 Coleta das amostras.....	44
4.2.2 Ensaio microbiológico.	44
4.2.3 Extração de DNA e Multiplex-PCR.	47
4.3 Marca C.	48
4.3.1 Coleta das amostras.....	48
4.3.2 Ensaio microbiológico.	48
4.3.3 Extração de DNA e Multiplex-PCR.	52
4.3.4 Ensaio confirmatório.	53
4.4 Marca D.	54
4.4.1 Coleta das amostras.....	54
4.4.2 Ensaio microbiológico.	55
4.4.3 Extração de DNA e Multiplex-PCR.	57
4.5 Marca E.	58
4.5.1 Coleta das amostras.....	58
4.5.2 Ensaio microbiológico.	58
4.5.3 Ensaio confirmatório.	64
4.5.4 Extração de DNA e Multiplex-PCR.	64
4.6 Marca F.	66
4.6.1 Coleta das amostras.....	66

4.6.2 Ensaio microbiológicos.....	67
4.6.3 Ensaio confirmatórios.....	71
4.6.4 Extração de DNA e Multiplex-PCR.....	71
4.7 Marca A – Caldo Half Fraser e Fraser.....	72
4.7.1 Caldo Half Fraser.....	72
4.7.2 Caldo Fraser.....	74
4.8 Marca F – Caldo Half Fraser e Fraser.....	75
4.9 Rotulagem dos queijos.....	75
5 DISCUSSÃO	77
6 CONCLUSÕES	87
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
8 ANEXOS	101

1 INTRODUÇÃO

As doenças causadas por alimentos contaminados possuem um impacto na saúde pública e na economia em todo mundo. O órgão americano *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) estima que a cada ano ocorra 76 milhões de casos de doenças transmitidas por alimentos, com 325.000 hospitalizações e 5.000 mortes nos Estados Unidos. A notificação de casos e surtos de doenças ainda são afetados pela consciência de consumo, fiscalização no local, departamentos de saúde pública, períodos de incubação variáveis e a severidade da doença (GANDHI e CHIKINDAS, 2006).

O patógeno *Listeria* é menos comumente reportado como causador de doenças quando comparado a *Campylobacter* e *Salmonella*, entretanto pode sobreviver e crescer sob várias condições ambientais e causar listeriose, uma doença severa com alta taxa de hospitalização e casos de fatalidade. Alguns fatores podem influenciar a contaminação de alimentos por *Listeria* e a incidência da listeriose, como os avanços da medicina, que continuam a afetar a dinâmica da população, além de recentes modificações na produção de alimentos, práticas de processamento, globalização da indústria de alimentos e o crescimento da demanda por produtos importados. Ainda pode ser destacada a mudança dos hábitos alimentares, incluindo o consumo de minimamente processados e produtos prontos para consumo refrigerados ou congelados (GANDHI e CHIKINDAS, 2006).

1.1 O gênero *Listeria*

Existem seis espécies de *Listeria*: *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* e *Listeria grayi*. Somente duas espécies são consideradas patogênicas: *L. monocytogenes* em humanos e *L. ivanovii* em outros mamíferos. Algumas pesquisas indicam que *L. seeligeri* e *L. ivanovii* causam doenças em humanos (GASANOV, HUGHES e HANSBRO, 2005). Segundo Fröder (2005), existe uma sétima espécie que se chama *L. murrayi*, que é considerada não-patogênica.

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva, móvel devido ao seu flagelo (FDA/CFSAN, 2004), não-esporulada (BUBERT et al., 1999), com morfologia cocóide a cocobacilar (TRABULSI et al., 1999). Apresenta um movimento rotatório de uma extremidade sobre a outra a 22 °C. É catalase-positiva. Produz ácidos, mas não gás, a partir de vários carboidratos (JAWETZ et al., 1991), é oxidase-negativa (TRABULSI et al., 1999), e beta-hemolítica (RAMASWAMY et al., 2007). É um microrganismo anaeróbio facultativo (FARBER e PETERKIN, 1991). Suas células podem medir 0,4 a 0,5 µm por 1,0 a 2,0 µm (KONEMAN et al., 2001). É encontrada em pelo menos 37 espécies de mamíferos (FDA/CFSAN, 2004). A *L. monocytogenes* foi encontrada em mais de 40 espécies de mamíferos (incluindo bovinos e ovinos) e 17 espécies de aves (domésticas e silvestres), e também foi isolada de pulgas, carrapatos e crustáceos (KONEMAN et al., 2001), como também de solo, poeira, água, esgoto, vegetais e silagem (WHO/FAO, 2004b).

É um patógeno intracelular facultativo que penetra no cérebro por rota não-hematogênica por transporte retrógrado dentro dos nervos cranianos. A invasão dessa espécie também pode ser provavelmente facilitada por fagócitos ou ser direta nas células endoteliais (DREVETS; LEENEN e GREENFIELD, 2004). Essa bactéria invade, replica e se multiplica em uma variedade de células (BUBERT et al., 1999). Quando entra na célula por fagocitose, secreta enzimas que degradam a membrana do fagossomo, sendo liberada para dentro do citossol onde, além de crescer e se dividir, espalha-se para as células adjacentes por ativação do sistema de motilidade da célula hospedeira (ALBERTS et al., 1997b).

Segundo o *Bacterial Analytical Manual* (BAM) do FDA/CFSAN (2003), Doumith et al. (2004) e Nelson et al. (2004), existem 13 sorovares da *L. monocytogenes*: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4ab e 7. Entretanto para Borucki e Call (2003) há 14 sorotipos de *L. monocytogenes* descritos e, segundo Warburton et al. (2003), com o sorovar 4b(x) totaliza-se também, 14 sorovares.

Baseado na variabilidade dos genes, três linhagens I, II e III de *L. monocytogenes*, são relacionadas com os sorovares: I.1 (1/2a e 3a), I.2 (1/2c e 3c), II.1 (4b, 4d e 4e), II.2 (1/2b, 3b e 7) e III (4a e 4c) (DOUMITH et al., 2004). Segundo Nelson et al. (2004), as espécies existem em duas maiores divisões

genômicas, a divisão I consiste nos sorotipos 1/2a, 1/2c, 3a e 3c, e a divisão II abrange os sorotipos 1/2b, 4b e 3b.

De acordo com Borucki et al. (2005), técnicas de subtipagem molecular têm identificado duas maiores divisões filogenéticas dentro das espécies, com divisão I incluindo os sorotipos 1/2b, 3b e 4b e divisão II que consiste nos sorotipos 1/2a, 1/2c, 3a e 3c. A terceira divisão consiste nos sorotipos 4a, 4c e uma subsérie das cepas 4b também estão descritas. Segundo Gray et al. (2004), cepas dos sorotipos 1/2b, 4b, 3b e 3c pertencem ao grupo da linhagem I, enquanto os sorotipos 1/2a, 1/2c e 3a pertencem ao grupo da linhagem II. A linhagem III é o terceiro grupo, grupo taxonômico distinto, onde predominantemente incluem-se os sorotipos 4a e 4c. No estudo de Nightingale, Windhan, Wiedmann (2005), foram descritos descritos 3 linhagens para *L. monocytogenes*, onde linhagem I abrangia os sorotipos 1/2b, 3b, 3c, 4b, sendo considerada mais patogênica e a mais representada em isolados clínicos humanos; linhagem II com 1/2a, 1/2c, 3c, mais frequentemente reportados em isolados de alimentos; e linhagem III associada a animais.

De acordo com Nakama et al. (1998); Swaminathan (2001); Drevets, Leenen e Greenfield (2004); Gasanov, Hughes e Hansbro (2005) e Borucki et al. (2005), 3 dos 13 sorotipos de *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b e 4b), são mais comumente implicados em casos de listeriose. No mínimo 95% das cepas isoladas de alimentos e pacientes são dos sorovares 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b. Esses sorovares representam mais de 98% dos 5000 isolados coletados de alimentos e pacientes nos últimos 3 anos (DOUMITH et al., 2004). Entre as cepas recuperadas de alimentos, o sorotipo 1/2a é mais representado. O sorotipo 4b, entretanto, mais representado quando comparado com outros sorotipos entre cepas responsáveis por surtos e casos esporádicos de listeriose (NELSON et al., 2004). Na Itália, de 5788 amostras de alimentos analisadas, coletadas de 1993 a 2004, 121 estavam contaminadas com *L. monocytogenes*, onde 61,5% das cepas pertenciam aos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b (LATORRE et al., 2007).

Num estudo feito pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), em 1986, foi mostrado que sorotipos 1/2a (30%), 1/2b (32%) e 4b (34%) representam a maioria dos isolados de 144 casos humanos esporádicos (WIEDMANN, 2003). O sorotipo 4b tem sido implicado em 50% dos casos de

listeriose (FSAI, 2005). Segundo Fröder (2005), o sorotipo 4b é responsável por 33 a 50% de casos esporádicos em humanos. De acordo com Lukinmaa et al. (2004), as infecções invasivas por *L. monocytogenes* têm sido principalmente causadas pelos sorotipos 1/2a (53%) e 4b (27%). O que também é relatado por Ramaswamy et al. (2007), que afirmam que os maiores surtos de doença invasiva são causados pelo sorotipo 4b.

Estudos têm mostrado que as cepas da linhagem I são mais comuns em casos de listeriose humana, enquanto as cepas da linhagem III são mais comuns em casos de listeriose animal (GRAY et al., 2004). Na Finlândia, em 1999, um grupo de pacientes teve infecção por *L. monocytogenes*, causada por um sorotipo não usual, o 3a (LUKINMAA et al., 2004). As taxas nesse país são 42.3% para sorotipo 1/2a e 57.7% para sorotipo 4b em 1989 (UEDA et al., 2005).

No Japão, os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b foram os mais freqüentemente isolados de pacientes com listeriose. As taxas de isolados de sorotipos 4b no Japão é de 60.6% no período de 1958-1984. As taxas do sorotipo 4b foram altas em 11 países e o segundo lugar ficou com o sorotipo 1/2a em 10 países (UEDA et al., 2005).

1.2 A doença – Listeriose

De acordo com WHO/FAO (2004b), estudos demonstram que *Listeria monocytogenes* pode ter sido isolada de pacientes na Alemanha em 1891. Murray, Webb e Swann (1926) isolaram uma pequena bactéria Gram-positiva que tinha causado doença em 1924 em coelhos e porcos da Índia. Eles nomearam o organismo de *Bacterium monocytogenes*. Pirie, em 1927 isolou e descreveu o mesmo organismo de fígado de roedores na África do Sul nomeando a bactéria de *Listerella hepatolytica*, em homenagem ao lorde Joseph Lister. Em 1940 o nome foi alterado para *Listeria monocytogenes*. O 1º caso documentado de listeriose humana envolveu um soldado que sofreu de meningite no final da Guerra Mundial (ALLERBERGER, 2003).

Segundo IFT (2004), a *Listeria* tem sido reconhecida como um importante patógeno derivado do alimento. Esse microrganismo causa aproximadamente 1600 casos de doença, resultando em aproximadamente

415 mortes anualmente. De acordo com Cocolin et al. (2002), IFT (2004) e Fröder (2005), somente as espécies hemolíticas (*L. monocytogenes*, *L. seeligeri* e *L. ivanovii*) são associadas com patogenicidade. Destes, somente a *L. monocytogenes* é consistentemente patogênica; *L. ivanovii* raramente é envolvida em patogenicidade humana e *L. seeligeri* somente uma vez foi causa de meningite em adulto (IFT, 2004). A hemolisina é o mais importante fator de virulência da *Listeria* (FRÖDER, 2005).

A comparação do genoma das cepas que causam surtos é uma importante revelação dentro da genética, definindo a sobrevivência, crescimento e patogenicidade característica de *L. monocytogenes* (NELSON et al., 2004).

O aumento do risco de exposição aos agentes agressores, a depressão das defesas do hospedeiro e a emergência de cepas bacterianas emergentes resistentes a antibióticos são causas associadas e estão envolvidos nas zoonoses bacterianas emergentes ou re-emergentes (BLANCOU et al., 2005).

A infecção patogênica por *L. monocytogenes* pode afetar indivíduos pré-dispostos através de doenças que afetam o sistema imunológico, como câncer ou AIDS, e também outros indivíduos susceptíveis como idosos, mulheres grávidas, recém-nascidos ou fetos (GASANOV, HUGHES e HANSBRO, 2005). Em um estudo verificou-se de que a listeriose seja mais comum em casos de tumores hemáticos, p. ex: leucemia, linfoma ou mieloma múltiplo, do que em tumores sólidos (KONEMAN et al., 2001). A população alvo da doença também pode ser aquela menos freqüentemente reportada, como os diabéticos, cirróticos, asmáticos e pacientes com colite ulcerativa (FDA/CFSAN, 2004), doentes renais, pacientes que fazem diálise contínua e aqueles que realizaram transplante de órgãos renal ou de medula óssea (KONEMAN et al., 2001). Os imunocomprometidos que também podem ser afetados são aqueles induzidos por tratamento médico, como com corticosteróides (IFT, 2004).

Os sintomas da listeriose são: febre alta, tremores, dor de cabeça grave, rigidez no pescoço e náusea. A listeriose em grávidas pode provocar aborto e nascimento prematuro (FSAI, 2005). Se o infectado for do grupo de risco, dentro de dois meses apresentará febre e os primeiros sinais de doença (CDC, 2005). A maioria dos lactentes infectados torna-se gravemente doente, podendo apresentar abscessos disseminados em órgãos como cérebro,

pulmões, fígado, baço, rins, ossos, pele e tecidos moles (KONEMAN et al., 2001).

Atualmente, sabe-se da existência de dois “tipos” de listeriose humana: um relacionado à forma mais grave da doença e que compromete principalmente o sistema nervoso central. O período de incubação da listeriose pode variar de um dia a algumas semanas. E o segundo tipo, mais brando, é uma doença gastrointestinal autolimitada e não invasiva, caracterizada pelo desenvolvimento de febre, diarreia, náusea, vômito, dor de cabeça e mialgia, após 12 a 24 horas de exposição (FRÖDER, 2005).

A forma de listeriose que invade o sistema nervoso central inclui meningite, encefalite e abscesso (IFT, 2004). Os adultos podem desenvolver meningoencefalite, bacteremia e, raramente, infecções localizadas (JAWETZ et al., 1991). A taxa de mortalidade de meningite é de 70%. Formas localizadas de listeriose, são raras, incluem endocardite e osteomielite, com envolvimento de outros sítios como a pele, baço, vesícula e nódulos linfáticos (IFT, 2004).

A presença frequente de *L. monocytogenes* em alimentos faz com que indivíduos sadios sejam expostos continuamente a antígenos de *Listeria*, o que provavelmente contribui para manutenção das células T de memória anti-*Listeria*. Entretanto, em pacientes debilitados e imunocomprometidos, a proliferação irrestrita da *Listeria* no fígado, que é o primeiro órgão-alvo após a translocação intestinal, provoca uma bacteremia que leva à invasão de outros órgãos-alvo como o cérebro e o útero (RAMASWAMY et al., 2007).

A patogênese da *L. monocytogenes* pode ser explicada por vários mecanismos de virulência. Alguns dos marcadores de virulência da *Listeria* são a capacidade de crescimento intracelular, a produção de hemolisina e lecitinase. Queijos contaminados por *L. monocytogenes* possuem no mínimo um fator de virulência. Nesse estudo foi verificado que dos três sorotipos analisados, o 1/2a apresenta um maior número de fatores de virulência, seguido pelo 4b e 1/2b (SILVA et al., 2001).

Segundo Doumith et al. (2004) e Gasanov, Hughes e Hansbro (2005), embora rara, a listeriose possui alta mortalidade (20-30%). A ingestão de alimentos contaminados é considerada a fonte primária de infecção para casos de listeriose humana epidêmica e esporádica (DOUMITH et al., 2004).

A via natural de infecção pela *Listeria* é o trato gastrintestinal (JAWETZ et al., 1991). A gastroenterite aguda afeta 250 a 350 milhões de pessoas nos Estados Unidos anualmente, e estima-se que 22% a 30% desses casos são devido a doenças derivadas de alimentos (BERVELY e BEATTIE, 2004). Alimentos tipicamente associados com contaminação por *L. monocytogenes* inclui produtos derivados do leite (ex: queijos macios, leite não pasteurizado, etc), saladas preparadas (ex: broto de feijão, etc), certos tipos de carne bovina, de ave e peixe (ex: patê, salsichas etc) (FSAI, 2005) e carne suína (FRÖDER, 2005). Os alimentos prontos para consumo, em armazenamento frio, com longa vida de prateleira, com contaminação pós-processamento, que suportam o crescimento de *L. monocytogenes*, também são considerados como fontes de contaminação (FSAI, 2005). A contaminação não ocorre somente durante o processamento de alimentos, mas também na retirada da matéria-prima do ambiente (BUBERT et al., 1999). A presença de *L. monocytogenes* no processamento de alimentos, distribuição e ambientes de revenda, se relaciona com a resistência inerente e habilidade em crescer em vários alimentos, incluindo armazenamento refrigerado, faz com que o patógeno seja particularmente difícil de controlar e regular (NELSON et al., 2004). Segundo FSAI (2005), a *L. monocytogenes* tem alta resistência ao calor, sal e pH ácido. Pode crescer abaixo da temperatura de refrigeração (Tabela 1).

Tabela 1 - Limites de crescimento e sobrevivência para L. monocytogenes

Parâmetro	Mínimo	Máximo	Ótimo	Pode sobreviver (mas não crescer)
Temperatura (°C)	-1.5 a + 3	45	30 a 37	-18
pH	4.2 a 4.3	9.4 a 9.5	7.0	3.3 a 4.2
Atividade de água (Aw)	0.90 a 0.93	> 0.99	0.97	< 0.90
Sal (%)	<0.5	12 a 16	Não aplicável	>= 20

Fonte: FSAI (2005)

A *L. monocytogenes* é considerada uma espécie psicotrófica potencialmente patogênica, isto é, pode ser encontrada em ambientes onde temperaturas estão constantemente entre 15° e 20°C. A presença de grande número de espécies de microrganismos psicotróficos pode estar relacionada com ocorrência de toxiinfecções alimentares humanas ou com deterioração e perda da qualidade organoléptica dos alimentos (LISITA, 2005).

A *Listeria* necessita de vários aminoácidos para seu desenvolvimento, entre eles, cisteína, leucina, isoleucina, arginina, valina, riboflavina, biotina, metionina e, sua multiplicação, é estimulada por Fe³⁺ e fenilalanina. Glicose e glutamina são necessárias como fontes primárias de carbono e nitrogênio (FRÖDER, 2005).

O período de incubação da listeriose é de 1-90 dias. Os sintomas incluem aqueles parecidos com resfriado (ex: febre, dor de cabeça), diarreia, vômito. Em casos perinatais pode haver septicemia, morte intrauterina, nascimento prematuro, natimortos. Em casos não peri-natais os sintomas mais comumente associados são bacteremia e meningite (LAKE et al., 2002).

O período de incubação da gastroenterite febril não-invasiva é de 11 horas a 7 dias, com média de 18 horas. Os sintomas são diarreia, febre, dor muscular, dor de cabeça, e menos frequente câimbras abdominais e vômitos (LAKE et al., 2002).

A dose infectante de *L. monocytogenes* é desconhecida, mas acredita-se que ela pode variar de acordo com a cepa e susceptibilidade da vítima. Em casos de leite pasteurizado ou não, em pessoas susceptíveis, menos que 10³ organismos podem causar doença (FDA/CFSAN, 2004). Estudos mostram que casos esporádicos ou epidêmicos de doenças derivadas de alimentos contaminados por *L. monocytogenes* são usualmente causados por mais de 100 UFC/g, entretanto um surto de listeriose foi notificado nos EUA por alimento contaminado por menos de 0.3 UFC/g (SWAMINATHAN, 2001). A *International Commission on Microbiological Specification for Foods* concluiu que 100 UFC de *L. monocytogenes* por grama de alimento é aceitável para consumidores que não estão no grupo de risco (RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2004).

Segundo Fröder (2005), informações sobre a população de *L. monocytogenes* em alimentos contaminados envolvidos em surtos indicam que

populações entre $10^3 - 10^4$ UFC/g de alimento foram responsáveis pela doença. Entretanto, estudo realizado na Finlândia indica que a exposição da população de risco a doses baixas [0,3 Número Mais Provável (NMP)/g] de *L. monocytogenes*, por períodos prolongados, pode também levar ao desenvolvimento da doença.

1.3 Incidência da doença e impacto na economia

Atualmente, leite e derivados têm sido os veículos de transmissão mais comumente associados a surtos de listeriose. Nos Estados Unidos, mais de 150 casos de listeriose, incluindo 54 mortes, resultaram do consumo de leite pasteurizado e queijo estilo mexicano contendo o patógeno (NERO, 2005). Nesse país, há cerca de 1850 casos de listeriose / ano, dentre os quais 425 casos de fatalidade (FSAI, 2005). Segundo IFT (2004), dos 2493 casos de doença por ano nos EUA, 499 foram de morte. Um total de 466 casos de listeriose ocorreu durante doze surtos entre 1970 a 2002 (FRÖDER, 2005).

Na Austrália há cerca de 40-44 casos de listeriose por ano (GASANOV, HUGHES e HANSBRO, 2005). Na Irlanda há cerca de 6.5 casos de listeriose/ano, no período de 2000-2003 (FSAI, 2005). Outro surto foi relatado na Suíça, associado ao consumo de “soft cheese” tipo *Vacherin Mont d’Or* contaminado, envolvendo mais de 120 pessoas e 31 mortes (NERO, 2005). Foi feito em levantamento pela União Européia do nº de casos de doença em diversos países, no período de 1999 a 2001, conforme representado na Tabela 2.

Tabela 2 – Nº de casos de listeriose humana em diversos países de 1999-2001

País	1999	2000	2001
Bélgica	64	48	57
Dinamarca	44	39	38
Finlândia	46	18	28
França	275	261	187
Alemanha	31	33	213
Espanha	32	35	57
Suíça	27	46	67
Inglaterra	108	100	136

Fonte: EU (2001)

Estima-se que 76 milhões de casos de doenças derivadas de alimentos ocorrem a cada ano nos Estados Unidos, e que isso custe entre \$6.5 a \$34.9 bilhões de dólares com cuidados médicos. Vários patógenos, bactérias, vírus ou parasitas são responsáveis por essas doenças. Dos 13.8 milhões de casos de doenças por agentes conhecidos, aproximadamente 30% são devido a bactérias (IFT, 2004).

As pessoas que contraem essas doenças geralmente se afastam do trabalho por 1 a 2 dias, podendo apresentar complicações, não voltando mais ao trabalho, outros ainda vão a óbito, levando à queda na produtividade, o que reflete de forma negativa na economia do país (BUZBY e ROBERTS, 1996 apud RANTHUM, 2004). No Brasil não há relato sobre o impacto dessas doenças na economia, mas se pode ter uma noção quando se encontra valores acima de R\$ 100.000,00 pagos pelo SUS para internações por doenças de origem alimentar e hídrica (RANTHUM, 2004).

Segundo Wiedmann (2003) e IFT (2004), a *Listeria* ocupa o 2º lugar mais comum como causa conhecida de infecção fatal causada por alimento. Ela é responsável por 28% das mortes relatadas devido aos alimentos contaminados (IFT, 2004).

1.4 O leite

1.4.1 Produção no Brasil

Atualmente o país possui uma posição de destaque no cenário mundial de produção de leite, apesar da produtividade de seu rebanho leiteiro ser relativamente baixa. A produção leiteira brasileira é alta devido ao tamanho do rebanho, fazendo com que o país ocupe o sexto lugar no “ranking” mundial (NERO, 2005).

Em 2002, o Brasil produziu 23,3 milhões de toneladas de leite fluido, que corresponde 32,3% do leite produzido na América do Sul e 4,7% do leite produzido no mundo. 24% do leite produzido no país vem de fazendas de pequeno ou médio porte. Essas fazendas produzem 50-500 litros / dia, e sua produção é destinada a cooperativas, que intermediam a transferência do leite

de vaca refrigerado para grandes companhias processadoras de leite (NERO et al., 2004).

Segundo Nero et al. (2004), devido a flutuações no mercado de leite no Brasil, os pequenos produtores encontram no comércio alternativo, a venda de leite para pessoas que preferem esse tipo de leite, ao invés dos leites processados a altas temperaturas. Apesar de ilegal, a venda a varejo de leite cru para consumo humano é uma importante alternativa porque existe demanda para leite não pasteurizado no país.

Em 1999, foi realizada uma pesquisa com 1154 indivíduos, que moram em áreas rurais dentro das quatro maiores regiões produtoras de leite, sobre as razões para preferência do leite cru ao leite pasteurizado. 61% dos indivíduos entrevistados alegam que o leite cru é “mais forte”, “mais nutritivo”, “mais natural”, “mais gorduroso” e “mais confiável porque não é adicionado água ou produtos químicos”. Outros 24% das pessoas entrevistadas informaram que compram leite cru porque é mais barato. O fácil acesso ao produto também foi citado como fator decisivo (NERO et al., 2004).

1.4.2 Qualidade do leite

De acordo com o Instituto Brasileiro de Estatísticas Nacionais e Geografia, 35.6 a 42.0 % do leite produzido no país no período de 1998 e 2001, não são inspecionados por nenhuma autoridade. Esse percentual relaciona-se geralmente ao leite produzido pelas pequenas fazendas produtoras (NERO et al., 2004). Cerca de 48% da produção leiteira brasileira é realizada de forma clandestina, ou seja, à margem de qualquer tipo de fiscalização efetiva por parte das autoridades competentes (ALMEIDA FILHO et al., 2002 apud LISITA, 2005). Considerando que o leite não-inspecionado pode conter vários agentes perigosos à saúde, e a importância dos pequenos produtores para o mercado de leite do Brasil, é necessário avaliar os fatores de risco associados como a contaminação por *L. monocytogenes* (NERO et al., 2004).

Com o crescimento da produção de leite sob inspeção federal, cresce também a produção de leite clandestino. A produção informal de produtos lácteos brasileiros cresceu 50% e a formal apenas 16% na década de 90. Com isso aumenta o consumo de produtos clandestinos, indicando que a população

brasileira está cada vez mais consumindo produtos de baixa qualidade, que podem comprometer sua saúde (SCALCO, 2004).

O leite, devido à sua riqueza nutritiva, constitui excelente meio de cultura para desenvolvimento de diversos microrganismos, sendo veículo de transmissão de importantes zoonoses para o homem (CATÃO e CEBALLOS, 2001).

O tipo de produção que ocorre na maioria das propriedades leiteiras no Brasil, com pouca tecnologia, controle sanitário dos animais e higienização deficientes, gera um leite de baixa qualidade. Um dos principais aspectos de qualidade afetados é o microbiológico, uma vez que o leite produzido em condições inadequadas de higiene e sanidade possui alta população bacteriana, comprometendo-o do ponto de vista tecnológico, durabilidade e de segurança alimentar. Leite com baixa qualidade microbiológica gera a fabricação de derivados e de leite beneficiado (pasteurizado ou UAT) com semelhante baixa qualidade, revelando a importância da produção de matéria-prima com qualidade (NERO, 2005). Segundo Catão e Ceballos (2001), no Brasil, de modo geral, o leite é obtido sob condições higiênico-sanitárias deficientes, e em consequência, apresenta elevado nº de microrganismos, o que constitui risco à saúde da população. Para produção de seus derivados, deve haver cuidados higiênicos da ordenha do leite até obtenção do produto final.

A contaminação do leite com *L. monocytogenes* pode ocorrer devido animais com matite e de fontes ambientais como silagem e solo durante a retirada do leite. A alimentação do animal deve ser controlada por causa da presença da bactéria em silagem fermentada impropriamente. Fontes adicionais de contaminação podem ocorrer do manuseio do leite no transporte e a na fábrica leiteira (SILVA et al., 2003).

O consumo de leite cru pode ameaçar a vida e causar várias doenças. A literatura é farta de informações sobre doenças causadas por microrganismos patogênicos como *Listeria monocytogenes*, associados ao leite cru e derivados (NERO et al., 2004).

Em um estudo com 1300 amostras de leite cru produzido no México, 162 (13%) foram positivas para *L. monocytogenes*. No Brasil, pesquisadores detectaram a presença de *L. monocytogenes* em 9,5% de amostras de leite cru

analisadas. E em um estudo na linha de processamento de queijo tipo Minas frescal, *L. monocytogenes* foi detectada em duas das amostras analisadas, sendo uma de leite cru (NERO, 2005).

A qualidade do leite cru está associada à carga microbiana presente e a microbiota inicial terá uma influência direta na qualidade do leite pasteurizado, assim como nos produtos lácteos (MUTUKUMIRA et al., 1996 apud LISITA, 2005). O leite destinado ao fabrico de queijos deve ser de boa qualidade e, quanto possível, livre de contaminação bacteriana ou por agentes químicos como antibióticos, herbicidas, pesticidas etc (PERRY, 2004 apud LISITA, 2005). No Brasil, leite não beneficiado é freqüentemente empregado na fabricação de diversos tipos de derivados, principalmente queijos, o que transforma esses produtos também em alimentos de alto risco (NERO, 2005).

1.5 Um dos derivados do leite – queijo

1.5.1 Histórico

Começou-se a fazer queijo no Brasil a partir de 1536, com a chegada do primeiro rebanho de bovinos ao país. No início do século XIX, na região do serro, em Minas Gerais, começou a produzir um queijo tipo caseiro. Era conhecido como Queijo-de-Minas, que deu origem aos seguintes queijos: Minas frescal, Minas Curado ou Minas Padrão ou Prensado, queijo do Serro, queijo de Coalho, queijo de Minas de Araxá, entre outros (LISITA, 2005).

Entretanto, a fabricação de queijos no Brasil, do ponto de vista industrial, é de história relativamente recente, sobretudo, a partir da década de 20, com o estabelecimento de imigrantes dinamarqueses no sul de Minas e holandeses na região de Santos Dumont e Barbacena, também em Minas Gerais (FURTADO, 1991 apud LISITA, 2005). Em um levantamento feito em 2000, o queijo Minas frescal figurou entre os três queijos mais produzidos pela indústria nacional de laticínio, perdendo apenas para os queijos mozzarella e prato (LISITA, 2005).

1.5.2 Produção no Brasil

A elaboração de queijos constitui uma das mais importantes atividades das indústrias de laticínios, sobretudo no Brasil, onde um dos tipos de maior consumo é o Minas frescal. Isto se deve, em parte, ao maior rendimento obtido na elaboração deste queijo, ao processamento simples e breve, o que possibilita um retorno rápido do investimento e, conseqüentemente, custos menores aos consumidores. A fabricação do queijo Minas frescal é de grande interesse para a indústria de laticínios de todo país, uma vez que é um produto de grande aceitação, caracteriza-se como queijo tipicamente brasileiro e pode ser encontrado em praticamente todo país (LISITA, 2005).

O parque industrial de laticínios controlado pelo Serviço de Inspeção Federal (S.I.F) indica que o universo industrial hoje consta com acima de 2200 estabelecimentos, com uma taxa de crescimento anual de 5,1% em volume de leite processado (GOMES, 2002 apud LISITA, 2005).

De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ), o Brasil produz 400 mil toneladas de queijo por ano, dentre as quais 240 mil produzidas sob inspeção federal, estadual ou municipal (LISITA, 2005).

1.5.3 Contaminação do queijo

Segundo Catão e Ceballos (2001), existem vários registros da presença de *L. monocytogenes* em leite e derivados. A freqüência dos casos de listeriose veiculados por queijos, evidencia a importância desse alimento e de outros derivados do leite na cadeia epidemiológica de transmissão de *Listeria* spp. E segundo Feitosa et al. (2003), também assume destacada relevância para a indústria, pelas perdas econômicas, como para saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos.

Os queijos são fabricados com leite pasteurizado ou não-pasteurizado. A sobrevivência e crescimento de *L. monocytogenes* em queijo depende de fatores intrínsecos (ex: pH, A_w) e extrínsecos (ex: temperatura durante amadurecimento, microflora competidora, pasteurização ou não) de cada variedade de queijo (FSAI, 2005).

Os queijos macios são susceptíveis de contaminação por *L. monocytogenes*, devido ao uso de leite cru ou por causa da contaminação pós-

pasteurização. O queijo serve como ambiente de crescimento onde a *L. monocytogenes* pode se multiplicar durante o período de estocagem, em temperaturas abaixo de 4°C. A *L. monocytogenes* é capaz de dobrar em número a cada 1.5 dias quando refrigerada a essa temperatura. Concentrações ótimas de *Listeria* como 10⁶ UFC/g têm sido notadas (IFT, 2004). Devido a habilidade da *L. monocytogenes* se multiplicar em temperatura de refrigeração e a tolerância de sal, esse patógeno pode sobreviver à produção do queijo (SWAMINATHAN, 2001).

Segundo a *Commission of the European Communities* (CEC) (2004), na Europa há produção e consumo de queijos fabricados com leite cru. E para garantir um produto seguro, deve haver aperfeiçoamento nos sistema de produção, coleta e estocagem de leite cru usado para produção de queijos. Além da investigação da segurança microbiológica desses queijos, promovendo alto nível de proteção de consumo e coleta informações da prevalência de microrganismos patogênicos nesses produtos.

De acordo com a Portaria nº 352, de 04/09/1997, do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, que considera a necessidade de padronizar os processos de elaboração dos Produtos de Origem Animal, o leite a ser utilizado para produção de queijo deve ser higienizado por meios mecânicos adequados e submetido à pasteurização, ou tratamento térmico equivalente combinado ou não com outros processos físicos e biológicos que garantam a inocuidade do produto. O queijo minas frescal, por sua vez, é definido como um queijo semi-gordo, de alta umidade, a ser consumido fresco, que deve ser armazenado a uma temperatura não superior a 8°C, de acordo com a classificação estabelecida no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (BRASIL, 1997a).

Segundo a Resolução – RDC nº 12, de 02/01/2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, considerando a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, visando a proteção à saúde da população, a qualidade microbiológica dos produtos alimentícios, incluindo a elucidação de Doença Transmitida por Alimentos, foi estabelecida ausência em 25 g de amostra, de *L. monocytogenes*, como padrão microbiológico sanitário para queijo de umidade muito alta, como o queijo minas frescal (BRASIL, 2001). O Conselho das Comunidades Europeias

(CCE) (1992) também estabelece ausência em 25 g de desse germe patogênico em queijo, exceto os de massa dura.

Um estudo constatou alta incidência (41,17%) de *L. monocytogenes* em queijo minas frescal artesanal (FEITOSA et al., 2003). E de acordo com IFT (2004), o queijo estilo mexicano causou 142 casos de doença em 1982 e 12 casos de 2000-2001. A mortalidade foi de 33,8% e 41,7% respectivamente. No trabalho de Silva et al. (2003), em 41% das amostras de queijo minas frescal analisadas foi detectada a presença dessa bactéria, sendo o sorotipo 4b o mais encontrado.

Alta incidência de *L. monocytogenes* foi detectada em queijos de massas mole e semi-mole, feitos com leite cru, no comércio da Suécia. O patógeno estava presente em níveis inferiores a 10^2 UFC/g, na maioria dos casos. Em outro estudo realizado na Europa foi observado que houve uma incidência desse microrganismo em queijos produzidos com leite pasteurizado (8%) era superior à encontrada em queijos produzidos com leite cru (4,8%). Em Portugal, *L. monocytogenes* foi isolada em 6/371 amostras de queijo fabricado com leite pasteurizado e 2/50 queijos frescos (NERO, 2005).

No estudo de Olivieri (2004) foi observada incidência de *Listeria* spp. em diferentes tipos de queijo, incluindo Minas frescal, ricota, gorgonzola, brie, cheddar, camembert e roquefort. Das 103 amostras de queijo analisadas, 11 (1,68%) estavam contaminadas por *Listeria monocytogenes*, 13 (12,62%) por *Listeria innocua*, 6 (5,83%) por *Listeria grayi* e 1 (0,97%) por *Listeria welshimeri*. Ainda de acordo com o autor, a maior incidência de *Listeria monocytogenes* foi observada em queijo Minas frescal caseiro, seguido por queijos maturados (gorgonzola, brie e roquefort) e Minas frescal e ricota industrialmente elaborados.

Apesar da importância da ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos lácticos, existem poucas pesquisas sobre sua incidência nesses alimentos no Brasil (FEITOSA et al., 2003). Por isso são interessantes novos estudos desse microrganismo patogênico em queijos (CATÃO e CEBALLOS, 2001).

1.6 Estratégias para minimização dos riscos

1.6.1 O papel do Governo e da indústria

Segundo o artigo nº 196 da Constituição Federal de 1988, *a saúde é direito de todos e dever do Estado, garantido mediante políticas sociais e econômicas que visem a redução do risco de doença e de outros agravos e ao acesso universal e igualitário às ações e serviços para sua promoção, proteção e recuperação*. E de acordo com o artigo nº 197 *são de relevância pública as ações e serviços de saúde, cabendo ao Poder Público dispor, nos termos da lei, sobre sua regulamentação, fiscalização e controle, devendo sua execução ser feita diretamente ou através de terceiros e, também, por pessoa física ou jurídica de direito privado* (BRASIL, 1988).

De acordo com o artigo 2º da Lei nº 8080, de 19 de setembro de 1990, *a saúde é um direito fundamental dos seres humanos, devendo o Estado prover as condições indispensáveis ao seu pleno exercício*. No artigo 6º diz que *estão incluídas no campo de atuação do Sistema Único de Saúde (SUS), a execução de ações de vigilância sanitária; controle e fiscalização de serviços, produtos e substâncias de interesse para a saúde; fiscalização e inspeção de alimentos, água e bebidas para consumo humano*. De acordo com o parágrafo 1º: *Entende-se por vigilância sanitária um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde* (BRASIL, 1990).

E ainda Lei nº 9782, de 26 de janeiro de 1999 do Senado Federal, conforme artigo 8º incumbi à Agência Nacional de Vigilância Sanitária regulamentar, controlar e fiscalizar os produtos e serviços que envolvam risco à saúde pública. E no parágrafo 1º são considerados os bens e produtos submetidos ao controle e fiscalização sanitária pela Agência os alimentos, inclusive bebidas, águas envasadas, seus insumos etc (BRASIL, 1999).

A Vigilância Sanitária é um dos braços executivos que estruturam e operacionalizam o SUS na busca da concretização do direito social à saúde, por meio de sua função principal de eliminar ou minimizar o risco sanitário envolvido na produção, circulação e no consumo de produtos, processos e serviços (LUCCHESI, 2001).

A fiscalização e controle de zoonoses bacterianas emergentes é essencial para prevenção de morte humana, de animais e para evitar

desordens econômicas criadas pela barreira do comércio ou da proibição da livre circulação de humanos ou animais (BLANCOU et al., 2005).

Tem se reconhecido que a contaminação de *L. monocytogenes* em alimentos é um risco e que devem ser desenvolvidas estratégias e procedimentos para minimizá-lo. As conseqüências econômicas podem ser minimizadas pela implementação de padrões e práticas apropriadas na indústria alimentícia (FSAI, 2005).

A contaminação microbiológica na indústria de alimentos representa um sério perigo para a saúde do consumidor. As indústrias de laticínios, pela própria matéria-prima que utilizam e pelo alto teor de umidade nos locais de produção, são particularmente susceptíveis a essa contaminação (LISITA, 2005).

Segundo Lisita (2005), tendo em vista a competitividade industrial associada à conscientização do consumidor, tem sido exigido das indústrias alimentícias um maior controle sobre seus alimentos processados, recomendando-se métodos de controle no processamento além do controle microbiológico do produto final.

A presença de patógenos que sobrevivem e proliferam em temperaturas abaixo da refrigeração e em atmosfera com oxigênio reduzido, indicam a seriedade dos perigos potenciais. A indústria alimentícia implementa uma variedade de medidas de controle efetivas para limitar esses perigos. Isso geralmente se inicia nas fazendas com a implementação de Boas Práticas de Agricultura (IFT, 2004). E também com o uso de Boas Práticas de Higiene e Manipulação durante o processamento, treinamento de higiene e segurança dos alimentos e implementação da Análise dos Pontos Críticos de Controle (APPCC) (FSAI, 2005). Esse controle pode prevenir os perigos presentes em alimentos, aqueles que se formam nos alimentos e aqueles que podem ser introduzidos nos alimentos (BERVELY e BEATTIE, 2004).

Então, visando a proteção da saúde da população, o Ministério da Saúde aprovou a Portaria Nº 1428, de 26/11/1993, que dispõe o Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos, Diretrizes para o Estabelecimento de Boas Práticas de Produção e de Prestação de Serviços na Área de Alimentos, e o Regulamento Técnico para o Estabelecimento de Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) para Serviços e Produtos na Área de

Alimentos. Os objetivos gerais são respectivamente: estabelecer orientações para execução de atividades de inspeção, de forma a avaliar as Boas Práticas para obtenção de PIQ de produtos e serviços na área de alimentos, realizar os controles do processo produtivo através do APPCC de forma a proteger a saúde do consumidor; estabelecer orientações necessárias para elaboração de Boas Práticas de Produção; e definir a forma de avaliar o PIQ do produto com vistas à proteção dos consumidores (BRASIL, 1993).

Considera a necessidade do constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos visando a proteção da saúde da população, foi criada a Portaria Nº 326, de 30/07/1997, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, que dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos (BRASIL, 1997b).

E visto a necessidade de harmonização da ação da inspeção sanitária em estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos em todo território nacional e a necessidade de complementar o Regulamento acima citado, foi aprovada a Resolução-RDC Nº 275, de 21/10/2002 do Ministério da Saúde, que dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos (BRASIL, 2003).

O desafio para as indústrias de alimentos é desenvolver, implementar, manter e quando necessário, aumentar programas para monitorar e controlar *L. monocytogenes*. Consumidores domésticos também possuem a responsabilidade em insistir em altos padrões de controle de alimentos que são comprados por eles, e consumir alimentos obtidos de forma higiênica e de acordo com instruções de fabricação (FSAI, 2005). O FDA e o CDC afirmam que os consumidores podem reduzir o risco de doença: estocando alimentos prontos para o consumo até 4°C, usando termômetro no refrigerador para checar a temperatura; consumir alimentos perecíveis e prontos para o consumo tão logo possível; e limpar o refrigerador regularmente (DONNELLY, 2001 apud RAMASWAMY et al., 2007).

Segundo FSAI (2005), compete à saúde pública assegurar que existam profissionais suficientes e capacitados para tratar a doença, além de um público consciente de que a listeriose é uma doença de risco.

Segundo a Portaria Nº 1428, de 26/11/1993, a Lei Nº 8080, de 19/09/1990 que institui o Sistema Único de Saúde, estabelece a necessidade de melhora da qualidade de vida decorrente da utilização de bens, serviços e ambientes oferecidos à população na área de alimentos, através de novos ordenamentos que regulam, no âmbito da saúde, as relações entre agentes econômicos, a qualidade daqueles recursos e o seu consumo ou utilização. A prática de fiscalização sanitária de alimentos, base das ações de vigilância sanitária de alimentos, inserida nas ações de saúde, deve: integrar as ações de vigilância sanitária e as avaliações de risco epidemiológico dentro das prioridades locais, seguindo as determinações do Sistema Único de Saúde; utilizar a inspeção como instrumento da fiscalização sanitária, abrangendo o conjunto das etapas que compõem a cadeia alimentar, incluindo as interrelações com o meio ambiente, o homem e seu contexto sócio-econômico; objetivar a proteção e a defesa da saúde do consumidor, em caráter preventivo, através da prática da inspeção sanitária, como forma de assegurar as diretrizes estabelecidas nessa Portaria (BRASIL, 1993).

O Código de Proteção e Defesa do Consumidor que foi implementado por meio da Lei Federal nº 8078, de 11 de setembro de 1990 reafirma sua aplicabilidade a toda ordem pública e declara que seu intuito é proteger e defender o consumidor (DALLARI, 2001). A Lei Orgânica da Saúde e o Código de Defesa do Consumidor ratificam o dever do Estado quanto à proteção da saúde individual e coletiva, inserem a vigilância sanitária na doutrina da proteção do consumidor contra riscos à saúde no consumo de bens e serviços (COSTA, 2003).

As ações de controle sanitário se originam no conjunto de medidas que as sociedades, ao longo dos tempos, estabelecem visando impedir ou diminuir riscos e danos à saúde da coletividade. A Vigilância Sanitária é uma ação de controle específica para Saúde Pública para impor interesses sanitários, isto é, a defesa e proteção da saúde e da vida (COSTA, 2004).

Na área da Vigilância Sanitária, os produtores/prestadores, responsáveis técnicos, fornecedores, comerciantes são responsáveis pela qualidade de

produtos e serviços ofertados à população e, conseqüentemente pelos eventuais danos à saúde deles decorrentes, mas também o Estado é responsável por ter a obrigação de cumprir e fazer cumprir normas específicas de proteção à saúde (COSTA, 2004).

Existem esforços para o controle da *Listeria* em alimentos e no processamento de alimentos, que incluem o monitoramento e a divulgação das doenças derivadas de alimentos pelas agências governamentais, testes de rotina de amostras de alimentos, estabelecimento do APPCC, inspeção das facilidades no processamento de alimentos, treinamento dos manipuladores de alimentos e conscientização dos consumidores sobre a segurança dos alimentos. Deve-se lembrar que as técnicas de preservação utilizadas para controle de *Listeria* deve levar em consideração a qualidade sensorial e nutricional dos alimentos (GANDHI e CHIKINDAS, 2006).

1.6.2 Avaliação de risco

A presença de microrganismos patogênicos nos alimentos é resultante de uma complexa interação de fatores que envolvem o patógeno em si e o alimento que irá veiculá-lo, que podem atuar para amplificar ou atenuar a contaminação e os níveis de multiplicação destes microrganismos. Entre estes fatores, pode-se citar o processamento, a distribuição, o consumo e a imunidade da população. Portanto, para garantir segurança microbiológica aos alimentos deve-se atuar em todas as fases, minimizando os níveis iniciais de contaminação, prevenindo ou limitando o potencial de multiplicação e eliminando os microrganismos indesejáveis (NERO, 2005).

O órgão americano *Food and Drug Administration's Center for Food Safety and Applied Nutrition* (FDA/CFSAN), em colaboração com *United States Department of Agriculture's Food Safety and Inspection Service* (FSIS) e *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), em 2003, propuseram a avaliação da estimativa de risco relativo de doença ou morte associada ao consumo de diferentes tipos de alimentos prontos que foram contaminados por *Listeria monocytogenes* (WHO/FAO, 2004a).

Esse novo conceito de avaliação de risco microbiológico (*Microbiological Risk Assessment - MRA*), surgiu quando a Organização Mundial de Comércio

(OMC) estabeleceu o Acordo Sanitário e Fitosanitário, conhecido internacionalmente como *WTO/SPS agreement* (World Trade Organization/Sanitary and Phytosanitary Agreement). Esse acordo especifica que a decisão sobre a segurança de um alimento para consumo humano e sobre sua adequação para o comércio internacional deve estar baseada em dados científicos e em uma avaliação de risco. A OMC baseia-se no *Codex Alimentarius* para definir o que é segurança de um alimento e para especificar como a avaliação de risco deve ser realizada, uma vez que o *Codex Alimentarius* é o organismo internacional para a regulamentação e definição das exigências de qualidade e segurança (inocuidade) de alimentos (NERO, 2005).

A avaliação de risco provém uma estrutura organizada de informações para melhor entender a interação entre os microrganismos, alimentos e doenças humanas. Provém habilidade de estimar o risco à saúde humana decorrente de microrganismos em alimentos e é usado no gerenciamento de risco relacionado a patógenos de alimentos e na elaboração de padrões para alimentos no comércio internacional (WHO/FAO, 2004a). Segundo o *Codex Alimentarius*, a avaliação de risco (*risk assessment*) é apenas um dos componentes da chamada Análise de Risco (*risk analysis*), que é formada por mais dois componentes, a saber: gestão de risco (*risk management*) e comunicação de risco (*risk communication*) (NERO, 2005).

Segundo *World Health Organization / Food and Agriculture Organization* (WHO/FAO, 2004a), para avaliação de risco da *L. monocytogenes*, algumas questões devem ser relacionadas como: estimativa de risco de doença séria desse patógeno em alimento, quando se classifica ausência em 25 g de alimento; estimativa de risco de doença séria para consumidores de diferentes grupos de populações suscetíveis relativos a uma população geral; e estimativa de risco de doença séria desse microrganismo em alimentos que suportem ou não seu crescimento em armazenamento específico e em condições de vida de prateleira. É preciso responder essas questões para avaliar como interagem os fatores relacionados à doença oriunda de alimentos, para desenvolver estratégias para reduzir as taxas de doença.

O conhecimento do comportamento e fisiologia dos microrganismos é importante no controle da multiplicação bacteriana em alimentos. Para que

esse controle ocorra de forma ideal, é necessária uma sistemática compilação de dados relativos ao comportamento dos microrganismos nos alimentos (NERO, 2005).

No estudo de Gray et al. (2004), foram obtidos resultados que suportam a existência de diferenças entre a virulência e transmissibilidade entre os subtipos de *L. monocytogenes*. Entendendo a variabilidade das cepas encontradas em humanos, alimentos, animais, ambiente, e as características da virulência expressadas por diferentes cepas, contribui-se para a melhora da avaliação do risco à saúde pública devido à *L. monocytogenes*.

Alimentos sempre representarão algum risco biológico, porém a indústria de alimentos possui como meta manter esse nível de risco em taxas mínimas garantindo a saúde do consumidor (NERO, 2005).

1.7 Detecção molecular da *Listeria monocytogenes*

Para a indústria alimentícia, onde a presença de *L. monocytogenes* é uma grande preocupação, a indicação das cepas contaminantes da cadeia alimentar e do ambiente é de primordial importância (DOUMITH, 2004).

Desde que *L. monocytogenes* foi reconhecida como um patógeno derivado do alimento, tem ocorrido avanços rápidos no desenvolvimento de métodos adequados para isolamento e identificação. As indústrias alimentícias têm procurado por métodos mais rápidos e sensíveis pois há urgência em fornecer alimentos livres de contaminantes (GASANOV, HUGHES e HANSBRO, 2005).

A inclusão da *L. monocytogenes* na lista dos organismos sujeitos ao APPCC tem sido recentemente dirigido na procura de detecção de métodos sensíveis para monitoramento na linha de produção. Alguns fatores devem ser controlados e testados: qualidade microbiológica do leite cru, pasteurização do leite cru antes da produção do queijo, prevenção da recontaminação depois da pasteurização do leite, e predominância da flora microbiana desejável durante a estocagem (SILVA et al. 2003).

A quantificação rápida de *L. monocytogenes* é importante no programa de APPCC para verificar os limites críticos, monitorar níveis de contaminação e para avaliação quantitativa de risco. *L. monocytogenes*, assim como vários

patógenos derivados de alimentos, podem atacar as superfícies de contato com os produtos, levando à formação dos biofilmes. A bactéria aderente pode adquirir novas propriedades fisiológicas, conferindo resistência a desinfetantes ou sanitizantes, ocasionando problemas de higiene, particularmente por patógenos que podem participar na recontaminação de produtos (GUILBAUD et al., 2005).

A obtenção de resultados em um período curto de tempo possibilita eventuais correções durante o processamento do alimento, a retirada de um lote do comércio e, para produtos frescos, a comercialização mais rápida (FRÖDER, 2005).

Devido à importância da epidemiologia de *L. monocytogenes* para saúde humana, novas tecnologias de subtipagem são constantemente desenvolvidas na esperança de aumentar a resolução, velocidade e reprodutibilidade da subtipagem de *L. monocytogenes* (BORUCKI et al., 2005).

O desenvolvimento de vários métodos de genética molecular inovadores tem proporcionado novas revelações na caracterização e discriminação de microrganismos, inclusive aqueles patógenos derivados de alimentos (LUKINMAA et al., 2004). A enumeração rápida de *L. monocytogenes* pode ser útil na identificação de fontes de contaminação alimentícia (GUILBAUD et al., 2005).

Devido à tolerância zero para *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo em alguns países e à freqüente presença de baixas populações de *L. monocytogenes* nos alimentos em geral, o método de escolha deve ser muito sensível, capaz de detectar 1 célula / g do produto e apresentar alta especificidade, prevenindo a ocorrência de resultados falso positivos (FRÖDER, 2005).

A fiscalização das zoonoses bacterianas tem facilitado e estimulado o desenvolvimento de vários testes biológicos e benéficos da revolução da biologia molecular, como a amplificação do gene, usando a Reação em Cadeia da Polimerase, que é permitida por autoridades da saúde (BLANCOU et al., 2005). Ela teve um imenso impacto na sua aplicação molecular desde a sua introdução (GASANOV, HUGHES e HANSBRO, 2005). Essa técnica tem sido usada para detectar *L. monocytogenes* em leite cru, derivados do leite como o queijo, carne e repolho (GUILBAUD et al., 2005; ZHOU e JIAO, 2005),

Os primeiros estudos de isolamento e detecção de *L. monocytogenes* em alimento que foi explorado pelo método molecular foram do ano de 1990. A partir destes protocolos tem sido continuamente propostos e somente nos últimos anos um grande número de artigos tem sido publicados. A Multiplex-PCR é um dos métodos propostos para identificar espécies de *Listeria* (COCOLIN et al., 2002).

Essa técnica apresenta algumas vantagens em relação a métodos de análise convencionais, como maior rapidez, seletividade e especificidade, além de bom limite de detecção e poder de discriminação (GANDRA, 2006).

A PCR na língua inglesa é chamada de *Polymerase Chain Reaction*, que permite que o DNA de uma região selecionada do genoma seja amplificado um bilhão de vezes (ALBERTS et al., 1997a). É uma técnica de “amplificação de um alvo”. Isso significa que uma seqüência-alvo de DNA é identificada e amplificada até um ponto em que pode ser detectada (KONEMAN et al., 2001).

Os componentes essenciais para a PCR são o DNA molde (que será amplificado), os *primers* ou iniciadores (complementares a extremidade 5' das bandas do DNA alvo), dNTPs (requeridos para síntese da nova fita de DNA), DNA polimerase (enzima responsável pelo anelamento das dNTPs), MgCl₂ (cuja concentração afeta o anelamento dos *primers*, temperatura de fusão do DNA e atividade da enzima), tampão de reação (Tris-HCl) e água. O volume de reação pode variar de 25 – 100 µL (FREITAS, 2005).

A amplificação específica de um DNA-alvo é obtida por ciclos sucessivos de três passos: desnaturação (da amostra de DNA para obter uma fita única), anelamento (*primers* pequenos e específicos se unem ao DNA alvo) e polimerização (uma DNA polimerase é utilizada para iniciar a seqüência de DNA a partir dos *primers*). Os números de amplicons são dobrados a cada ciclo (OLSEN, 2000).

Então, na PCR, primeiro a parte conhecida da seqüência é utilizada para projetar dois oligonucleotídeos de DNA sintéticos, cada um complementar a uma das fitas da dupla-hélice de DNA e posicionado em lados opostos da região a ser amplificada (*primers*). Esses oligonucleotídeos servem como iniciadores para a síntese de DNA *in vitro*, que é catalisada por uma DNA-polimerase, e determinam as extremidades do fragmento de DNA que é finalmente obtido (ALBERTS et al., 1997a).

Cada ciclo de reação da técnica de PCR requer um breve aquecimento para separação das suas fitas da dupla hélice de DNA genômico. Um subsequente resfriamento do DNA na presença de um grande excesso dos dois iniciadores permite a hibridização dos oligonucleotídeos com as seqüências genômicas complementares. A mistura anelada é então incubada com a DNA-polimerase e os quatro desoxirribonucleosídeos trifosfato. Quando o procedimento é repetido, os novos fragmentos sintetizados, por sua vez, servem como moldes e, depois de poucos ciclos, o produto predominante é um fragmento de DNA de uma única espécie, cuja extensão corresponde à distância entre os dois iniciadores originais. Na prática, de 20 a 30 ciclos de reação são necessários para efetiva amplificação do DNA. Cada ciclo dobra a quantidade de DNA sintetizada no ciclo anterior (ALBERTS et al., 1997a).

Os fragmentos amplificados são detectados usualmente usando eletroforese gel em agarose (GASANOV, HUGHES e HANSBRO, 2005). A separação em gel pode ser visualizada em um transluminador de radiação ultravioleta de onda curta, comparando-se as bandas separadas com aquelas de um padrão analisado em paralelo (KONEMAN et al., 2001).

A região amplificada deve ser escolhida com cuidado e deve ser associada somente com o patógeno investigado. Devido à sensibilidade do método, os genes alvo podem ser detectados se a concentração na amostra for baixa (LUKINMAA et al., 2004).

Por causa da especificidade dos *primers* desenvolvidos, o protocolo tem sido aplicado para detecção direta de *Listeria* spp. em amostras de alimentos, após o enriquecimento “overnight” para aumentar o número de células-alvo e evitar a amplificação de células mortas (COCOLIN et al., 2002).

1.7.1 Multiplex-PCR

Análises rápidas e sensíveis com alta especificidade são necessárias para detecção de bactéria patogênica em alimentos. Métodos baseados em PCR são utilizados com essa finalidade (KAWASAKI et al., 2005). A validação internacional é pré-requisito para adoção de uma metodologia padrão, sendo utilizado um teste adequado para análise de um grande número de isolados e

válido na investigação epidemiológica, com o qual pode-se associar cepas com alimento durante surtos de listeriose (DOUMITH et al., 2005).

A técnica Multiplex-PCR pode ser usada para confirmação rápida das espécies de *Listeria* e para identificação das espécies de *Listeria* por cepas isoladas de diferentes fontes (BUBERT et al., 1999). Pode ser utilizada para identificar simultaneamente *L. monocytogenes* e espécies do gênero *Listeria* (WESLEY et al., 2002).

Nessa técnica, múltiplos pares de primers para diferentes moléculas-alvo são incluídos na mesma mistura de amplificação. Esta preparação pode ser utilizada para amplificar, de modo simultâneo, sequências-alvo de diferentes microrganismos patogênicos em um único frasco de reação. Em algumas aplicações dessa técnica, um grupo de primers é utilizado para amplificar uma sequência de “controle” interno, enquanto outro grupo é usado para iniciar a amplificação da sequência de DNA de interesse. Assim, pode-se confirmar que a amplificação do alvo desejado ocorreu (KONEMAN et al., 2001).

Para *L. monocytogenes* foi desenvolvida uma Multiplex-PCR baseada em quatro genes marcadores, sendo que este método pode ser usado para classificar os quatro maiores sorotipos dessa espécie: 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b em quatro tipos distintos de PCR. Essa técnica é fácil de ser usada em diferentes laboratórios, é rápida, reproduzível, mais barata, onde somente reagentes bioquímicos são requeridos (DOUMITH et al., 2005).

Na Multiplex-PCR os genes marcadores são identificados dentro da sequência do sorotipo em estudo - *L. monocytogenes*. O gene utilizado para controle de amplificação interna é específico para cepas do gênero *Listeria*. Cada PCR produzido amplifica fragmentos de tamanhos distintos (DOUMITH et al., 2004).

Essa técnica tem sido utilizada para detecção simultânea de patógenos devido à despesa do reagente e menor tempo de preparação (KAWASAKI et al., 2005). E a principal vantagem da aplicação de métodos baseados na amplificação de DNA é a estabilidade destas sequências que não são afetadas por condições ambientais ou de cultivo (FRÖDER, 2005).

2 OBJETIVOS

- Isolamento de *L. monocytogenes* de queijo minas frescal;
- Avaliação dos meios de cultura Oxford, Palcam e Cromogênico para o isolamento de *L. monocytogenes*;
- Utilização da técnica Multiplex-PCR (descrita por Doumith et al. 2004) para a identificação de *L. monocytogenes*;
- Comparação das metodologias de caracterização fenotípica e molecular para identificação de *L. monocytogenes*.

3 METODOLOGIA

3.1 Amostragem

Nesse estudo se verificou a presença de *L. monocytogenes* em queijo minas frescal (30 amostras). Foram coletadas 5 amostras aleatoriamente de 6 marcas distintas, cujos fabricantes possuíam registro no Ministério da Agricultura/SIF/DIPOA. Cada marca teve um lote coletado, considerando uma amostra representativa e o plano de duas classes (onde a unidade amostral é classificada em aceitável ou inaceitável) de acordo com a Resolução – RDC nº 12, de 02/01/2001 (BRASIL, 2001). As amostras foram coletadas em suas embalagens originais não violadas, observando-se a quantidade mínima de 200 g por unidade amostral, e foram colocadas imediatamente no isopor com gelo, para que fossem conservadas suas características no ato da compra. Foi registrada a temperatura indicada no refrigerador do local da coleta.

3.2. Técnica microbiológica baseada na ISO 11290-1

Foi utilizada a técnica de enriquecimento e reconhecimento fenotípico através de identificação bioquímica, conforme descrito no Esquema 1. Ambos foram de acordo com a norma ISO 11.290 Part 1 (*International Organization for Standardisation*, Geneva) adaptado, de SCOTTER et al., 2001:

1- Pré-tratamento da amostra para enriquecimento primário posterior. Cada queijo foi pesado separadamente em balança Mettler Mod. PB3001 (e=0,1g, d=10mg, mín=0,5g, máx=3100g), utilizando placas de Petri estéreis, até alcançar 25 g de amostra;

2- Enriquecimento primário num meio líquido seletivo de enriquecimento (225 mL de *Half Fraser broth* – Anexo, item 8.1) com concentração reduzida de agentes seletivos: 0,45 mL de ácido nalidíxico, 0,56 mL de acriflavina e 0,23 mL de citrato férrico amoniacal (Anexo, itens 8.2, 8.3, 8.4);

3- Cada amostra foi vertida para saco plástico Seward próprio e levado ao homogeneizador (Stomacher Mod.400 Tipo BA7021 Seward) com uma alíquota de Half Fraser, por 1m30s. Depois o conteúdo foi adicionado ao restante de Half Fraser contido no erlenmeyer. Os erlenmeyers foram homogeneizados e incubados em estufa (Câmara incubadora B.O.D Mod.347 CD Fanem SP/Brasil) a 30°C por 24h;

4- Enriquecimento secundário da cultura obtida no item 3, num meio líquido seletivo de enriquecimento (10 mL *Fraser broth*) com concentração total dos agentes seletivos: 0,04 mL de ácido nalidíxico, 0,05 mL de acriflavina e 0,02 mL de citrato férrico amoniacal (Anexo, itens 8.2, 8.3, 8.4). Os tubos foram homogeneizados e incubados em estufa (Estufa bacteriológica Lufenco/Fab: Lutz Ferrando) a 35°C por 48h;

5- As culturas obtidas no item 4 foram plaqueadas, utilizando a técnica de esgotamento, em meio OXFORD (OXOID – Anexo, item 8.5), incubadas a 30°C, e em meio PALCAM (OXOID – Anexo, item 8.6), incubadas a 37°C em microaerofilia. A análise das placas pôde ser feita após 48h de incubação, onde foi checada a presença de colônias características de *Listeria* spp.: colônias isoladas, esverdeadas, com centro rebaixado e halo negro. O meio CROMOGÊNICO (OXOID – Anexo, item 8.7) também foi utilizado nessa etapa de cultura, e incubado a 37°C. Após 48h de incubação, foi checada a presença de colônias azuis-esverdeadas, com halo opaco, características de *L. monocytogenes* e/ou *L. ivanovii*.

6- Foram coletadas 5 colônias características das placas dos meios OXFORD, PALCAM e CROMOGÊNICO, de acordo com metodologia de Scotter et al. (2001). Cada colônia foi colocada em tubos de caldo TSB com 0,6% de extrato de levedura (Anexo, item 8.11), assim como também foi feito no trabalho de Fraser e Sperber (1988). Os tubos foram incubados em estufa a 35°C por 24h. Foram coletadas colônias do meio cromogênico, mesmo sem o aparecimento de halo opaco, para teste do meio, pois este estava sendo utilizado pela primeira vez no laboratório.

7- A confirmação da presença de *L. monocytogenes* foi feita através de testes bioquímicos, fisiológicos e morfológicos. Estes foram realizados segundo *Bacterial Analytical Manual – BAM* do FDA/CFSAN (2003) e com a ISO11290-1 (SCOTTER et al., 2001), como segue abaixo:

- Hemólise : Meio ágar sangue (Base de ágar sangue - Anexo, item 8.8; e Sangue de ovino desfibrinado cedido pela Fundação Oswaldo Cruz - Anexo, item 8.9). As placas de ágar sangue foram semeadas com crescimento das colônias isoladas em caldo TSB com 0,6% com extrato de levedura a 35°C/24h. Os resultados foram obtidos após incubação das placas a 35°C/48h. A cepa de referência utilizada ATCC 7644 apresenta um halo hemolítico pequeno, enquanto a outra cepa ATCC 19117 apresenta um halo hemolítico um pouco maior. A cepa de *L. ivanovii*, utilizada também como referência, apresenta um grande halo de hemólise.
- Utilização de carboidratos: Glicose, Maltose, Xilose, Ramnose, Manitol. Uma alçada do crescimento das colônias isoladas em caldo TSB com 0,6% com extrato de levedura a 35°C/24h são inoculados em tubos de ensaios contendo os carboidratos, estes foram incubados a 35°C/7 dias. Os meios de Glicose e Maltose são indicativos do gênero *Listeria* sp. apresentando alteração da coloração do meio de roxo para amarelo quando há presença da mesma. Os demais meios são indicativos de *L. monocytogenes*, havendo alteração de coloração do meio de roxo para amarelo somente para Ramnose, quando houver presença desta espécie.
- Catalase: Uma grande quantidade de crescimento das colônias isoladas em TSA com 0,6% com extrato de levedura a 35°C/24h foi colocada em lâminas e adicionado peróxido de hidrogênio a 3% (Anexo, item 8.12). Na presença de *Listeria* sp. há formação de bolhas de gás.
- Motilidade: Uma pequena quantidade do crescimento das colônias isoladas em caldo TSB com 0,6% com extrato de levedura a 35°C/24h, são inoculados em tubos com meio SIM a 30°C/5 dias. Na presença de *Listeria* sp. há formação de “guarda-chuva” próximo à superfície do meio.
- Coloração de Gram: Foi feito um esfregaço de uma pequena quantidade de crescimento das colônias isoladas em TSA com 0,6% com extrato de levedura a 35°C/24h lâminas, e realizada a técnica de coloração de Gram

utilizando cristal violeta, lugol, álcool, fucsina e água. *Listeria* sp. é Gram positiva.

3.3 Técnica microbiológica baseada em Kaclíková et al. (2003)

Também houve o isolamento diretamente da matriz, descrito no Esquema 1, de acordo com o trabalho de Kaclíková et al. (2003):

1- 25 g de amostra foi homogeneizada em 225 mL de *half Fraser broth* e incubada por 24 h a 30°C;

2- 0.1 mL da amostra do enriquecimento primário foi usada para inocular 10 mL de *Fraser broth* (enriquecimento secundário) e incubada por 24h a 37°C;

3- 0.1 mL da amostra do enriquecimento secundário foi inoculada em 10 mL de caldo BHI (Anexo, item 8.10) e incubada em estufa por 5h a 35°C;

4- 1,5 mL foi retirado do tubo de BHI, e colocada em microtubo (triplicata) para posterior extração de DNA e Multiplex-PCR.

OBS: Foram retirados e guardados em microtubos: 1,5mL do Half Fraser (duplicata), 1,5 mL do Fraser (duplicata) após 48h de incubação e 1,5 mL do BHI (triplicata) após 5h de incubação, para realizar a extração de DNA posteriormente. Os microtubos foram guardados em freezer a -20°C.

OBS2: Foram feitos criotubos dos isolados de *Listeria* sp. e *L. monocytogenes*, em solução de glicerol a 20% (0,5 mL de BHI + 0,1 mL de glicerol) de acordo com o POP nº 65.3210.048. Os criotubos foram congelados em freezer a -20°C.

3.4 Controle positivo

Foram utilizadas cepas de referência de *L. monocytogenes* de cultura *overnight* para os controles positivos. No controle positivo (1) foi adicionado 25 g de amostra a 223 mL de *Half Fraser broth* mais 1mL de cada cepa de referência: ATCC 7644 (INCQS Nº 00266) e ATCC 19117 (INCQS Nº 00327). No controle positivo (2) foi adicionado somente as cepas de referência a 223 mL de *Half Fraser broth*. Ambos controles foram realizados para cada grupo

de 5 amostras, e foi seguida a técnica da ISO11290-1 segundo Scotter et al. (2001), a técnica de Kaclíková et al. (2003), para cada controle positivo.

3.5 Extração de DNA

A extração de DNA do BHI foi feita conforme o artigo de Kaclíková et al. (2003). Foi realizada a extração de uma das alíquotas de 1,5mL guardada em microtubo, da cada uma das 5 amostras e 2 controles:

- 1) 1,5mL da amostra pós-enriquecida (em caldo BHI) foi centrifugada por 12000 rpm/12min em centrífuga (*Centrifuge 5415 D Eppendorf* - até 13,2 rpm/ até 30min);
- 2) O sobrenadante foi descartado;
- 3) O precipitado foi lavado com 300 microlitros de solução de NaCl 0,85% (preparada no laboratório. Anexo, item 8.14). O conteúdo foi homogenizado em vortex (*Vortex genie 2 Daigger Cat.nº2220A* - até vel.8), centrifugado em 12000 rpm/12min. O sobrenadante foi desprezado;
- 4) A etapa 3 foi repetida;
- 5) O precipitado foi ressuscitado em 200 microlitros de solução-tampão 20 mM Tris-HCl pH 8.0 e 50 mM KCl (preparada no próprio laboratório. Anexo, item 8.15). Foi homogeneizado no vortex;
- 6) Os microtubos foram incubados em banho-seco (*Dri-Bath Type 17600 Barnstead/Thermolyne* cap:20 epp 1,5mL) a 100°C/25 min;
- 7) Os microtubos foram centrifugados a 12000 rpm/3 min;
- 8) O sobrenadante foi guardado em freezer a -20°C para posterior realização da Multiplex-PCR.

Também foi realizada extração de DNA com Kit (QIAGEN), segundo instruções do próprio fabricante, porém com algumas adaptações:

1 – 1000 µL do crescimento bacteriano (18 – 24 h / 35°C ± 2°C) foram transferidos para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. E centrifugados a 14 000 rpm / 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado.

2 – O sedimento foi ressuscitado em 180 µL do tampão de lise - *buffer* ATL (KIT). E adicionado 50 µL de lisozima (100 mg / mL).

3 – A incubação foi realizada por 30 minutos / 37°C.

4 – 25 µL de proteinase K (KIT) foram adicionados e homogeneizados em vortex. Foram adicionados 200 µL de tampão AL (KIT) e homogeneizados no vortex.

5 – A incubação foi feita a 70°C por 30 minutos no banho-seco.

6 – 2 µL de Rnase (10 mg / mL) foram adicionados. E foi incubado a 37°C por 30 minutos.

7 – Foi centrifugado por poucos segundos ($\pm 3''$).

8 – 200 µL de etanol (96 – 100 %) foram adicionados e misturados no vortex (pulsando por 15 segundos). Após misturado, foi centrifugado ligeiramente para remover as gotas que ficaram no lado interno da tampa.

OBS₁: A adição do etanol forma um precipitado branco e é essencial ter sido aplicado todo o precipitado na coluna QIAmp.

9 – Foi aplicado cuidadosamente, com auxílio de uma micropipeta, a mistura da etapa 8 (incluindo o precipitado) à coluna QIAmp acoplada ao tubo coletor de 2 mL (KIT) sem molhar as bordas. Foi tampado e centrifugado a 10.000 rpm / 1 minuto. A coluna QIAmp foi colocada em um tubo coletor limpo (KIT) e descartado o tubo contendo o filtrado.

OBS₂: Se a solução não tiver passado completamente através da membrana, deve-se centrifugar novamente a uma velocidade maior até que a solução tenha passado.

10 – Cuidadosamente, a tampa da coluna foi aberta e adicionado 500 µL de tampão AW1 (KIT) sem molhar as bordas. Foi tampado e centrifugado a 10.000 rpm / 1 minuto. A coluna QIAmp foi colocada em um novo tubo coletor (KIT) e descartado o tubo coletor contendo o filtrado.

11 – Cuidadosamente, a coluna QIAmp foi aberta e adicionado 500 µL de tampão AW2 (KIT) sem molhar as bordas. Foi tampado e centrifugado a 14.000 rpm / 3 minutos.

12 – A coluna QIAmp foi colocada em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL de capacidade (não fornecido no KIT) e descartado o tubo coletor contendo o filtrado. Cuidadosamente, a tampa da coluna QIAmp foi aberta e adicionado 200 µL de tampão AE (KIT). Foi incubado em temperatura ambiente por 5 minutos, e então centrifugado a 10.000 rpm / 1 minuto.

13 – A tampa da coluna QIAmp foi novamente aberta com cuidado e adicionado 200µL de tampão AE (KIT). Foi incubado em temperatura ambiente por 5 minutos, e então centrifugado a 10.000 rpm / 1 minuto.

14 – O DNA extraído foi armazenado a – 20°C.

3.6 Multiplex-PCR

A diferenciação dos sorovares de *Listeria monocytogenes* por Multiplex-PCR foi de acordo com Doumith et al. (2004). Foram utilizadas cepas de referência ATCC 7644 (INCQS N° 00266) e ATCC 19117 (INCQS N° 00327), presentes na coleção do INCQS, para controle positivo de reação.

A reação final de amplificação, que foi feita em cabine (*P.C.R Chambers by Plas Labs with fluor light and U.V. light. Intermatic*), foi de 100 µL contendo:

- 2 U de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen);
- 0,2 mM de trifosfatos deoxinucleosídeos (Invitrogen);
- 50 mM de Tris-HCl – 10 mM KCl – 50 mM (NH₄)₂SO₄ – 2 mM MgCl₂, pH 8.3 (Invitrogen).

Os cinco primers (Invitrogen, Brasil), mostrados na tabela 3, tiveram a concentração final de:

- 1µM para *Imo0737*, ORF2819 e ORF2110;
- 1.5 µM para *Imo1118*;
- 0.2 µM para *prs*.

De acordo com o autor, os genes marcadores são utilizados nessa Multiplex-PCR para separar quatro maiores sorotipos de *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b) em quatro grupos distintos.

A PCR ocorreu em termociclador (*Peltier Thermal Cycler, MJ Research PTC-200*) como segue abaixo:

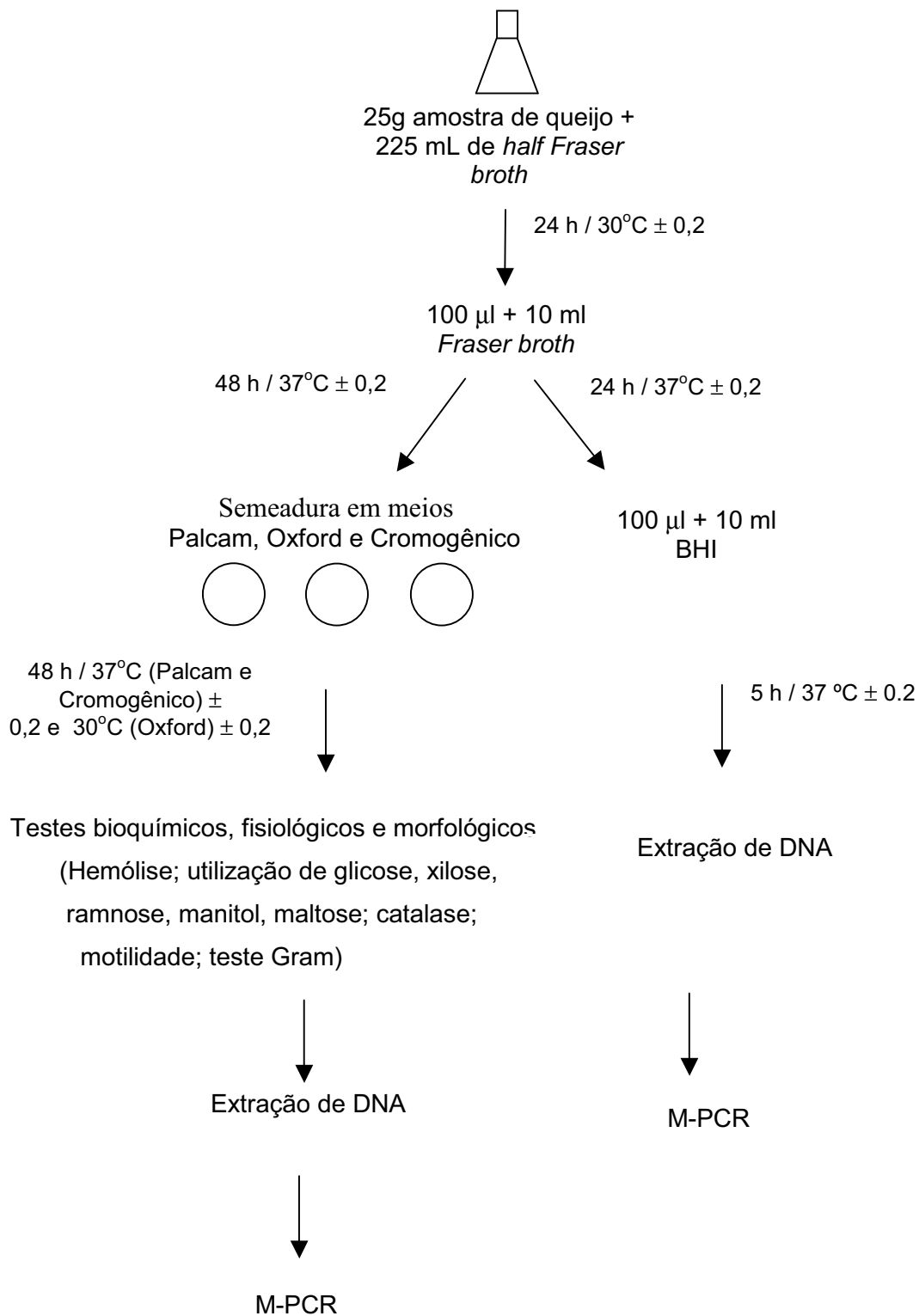
- Desnaturação inicial: 94°C por 3 min;
- 35 ciclos de: 94°C por 0.40 min, 53°C por 1.15 min, 72°C por 1.15 min;
- Polimerização final: 72°C por 7 min.

Cinco microlitros da mistura de reação foram homogeneizados com 3 µL de tampão e separado em gel de agarose 2% em tampão TBE 1X (90 mM de base Trizma, 90 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA, pH 8.3), a 90V por 1:30h. Para a pesagem dos reagentes foi utilizada balança semi-analítica (*Balança Acculab VI-350 Capacity:350g, Readability: 0,01g*). Para obtenção do amplificado foi utilizada fonte (*Electrophoresis Power Supply – EPS 301, Amersham Biosciences*), sendo visualizado em gel de agarose contendo brometo de etídio (concentração final de 0,5 µg/mL) e registrado em equipamento de fotodocumentação (*Imagemaster VDS, Pharmacia Biotech*). Foi utilizado um padrão de peso molecular 100 pb (Invitrogen).

Tabela 3 - Sequências de iniciadores utilizados para amplificação dos genes, tamanho (pb) e especificidade do sorovar de Listeria spp.

Genes	Seqüência de primer (5' – 3')	Tamanho (pb)	Especificidade do sorovar
<i>Imo0737</i>	For: AGGGCTTCAAGGACTTACCC Rev: ACGATTTCTGCTTGCCATTC	691	<i>L. monocytogenes</i> sorovares 1/2a, 1/2c, 3a e 3c
<i>Imo1118</i>	For: AGGGGTCTTAAATCCTGGAA Rev: CGGCTTGTTCCGGCATACTTA	906	<i>L. monocytogenes</i> sorovares 1/2c e 3c
ORF2819	For: AGCAAATGCCAAACTCGT Rev: CATCACTAAAGCCTCCCATTG	471	<i>L. monocytogenes</i> sorovares 1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e
ORF2110	For: AGTGGACAATTGATTGGTGAA Rev: CATCCATCCCTTACTTTGGAC	597	<i>L. monocytogenes</i> sorovares 4b, 4d e 4e
<i>prs</i>	For: GTCGAAGAGATTGCGAAAGAAG Rev: CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG	370	<i>Listeria spp.</i>

Fonte: Doumith et al. (2004)



Esquema 1: Representação do isolamento de *Listeria monocytogenes* de queijo minas frescal, de acordo com a norma ISO 11.290 Part 1 (*International Organisation for Standardisation*, Geneva) adaptado (SCOTTER et al., 2001), e segundo Kaclíková et al. (2003).

4 RESULTADOS

4.1 MARCA A

4.1.1 Coleta das amostras

Os queijos da Marca A foram adquiridos no dia anterior ao experimento em um supermercado do bairro da Tijuca, localizado no município do Rio de Janeiro. As 5 amostras tinham a mesma data de fabricação, validade e lote. Foi anotada a temperatura do balcão de armazenamento no supermercado: 6°C. Os queijos foram adquiridos e imediatamente acondicionados em isopor com gelo. Foram colocados em refrigerador a 4 °C por um período de 12 h anterior as análises. No rótulo constavam as informações que seguem abaixo:

“Queijo minas frescal com sal

Fabricante de Pouso Alto - MG

Lote: 335 Fab: 04/12/06 Val: 24/12/06

Ingredientes: leite pasteurizado, fermento láctico, cloreto de sódio, cloreto de cálcio e coalho. Não contém glúten”.

4.1.2 Ensaio microbiológicos

Segue abaixo os resultados dos erlenmeyers com Half Fraser após incubação a 30°C/24h:

Quadro 1 – Coloração do meio de cultura Half Fraser (Marca A) após incubação por 24h a 30°C

AMOSTRA	RESULTADO
A1	Marrom claro
A2	Marrom claro
A3	Marrom claro
A4	Marrom claro
A5	Marrom claro
C+1 (A)	Marrom escuro
C+2 (A)	Marrom bem escuro

O resultado após incubação do caldo BHI a 35°C/5h:

Quadro 2 – Aspecto do caldo BHI (Marca A) após incubação por 5h a 35°C

AMOSTRA	RESULTADO
A1	Levemente turvo
A2	Pouco turvo
A3	Turvo
A4	Turvo
A5	Turvo
C+1 (A)	Pouco turvo
C+2 (A)	Pouco turvo

Os resultados após 48h de incubação dos tubos com o crescimento em caldo Fraser seguem abaixo:

Quadro 3 – Coloração do meio de cultura Fraser (Marca A) após incubação por 48h a 35°C

AMOSTRA	RESULTADO
A1	Marrom bem escuro
A2	Marrom bem escuro
A3	Marrom bem escuro
A4	Marrom bem escuro
A5	Marrom bem escuro
C+1 (A)	Marrom bem escuro
C+2 (A)	Marrom bem escuro

As amostras e controles positivos foram semeados nas placas. Após incubação a 35°C/48h, os resultados estão descritos a seguir:

Quadro 4 – Características das colônias obtidas nos meios Oxford, Palcam e Cromogênico (Marca A) após incubação por 48h a 35°C

AMOSTRAS	MEIO OXFORD	MEIO PALCAM	MEIO CROMOGÊNICO
A1	Sem colônias	Colônias amareladas grandes	Colônias amareladas
A2	Sem colônias	Colônias amareladas grandes	Colônias amareladas
A3	Colônias grandes, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias grandes, com centro afundado e halo negro	Colônias médias, grandes, azul-esverdeadas, sem halo opaco
A4	Colônias médias, grandes, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias pequenas, com centro afundado e halo negro	Colônias médias, grandes, azul-esverdeadas, sem halo opaco
A5	Colônias pequenas, médias, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias pequenas, médias, grandes, com centro afundado e halo negro	Colônias médias, grandes, azul-esverdeadas, sem halo opaco
C+1 (A)	Colônias muito pequenas, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias grandes, com centro afundado e halo negro	Colônias médias, azul-esverdeadas, com halo opaco
C+2 (A)	Colônias muito pequenas, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias pequenas, médias, grandes, com centro afundado e halo negro	Colônias médias, azul-esverdeadas, com halo opaco

Foram coletadas 5 colônias características de *L. monocytogenes* das placas A3, A4, A5, C+1(A) e C+2 (A), de acordo com metodologia de Scotter et al. (2001). Não foram coletadas colônias de A1 e A2, pois essas placas não apresentaram colônias características.

Após a incubação de 24 h dos tubos com o crescimento em TSB com 0,6% de extrato de levedura, foi realizado o teste de hemólise. Após incubação a 35°C/48h os resultados estão descritos a seguir:

Quadro 5 – Indicação de hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas do meio Oxford (Marca A)

AMOSTRAS	RESULTADOS				
	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5
A3	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise
	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5
A4	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise
	5.1	5.2	5.3	5.4	5.5
A5	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise
	C+ 1.1	C+ 1.2	C+ 1.3	C+ 1.4	C+ 1.5
C+1 (A)	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117
	C+ 2.1	C+ 2.2	C+ 2.3	C+ 2.4	C+ 2.5
C+2 (A)	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117

Quadro 6 – Indicação de hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas do meio Palcam (Marca A)

AMOSTRAS	RESULTADOS				
	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5
A3	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise
	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5
A4	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise
	5.1	5.2	5.3	5.4	5.5
A5	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise
	C+ 1.1	C+ 1.2	C+ 1.3	C+ 1.4	C+ 1.5
C+1 (A)	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Sem halo de hemólise	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise
	C+ 2.1	C+ 2.2	C+ 2.3	C+ 2.4	C+ 2.5

AMOSTRAS	RESULTADOS				
C+2 (A)	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117

Quadro 7 – Indicação de hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas do meio Cromogênico (Marca A)

AMOSTRAS	RESULTADOS				
	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5
A3	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise
	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5
A4	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise
	5.1	5.2	5.3	5.4	5.5
A5	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise
	C+ 1.1	C+ 1.2	C+ 1.3	C+ 1.4	C+ 1.5
C+1 (A)	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117
	C+ 2.1	C+ 2.2	C+ 2.3	C+ 2.4	C+ 2.5
C+2 (A)	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644

4.1.3 – Extração de DNA e Multiplex-PCR

Segue abaixo o resultado da Multiplex-PCR de acordo com o protocolo de Doumtih et al. (2004), realizada com o DNA extraído do crescimento de 5h em caldo BHI, segundo protocolo de Kaclíková et al. (2003):

Quadro 8 – Multiplex-PCR de isolados obtidos de amostra de queijo minas frescal, controles positivos e negativo, e cepas de referência (Marca A)

AMOSTRAS	RESULTADOS
A1	Sem bandas características
A2	Sem bandas características
A3	370 pb
A4	370 pb
A5	370 pb
C+1 (A)	370 + 471 + 597 + 691pb
C+2 (A)	370 + 691pb
C -	Sem bandas
ATCC 7644	370 + 691pb
ATCC 19117	370 + 471 + 597 pb

Abaixo segue a foto do gel em agarose:

100pb A1 A2 A3 A4 A5 C+1 C+2 C- 7644 19117 100pb

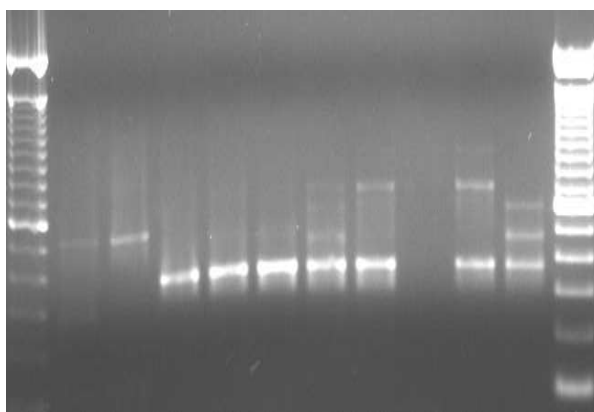


Figura 1 – Gel ilustrativo da amplificação pela Multiplex-PCR do DNA extraído de *Listeria spp.* isoladas de amostra de queijo minas frescal (Marca A), controles positivos 1 e 2, controle negativo, cepas de referência ATCC 7644 e ATCC 19117. Padrão de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

4.2 MARCA B

4.2.1 Coleta das amostras

Os queijos da Marca B foram adquiridos no dia anterior ao experimento em uma padaria do bairro de Vila Isabel, localizada no município do Rio de Janeiro. As 5 amostras tinham a mesma data de fabricação, validade e lote. Foi anotada a temperatura do balcão de armazenamento no supermercado: 2°C. Os queijos foram adquiridos e imediatamente acondicionados em isopor com gelo. Foram colocados em refrigerador a 4 °C por um período de 12 h anterior às análises. No rótulo constavam as informações que seguem abaixo:

“Queijo minas frescal

Fabricante de Belmiro Braga - MG

Lote: 0315 Fab: 05/01/07 Val: 04/02/07

Ingredientes: leite pasteurizado, sal, fermento láctico, cloreto de cálcio e coalho de origem animal”.

4.2.2 Ensaio microbiológicos

Segue abaixo os resultados dos erlenmeyers com Half Fraser após incubação a 30°C/24h:

Quadro 9 – Coloração do meio de cultura Half Fraser (Marca B) após incubação por 24h a 30°C

AMOSTRAS	RESULTADO
B6	Marrom claro
B7	Marrom claro
B8	Marrom claro
B9	Marrom claro
B10	Marrom claro
C+1 (B)	Marrom escuro
C+2 (B)	Marrom bem escuro

O resultado após incubação do caldo BHI a 35°C/5h:

Quadro 10 – Aspecto do caldo BHI (Marca B) após incubação por 5h a 35°C

AMOSTRAS	RESULTADO
B6	Turvo
B7	Turvo
B8	Turvo
B9	Turvo
B10	Turvo
C+1 (B)	Turvo
C+2 (B)	Turvo

Os resultados após 48h de incubação dos tubos com o crescimento em caldo Fraser seguem abaixo:

Quadro 11 – Coloração do meio de cultura Fraser (Marca B) após incubação por 48h a 35°C

AMOSTRAS	RESULTADO
B6	Marrom bem escuro
B7	Marrom bem escuro
B8	Marrom bem escuro
B9	Marrom bem escuro
B10	Marrom bem escuro
C+1 (B)	Marrom bem escuro
C+2 (B)	Marrom bem escuro

As amostras e controles positivos foram semeados nas placas. Após incubação a 35°C/48h, os resultados estão descritos no quadro abaixo:

Quadro 12 – Características das colônias obtidas nos meios Oxford, Palcam e Cromogênico (Marca B) após incubação por 48h a 35°C

AMOSTRAS	MEIO OXFORD	MEIO PALCAM	MEIO CROMOGÊNICO
B6	Sem colônias	Sem colônias	Sem colônias
B7	Sem colônias	Sem colônias	Sem colônias
B8	Sem colônias	Sem colônias	Sem colônias
B9	Colônias pequenas (24), brancas, com halo negro	Sem colônias	Sem colônias
B10	Sem colônias	Sem colônias	Sem colônias

AMOSTRAS	MEIO OXFORD	MEIO PALCAM	MEIO CROMOGÊNICO
C+1 (B)	Colônias médias, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias grandes, com centro afundado e halo negro	Colônias médias, azul-esverdeadas, com halo opaco
C+2 (B)	Colônias muito pequenas, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias pequenas, médias, grandes, com centro afundado e halo negro	Colônias médias, azul-esverdeadas, com halo opaco

Para ratificar o resultado, foi realizado o teste de hemólise com 10 colônias isoladas da placa B9 – meio Oxford, assim como 2 colônias de cada meio dos controles positivos. Os resultados, após 48h de incubação a 35°C das placas de ágar sangue semeadas:

Quadro 13 – Indicação de hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas do meio Oxford (Marca B)

AMOSTRAS	RESULTADO				
	9.1	9.2	9.3	9.4	9.5
B9	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise
	9.6	9.7	9.8	9.9	9.10
	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise
	C+ 1.1	C+ 1.2			
C+1 (B)	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644			
	C+ 2.1	C+ 2.2			
C+2 (B)	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644			

4.2.3 – Extração de DNA e Multiplex- PCR

Assim como a marca A, foi realizada a Multiplex-PCR utilizando o protocolo de Doumtih et al. (2004), utilizando o DNA extraído segundo Kaclicková et al. (2003) do crescimento após 5h em caldo BHI. Os resultados seguem abaixo:

Quadro 14 – Multiplex-PCR de isolados obtidos de amostra de queijo minas frescal, controles positivos e negativo, e cepas de referência (Marca B)

AMOSTRAS	RESULTADO
B6	Sem bandas
B7	Sem bandas
B8	Sem bandas características
B9	Sem bandas
B10	Sem bandas características
C+1 (B)	370 + 691pb
C+2 (B)	370 + 691pb
C -	Sem bandas
ATCC 7644	370 + 691pb
ATCC 19117	370 + 471 + 597 pb

Abaixo segue a foto do gel em agarose:

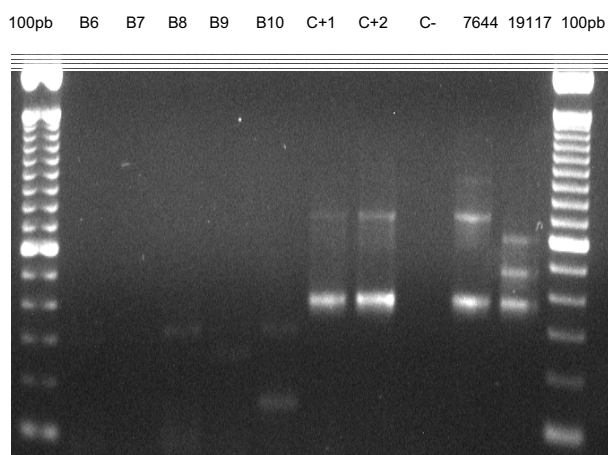


Figura 2 – Gel ilustrativo da amplificação pela Multiplex-PCR do DNA extraído de Listeria spp. isoladas de amostra de queijo minas frescal (Marca B), controles positivos 1 e 2, controle negativo, cepas de referência ATCC 7644 e ATCC 19117. Padrão de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

4.3 MARCA C

4.3.1 Coleta das amostras

Os queijos da Marca C foram adquiridos, no dia anterior ao experimento, em um supermercado do bairro da Tijuca, localizado no município do Rio de Janeiro. As 5 amostras tinham a mesma data de fabricação, validade e lote. Foi anotada a temperatura do balcão de armazenamento no supermercado: 0°C. Os queijos foram adquiridos e imediatamente acondicionados em isopor com gelo. Foram colocados em refrigerador a 4 °C por um período de 12 h anterior às análises. No rótulo constavam as informações que seguem abaixo:

“Queijo minas frescal

Fabricante de Campanha - MG

Lote: 08 Fab: 08/03/07 Val: 24/04/07

Ingredientes: leite pasteurizado, fermento láctico, sal, cloreto de cálcio e coalho”.

4.3.2 Ensaio microbiológicos

Segue abaixo os resultados dos erlenmeyers com Half Fraser após incubação a 30°C/24h:

Quadro 15 – Coloração do meio de cultura Half Fraser (Marca C) após incubação por 24h a 30°C

AMOSTRA	RESULTADO
C11	Marrom claro e odor forte
C12	Marrom claro e odor forte
C13	Marrom claro e odor forte
C14	Marrom claro e odor forte
C15	Marrom claro e odor forte
C+1 (C)	Marrom escuro e odor forte
C+2 (C)	Marrom bem escuro e odor forte

O resultado após incubação do caldo BHI a 35°C/5h:

Quadro 16 – Aspecto do caldo BHI (Marca C) após incubação por 5h a 35°C

AMOSTRAS	RESULTADO
C11	Turvo
C12	Turvo
C13	Turvo
C14	Turvo
C15	Turvo
C+1 (C)	Turvo
C+2 (C)	Turvo

Os resultados após 48h de incubação dos tubos com o crescimento em caldo Fraser seguem abaixo:

Quadro 17 – Coloração do meio de cultura Fraser (Marca C) após incubação por 48h a 35°C

AMOSTRAS	RESULTADO
C11	Marrom bem escuro
C12	Marrom bem escuro
C13	Marrom bem escuro
C14	Marrom bem escuro
C15	Marrom bem escuro
C+1 (C)	Marrom bem escuro
C+2 (C)	Marrom bem escuro

As amostras e controles positivos foram semeados nas placas. Após incubação a 35°C/48h, os resultados estão a seguir:

Quadro 18 – Características das colônias obtidas nos meios Oxford, Palcam e Cromogênico (Marca C) após incubação por 48h a 35°C

AMOSTRAS	MEIO OXFORD	MEIO PALCAM	MEIO CROMOGÊNICO
C11	Colônias grandes, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias grandes, com centro afundado e halo negro	Colônias médias, grandes, azul-esverdeadas, sem halo opaco
C12	Colônias amarelas, sem halo negro	Sem colônias	Sem colônias
C13	Sem colônias	Sem colônias	Sem colônias
C14	Sem colônias	Sem colônias	Sem colônias
C15	Sem colônias	Sem colônias	Sem colônias
C+1 (C)	Colônias médias, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias grandes, com centro afundado e halo negro	Colônias médias, azul-esverdeadas, com halo opaco
C+2 (C)	Colônias muito pequenas, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias pequenas, médias, grandes, com centro afundado e halo negro	Colônias médias, azul-esverdeadas, com halo opaco

Para ratificar o resultado, foi realizado o teste de hemólise com 15 colônias isoladas de C11, do meio Oxford (5 colônias), meio Palcam (5 colônias) e meio Cromogênico (5 colônias), assim como 2 colônias de cada meio dos controles positivos. Os resultados, após 48h de incubação a 35°C das placas de ágar sangue semeadas:

Quadro 19 – Indicação de hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas do meio Oxford (Marca C)

AMOSTRAS	RESULTADO				
	11.1	11.2	11.3	11.4	11.5
C11	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise
	C+ 1.1	C+ 1.2			
C+1 (C)	Pequeno halo, parecido com ATCC	Pequeno halo, parecido com ATCC			

AMOSTRAS	RESULTADO				
	7644	7644			
	C+ 2.1	C+ 2.2			
C+2 (C)	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644			

Quadro 20 – Indicação de hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas do meio Palcam (Marca C)

AMOSTRAS	RESULTADO				
	11.1	11.2	11.3	11.4	11.5
C11	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise
	C+ 1.1	C+ 1.2			
C+1 (C)	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644			
	C+ 2.1	C+ 2.2			
C+2 (C)	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644			

Quadro 21 – Indicação de hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas do meio Cromogênico (Marca C)

AMOSTRAS	RESULTADO				
	11.1	11.2	11.3	11.4	11.5
C11	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise	Sem halo de hemólise
	C+ 1.1	C+ 1.2			
C+1 (C)	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644			
	C+ 2.1	C+ 2.2			
C+2 (C)	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644			

4.3.3 – Extração de DNA e Multiplex-PCR

Foi realizada a Multiplex-PCR utilizando o DNA do crescimento em caldo BHI extraído segundo Kaclíková et al. (2003). Os resultados seguem abaixo:

Quadro 22 – Multiplex-PCR de isolados obtidos de amostra de queijo minas frescal, controles positivos e negativo (Marca C)

AMOSTRAS	RESULTADO
C11	Sem bandas
C12	Sem bandas características
C13	Sem bandas
C14	Sem bandas
C15	Sem bandas características
C+1 (C)	370 pb
C+2 (C)	370 pb
C -	Sem bandas

Abaixo segue fotos do gel em agarose:

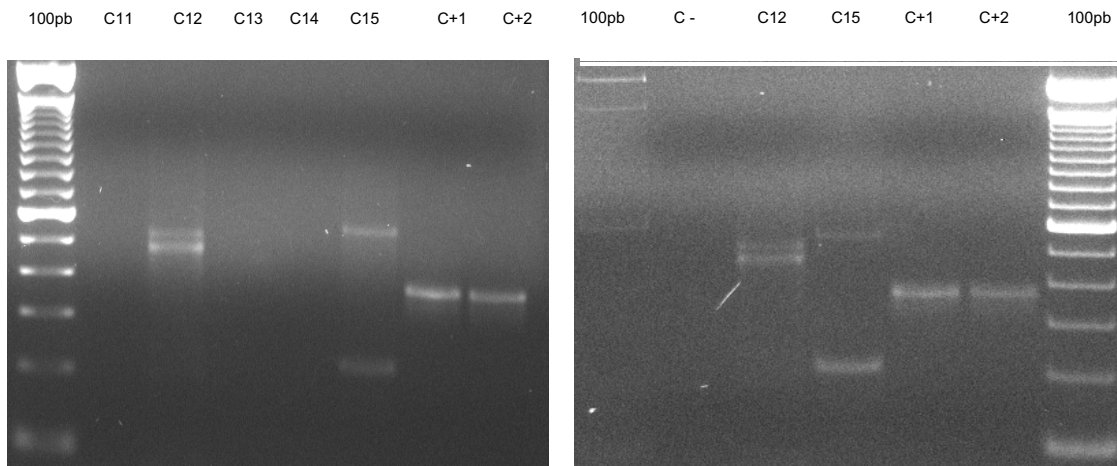


Figura 3 e 4 - Gel ilustrativo da amplificação pela Multiplex-PCR do DNA extraído de Listeria spp. isoladas de amostra de queijo minas frescal (Marca C), controles positivos 1, 2 e controle negativo. Padrão de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

4.3.4 – Ensaios confirmatórios

Foi realizado o teste de motilidade e utilização de carboidratos (glicose e maltose), assim como extração do crescimento em BHI da amostra C11, C+1 (C) e C+2 (C) pelo Kit Qiagen.

No teste de motilidade, onde foram utilizadas o crescimento das mesmas colônias utilizadas para teste de hemólise, após incubação do inoculado em meio SIM a 30°C/5dias, somente em C11.2 (meio Oxford) e C11.4 (meio Cromogênico) houve motilidade com formação de “guarda-chuva”, nas demais não houve observação de motilidade. No teste de utilização de carboidratos, onde houve incubação a 35°C/7 dias, ocorreu alteração do meio (roxo para amarelo) para todas as colônias.

Na Multiplex-PCR o resultado segue abaixo:

Quadro 23 – Multiplex-PCR de isolados obtidos de amostra de queijo minas frescal, cujo DNA foi extraído pelo Kit Qiagen, controles positivos e negativo (Marca C)

AMOSTRAS	RESULTADO
C11	370 pb
C+1 (C)	370 + 471 + 597 + 691pb
C+2 (C)	370 + 471 + 597 + 691pb
C -	Sem bandas

*As bandas 471 pb e 597 pb aparecem levemente na foto do gel.

Segue a foto da Multiplex-PCR:

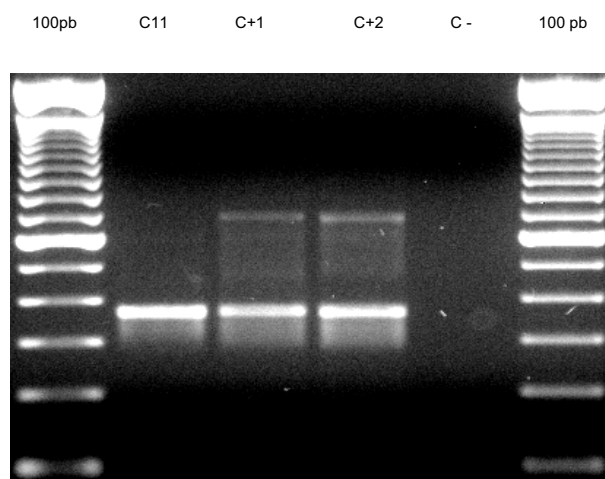


Figura 5 – Gel ilustrativo da amplificação pela Multiplex-PCR do DNA extraído de *Listeria spp.*, com o Kit Qiagen, isolada de amostra de queijo minas frescal (Marca C), controles positivos 1, 2 e controle negativo. Padrão de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

4.4 MARCA D

4.4.1 Coleta das amostras

Os queijos da Marca D foram adquiridos no dia anterior ao experimento em um supermercado do bairro de Vila Isabel, localizado no município do Rio de Janeiro. As 5 amostras tinham a mesma data de fabricação, validade e lote. Foi anotada a temperatura do balcão de armazenamento no supermercado: 2°C. Os queijos foram adquiridos e imediatamente acondicionados em isopor com gelo. Foram colocados em refrigerador a 4,5 °C por um período de 12 h anterior às análises. No rótulo constavam as informações que seguem abaixo:

“Queijo minas frescal tradicional com sal

Fabricante de Aiuruoca - MG

Lote: C20 Fab: 09/03/07 Val: 08/04/07

Ingredientes: leite pasteurizado, fermento láctico, sal, cloreto de cálcio e coalho”.

4.4.2 Ensaio microbiológicos

Segue abaixo os resultados dos erlenmeyers com Half Fraser após incubação a 30°C/24h:

Quadro 24 – Coloração do meio de cultura Half Fraser (Marca D) após incubação por 24h a 30°C

AMOSTRAS	RESULTADO
D16	Amarelo-ovo
D17	Amarelo-ovo
D18	Amarelo-ovo
D19	Marrom escuro
D20	Marrom escuro
C+1 (D)	Marrom escuro
C+2 (D)	Marrom bem escuro

O resultado após incubação do caldo BHI a 35°C/5h:

Quadro 25 – Aspecto do caldo BHI (Marca D) após incubação por 5h a 35°C

AMOSTRAS	RESULTADO
D16	Turvo
D17	Turvo
D18	Turvo
D19	Turvo
D20	Turvo
C+1 (D)	Turvo
C+2 (D)	Pouco turvo

Os resultados após 48h de incubação dos tubos com o crescimento em caldo Fraser estão a seguir:

Quadro 26 – Coloração do meio de cultura Fraser (Marca D) após incubação por 48h a 35°C

AMOSTRAS	RESULTADO
D16	Marrom escuro
D17	Marrom escuro
D18	Marrom escuro
D19	Marrom escuro
D20	Marrom escuro
C+1 (D)	Marrom escuro
C+2 (D)	Marrom

As amostras e controles positivos foram semeados nas placas. Após incubação, os resultados foram:

Quadro 27 – Características das colônias obtidas nos meios Oxford, Palcam e Cromogênico (Marca D) após incubação por 48h a 35°C

AMOSTRAS	MEIO OXFORD	MEIO PALCAM	MEIO CROMOGÊNICO
D16	Sem colônias	Sem colônias	Sem colônias
D17	Manchas brancas com pequenas colônias brancas, com halo negro	Manchas brancas com pequenas colônias brancas, com halo negro	Sem colônias
D18	Sem colônias	Sem colônias	Sem colônias
D19	Manchas brancas com pequenas colônias brancas, com halo negro	Manchas brancas com pequenas colônias brancas, com halo negro	Sem colônias
D20	Manchas brancas com pequenas colônias brancas, com halo negro	Manchas brancas com pequenas colônias brancas, algumas com halo negro	Sem colônias
C+1 (D)	Colônias médias, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias pequenas, com centro afundado e halo negro	Colônias médias, azul-esverdeadas, com halo opaco
C+2 (D)	Colônias médias, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias pequenas, com centro afundado e halo negro	Colônias médias, azul-esverdeadas, com halo opaco

4.4.3 Extração de DNA e Multiplex-PCR

Foi realizada a Multiplex-PCR utilizando o DNA extraído segundo Kaclicková et al. (2003) de um crescimento em caldo BHI. Os resultados seguem abaixo:

Quadro 28 – Multiplex-PCR de isolados obtidos de amostra de queijo minas frescal, controles positivos e negativo, e cepas de referência (Marca D)

	MULTIPLEX-PCR
D16	Sem bandas características
D17	Sem bandas características
D18	Sem bandas características
D19	Sem bandas características
D20	Sem bandas características
C+1 (D)	370 + 471 + 597 pb
C+2 (D)	370 + 691 pb
C -	Sem bandas
ATCC 7644	370 + 691+ 906 pb
ATCC 19117	370 + 471 + 597 pb
ATCC7644+ ATCC19117	Sem bandas

Abaixo segue a foto do gel em agarose:

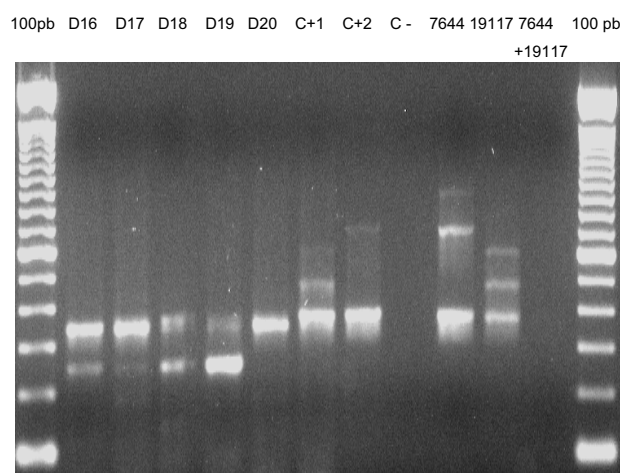


Figura 6 – Gel ilustrativo da amplificação pela Multiplex-PCR do DNA extraído de Listeria spp. isoladas de amostra de queijo minas frescal (Marca D), controles positivos 1 e 2, controle negativo e cepas de referência ATCC 7644 e ATCC 19117. Padrão de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

4.5 MARCA E

4.5.1 Coleta das amostras

Os queijos da Marca E foram adquiridos, no dia anterior ao experimento, em um supermercado do bairro da Tijuca, localizado no município do Rio de Janeiro. As 5 amostras tinham a mesma data de fabricação, validade e lote. Foi anotada a temperatura do balcão de armazenamento no supermercado: 8°C. Os queijos foram adquiridos e imediatamente acondicionados em isopor com gelo. Foram colocados em refrigerador a 3 °C por um período de 12 h anterior às análises. No rótulo constavam as informações que seguem abaixo:

“Queijo minas frescal – MARCA E

Fabricante de Lagoa Dourada - MG

Lote: Fab: 29/04/2007 Val: 13/06/2007

Ingredientes: leite pasteurizado, sal, cloreto de cálcio, ácido láctico, coalho. Não contém glúten”.

4.5.2 Ensaio microbiológicos

Segue abaixo os resultados dos erlenmeyers com *Half Fraser* após incubação a 30°C/24h:

Quadro 29 – Coloração do meio de cultura Half Fraser (Marca E) após incubação por 24h a 30°C

AMOSTRAS	RESULTADO
E21	Amarelo-ovo
E22	Amarelo-ovo
E23	Amarelo-ovo
E24	Amarelo-ovo
E25	Amarelo-ovo
C+1 (E)	Amarelo-ovo
C+2 (E)	Marrom escuro

O resultado após incubação do caldo BHI:

Quadro 30 – Aspecto do caldo BHI (Marca E) após incubação por 5h a 35°C

AMOSTRAS	RESULTADO
E21	Turvo
E22	Turvo
E23	Turvo
E24	Turvo
E25	Turvo
C+1 (E)	Turvo
C+2 (E)	Pouco turvo

Os resultados após 48h de incubação dos tubos com o crescimento em caldo *Fraser* seguem abaixo:

Quadro 31 – Coloração do meio de cultura *Fraser* (Marca E) após incubação por 48h a 35°C

AMOSTRA	RESULTADO
E21	Marrom
E22	Marrom
E23	Marrom
E24	Marrom
E25	Marrom
C+1 (E)	Marrom
C+2 (E)	Marrom

As amostras e controles positivos foram semeados nas placas. Após incubação, os resultados seguem no quadro 32:

Quadro 32 – Características das colônias obtidas nos meios Oxford, Palcam e Cromogênico (Marca E) após incubação por 48h a 35°C

AMOSTRAS	MEIO OXFORD	MEIO PALCAM	MEIO CROMOGÊNICO
E21	Colônias médias, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias pequenas, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias grandes, azul-esverdeadas, com halo opaco
E22	Colônias grandes e médias, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias médias, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias grandes, azul-esverdeadas, com halo opaco
E23	Colônias médias, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias pequenas, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias grandes, azul-esverdeadas, com halo opaco
E24	Colônias médias, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias médias e pequenas, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias grandes e médias, azul-esverdeadas, com halo opaco
E25	Colônias médias, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias médias, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias médias e pequenas, azul-esverdeadas, com halo opaco
C+1 (E)	Colônias grandes, médias e pequenas, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias grandes, médias e pequenas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias grandes, médias e pequenas, azuis, com halo opaco
C+2 (E)	Colônias grandes, médias e pequenas, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias muito pequenas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias grandes, médias e pequenas, azuis, com halo opaco

Foram coletadas 5 colônias características de *L. monocytogenes* das placas E21, E22, E23, E24, E25, C+1(E) e C+2 (E), de acordo com metodologia de Scotter et al. (2001). Cada colônia foi colocada em tubos de caldo TSB com 0,6% de extrato de levedura, e incubados em estufa a 35°C por 24h. Após decorrido esse tempo foi realizado o teste de hemólise utilizando as mesmas cepas de referência, conforme realizado com a marca A anteriormente.

Os resultados obtidos com hemólise 48h estão descritos abaixo:

Quadro 33 – Indicação de hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas do meio Oxford (Marca E)

AMOSTRAS	RESULTADO				
	21.1	21.2	21.3	21.4	21.5
E21	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644
	22.1	22.2	22.3	22.4	22.5
E22	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644
	23.1	23.2	23.3	23.4	23.5
E23	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644
	24.1	24.2	24.3	24.4	24.5
E24	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644
	25.1	25.2	25.3	25.4	25.5
E25	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117
	C+ 1.1	C+ 1.2	C+ 1.3	C+ 1.4	C+ 1.5
C+1 (E)	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117
	C+ 2.1	C+ 2.2	C+ 2.3	C+ 2.4	C+ 2.5
C+2 (E)	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644

Quadro 34 – Indicação de hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas do meio Palcam (Marca E)

AMOSTRAS	RESULTADO				
	21.1	21.2	21.3	21.4	21.5
E21	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644
	22.1	22.2	22.3	22.4	22.5
E22	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644
	23.1	23.2	23.3	23.4	23.5
E23	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644
	24.1	24.2	24.3	24.4	24.5
E24	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117
	25.1	25.2	25.3	25.4	25.5
E25	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117
	C+ 1.1	C+ 1.2	C+ 1.3	C+ 1.4	C+ 1.5
C+1 (E)	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117
	C+ 2.1	C+ 2.2	C+ 2.3	C+ 2.4	C+ 2.5
C+2 (E)	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117

Quadro 35 – Indicação de hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas do meio Cromogênico (Marca E)

AMOSTRAS	RESULTADO				
	21.1	21.2	21.3	21.4	21.5
E21	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644
	22.1	22.2	22.3	22.4	22.5
E22	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644
	23.1	23.2	23.3	23.4	23.5
E23	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644
	24.1	24.2	24.3	24.4	24.5
E24	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644
	25.1	25.2	25.3	25.4	25.5
E25	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644
	C+ 1.1	C+ 1.2	C+ 1.3	C+ 1.4	C+ 1.5
C+1 (E)	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117
	C+ 2.1	C+ 2.2	C+ 2.3	C+ 2.4	C+ 2.5
C+2 (E)	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117

4.5.3 Ensaio confirmatórios

Foi realizado o teste de motilidade e utilização de carboidratos (glicose, maltose, xilose, manitol e ramnose), catalase e coloração de GRAM para confirmação do resultado, pois houve formação de colônias características após incubação a 35°C/48h. Devido ao nível de trabalho requerido nesse estudo e a utilização da biologia molecular em conjunto com os testes fenotípicos e bioquímicos, o teste CAMP – indicativo de *L. monocytogenes* - não foi realizado, apesar de ser preconizado no trabalho de Scotter et al. (2001).

No teste de motilidade, onde foram utilizadas o crescimento das mesmas colônias utilizadas para teste de hemólise, após incubação do inoculado em meio SIM a 30°C/5dias, todos os inoculados apresentaram motilidade com formação de “guarda-chuva”, com exceção de 22.2 Palcam e 22.5 Cromogênico, onde foi observada motilidade sem a formação de “guarda-chuva”.

No teste de utilização de carboidratos, onde houve incubação a 35°C/7 dias, ocorreu alteração do meio (meio roxo para amarelo) de glicose e maltose para quase todas as colônias, indicando a presença de *Listeria* sp. Praticamente todas as colônias não tiveram utilização de xilose e manitol, mas tiveram utilização de ramnose, sugerindo a presença de *L. monocytogenes*. A exceção encontrada foi para 22.2 Oxford, onde houve utilização de xilose, manitol e ramnose; 22.2 Palcam e 22.5 Cromogênico, onde ocorreu utilização de manitol e ramnose.

O teste de catalase foi positivo para todos os inoculados, com exceção de 22.2 Oxford, 22.2 Palcam e 22.5 Cromogênico.

Na coloração de Gram todos os inoculados foram Gram +.

4.5.4 Extração de DNA e Multiplex-PCR

Foi realizada a Multiplex-PCR utilizando o DNA de um crescimento em caldo BHI extraído conforme Kaclíková et al. (2003). Os resultados seguem abaixo:

Quadro 36 – Multiplex-PCR de isolados obtidos de amostra de queijo minas frescal, controles positivos e negativo, e cepas de referência (Marca E)

	MULTIPLEX-PCR
E21	370 + 471 pb
E22	370 + 471 pb
E23	370 + 471 pb
E24	370 + 471 pb
E25	370 + 471 pb
C+1 (E)	370 + 471 + 597 pb
C+2 (E)	370 + 471 + 597 + 691 pb
C -	Sem bandas
ATCC 7644	370 + 691+ 906 pb
ATCC 19117	370 + 471 + 597 pb

Abaixo segue as fotos do gel em agarose:

100pb E21 E22 E23 E24 E25 7644 19117 100pb E21 C+1 C+2 C - 100pb

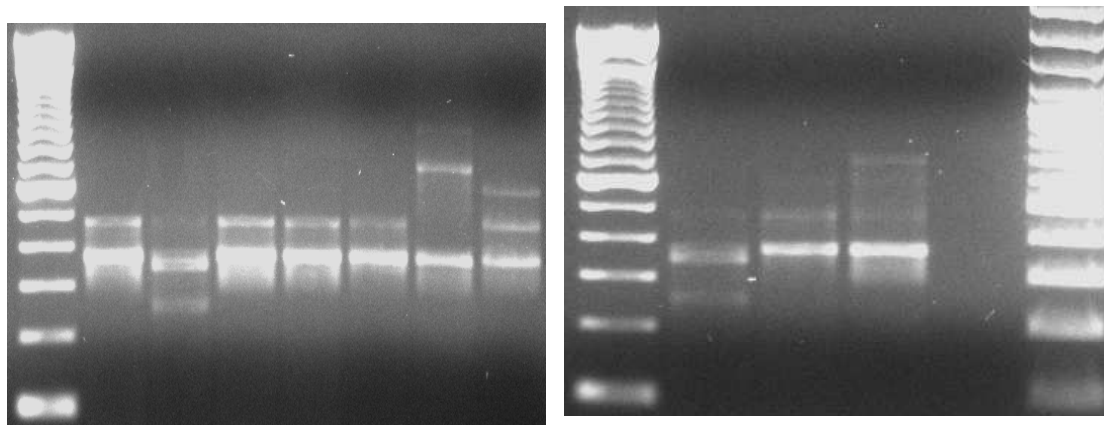


Figura 7 e 8 - Gel ilustrativo da amplificação pela Multiplex-PCR do DNA extraído de *Listeria spp.* isoladas de amostra de queijo minas frescal (Marca E), controles positivos 1 e 2, controle negativo e cepas de referência ATCC 7644 e ATCC 19117. Padrão de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

100pb C - Am.E 7644 19117 C+1 C+2 100pb

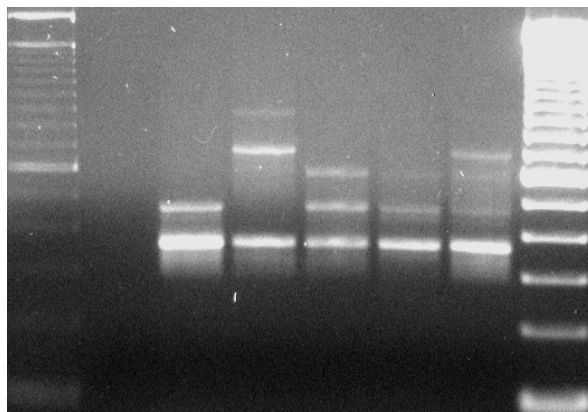


Figura 9 – Gel ilustrativo da amplificação pela Multiplex-PCR do DNA extraído de Listeria spp. isolada de amostra de queijo minas frescal (Marca E), controles positivos 1 e 2, controle negativo e cepas de referência ATCC 7644 e ATCC 19117. Padrão de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

4.6 MARCA F

4.6.1 Coleta das amostras

Os queijos da Marca F foram adquiridos no dia anterior ao experimento em um supermercado do bairro de Vila Isabel, localizado no município do Rio de Janeiro. As 5 amostras tinham a mesma data de fabricação, validade e lote. Foi anotada a temperatura do balcão de armazenamento no supermercado: 8°C. Os queijos foram adquiridos e imediatamente acondicionados em isopor com gelo. Foram colocados em refrigerador a 4 °C por um período de 12 h anterior às análises. No rótulo constavam as informações que seguem abaixo:

“Queijo minas frescal

Fabricante de Miradouro - MG

Lote: 041 Fab: 05/06/2007 Val: 05/07/2007

Ingredientes: leite pasteurizado, sal, cloreto de cálcio, ácido láctico, coalho”.

4.6.2 Ensaio microbiológicos

Segue abaixo os resultados dos erlenmeyers com Half Fraser após incubação a 30°C/24h:

Quadro 37 – Coloração do meio de cultura Half Fraser (Marca F) após incubação por 24h a 30°C

AMOSTRAS	RESULTADO
F26	Amarelo-ovo
F27	Amarelo-ovo
F28	Amarelo-ovo
F29	Amarelo-ovo
F30	Amarelo-ovo
C+1 (F)	Amarelo-ovo
C+2 (F)	Marrom escuro

O resultado após incubação do caldo BHI a 35°C/5h:

Quadro 38 – Aspecto do caldo BHI (Marca F) após incubação por 5h a 35°C

AMOSTRAS	RESULTADO
F26	Turvo
F27	Turvo
F28	Turvo
F29	Turvo
F30	Turvo
C+1 (F)	Turvo
C+2 (F)	Pouco turvo

Os resultados após 48h de incubação dos tubos com o crescimento em caldo Fraser estão a seguir:

Quadro 39 – Coloração do meio de cultura Fraser (Marca F) após incubação por 48h a 35°C

AMOSTRAS	RESULTADO
F26	Marrom
F27	Marrom
F28	Marrom
F29	Marrom
F30	Marrom
C+1 (F)	Marrom
C+2 (F)	Marrom

As amostras e controles positivos foram semeados nas placas. Após incubação a 35°C/48h, os resultados foram o seguinte:

Quadro 40 – Características das colônias obtidas nos meios Oxford, Palcam e Cromogênico (Marca F) após incubação por 48h a 35°C

AMOSTRAS	MEIO OXFORD	MEIO PALCAM	MEIO CROMOGÊNICO
F26	Colônias médias, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias médias, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias médias, grandes, azul-esverdeadas, sem halo opaco
F27	Colônias médias, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias amareladas, meio de cultura amarelado	Colônias médias, azul-esverdeadas, sem halo opaco
F28	Colônias médias, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias amareladas, meio de cultura bem amarelado	Colônias médias, azul-esverdeadas, sem halo opaco
F29	Colônias médias, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias brancas, meio de cultura rósea	Colônias médias, azul-esverdeadas, sem halo opaco
F30	Colônias médias, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias amareladas, meio de cultura amarelado e rósea	Colônias médias, azul-esverdeadas, sem halo opaco
C+1 (F)	Colônias médias, isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	Colônias amareladas, meio de cultura rósea	Colônias médias, azul-esverdeadas, com e sem halo opaco
C+2 (F)	Colônias médias.	Colônias médias.	Colônias médias. azul-

AMOSTRAS	MEIO OXFORD	MEIO PALCAM	MEIO CROMOGÊNICO
	isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro	com centro afundado e halo negro	esverdeadas, com halo opaco

Foram coletadas 5 colônias características de *L. monocytogenes* das placas F26 (Oxford, Palcam e Cromogênico), F27 (Oxford e Cromogênico), F28 (Oxford e Cromogênico), F29 (Oxford e Cromogênico), F30 (Oxford e Cromogênico), C+1(F) e C+2 (F) dos três meios de cultura, de acordo com metodologia de Scotter et al. (2001). Cada colônia foi colocada em tubos de caldo TSB com 0,6% de extrato de levedura. Os tubos foram incubados em estufa a 35°C por 24h. Após decorrido o tempo de incubação foi realizado o teste de hemólise utilizando as mesmas cepas de referência.

Os resultados obtidos com hemólise 48h estão descritos abaixo:

Quadro 41 – Indicação de hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas do meio Oxford (Marca F)

AMOSTRAS	RESULTADO				
	26.1	26.2	26.3	26.4	26.5
F26	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise
	27.1	27.2	27.3	27.4	27.5
F27	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise
	28.1	28.2	28.3	28.4	28.5
F28	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise
	29.1	29.2	29.3	29.4	29.5
F29	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise
	30.1	30.2	30.3	30.4	30.5
F30	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise
	C+ 1.1	C+ 1.2	C+ 1.3	C+ 1.4	C+ 1.5
C+1 (F)	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise
	C+ 2.1	C+ 2.2	C+ 2.3	C+ 2.4	C+ 2.5
C+2 (F)	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644

Quadro 42 – Indicação de hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas do meio Palcam (Marca F)

AMOSTRAS	RESULTADO				
	26.1	26.2	26.3	26.4	26.5
F26	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise
	C+ 1.1	C+ 1.2	C+ 1.3	C+ 1.4	C+ 1.5
C+1 (F)	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise
	C+ 2.1	C+ 2.2	C+ 2.3	C+ 2.4	C+ 2.5
C+2 (F)	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644

Quadro 43 – Indicação de hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas do meio Cromogênico (Marca F)

AMOSTRAS	RESULTADO				
	26.1	26.2	26.3	26.4	26.5
F26	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise
	27.1	27.2	27.3	27.4	27.5
F27	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise
	28.1	28.2	28.3	28.4	28.5
F28	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise
	29.1	29.2	29.3	29.4	29.5
F29	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise
	30.1	30.2	30.3	30.4	30.5
F30	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise	Sem hemólise
	C+ 1.1	C+ 1.2	C+ 1.3	C+ 1.4	C+ 1.5
C+1 (F)	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Sem hemólise	Sem hemólise	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Sem hemólise
	C+ 2.1	C+ 2.2	C+ 2.3	C+ 2.4	C+ 2.5
C+2 (F)	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 7644	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117	Pequeno halo, parecido com ATCC 19117

4.6.3 Ensaios confirmatórios

No teste de motilidade, onde foram utilizadas o crescimento das mesmas colônias utilizadas para teste de hemólise, após incubação do inoculado em meio SIM a 30°C/5dias, todos os inoculados apresentaram motilidade com formação de “guarda-chuva”.

No teste de utilização de carboidratos, onde houve incubação a 35°C/7 dias, ocorreu alteração do meio (roxo para amarelo) para todas as colônias e para glicose e maltose, indicando presença de *Listeria* sp. Nos demais açúcares (xilose, ramnose e manitol) não foi observado alteração do meio. Somente para 26.2 Palcam, que xilose e manitol foram utilizados (roxo para amarelo), porém a ramnose não foi (permaneceu roxo). Isso indica que não é *L. monocytogenes*.

4.6.4 Extração de DNA e Multiplex-PCR

Foi realizada a Multiplex-PCR utilizando o DNA extraído segundo Kaclíková et al. (2003) de um crescimento em caldo BHI. Os resultados seguem abaixo:

Quadro 44 – Multiplex-PCR de isolados obtidos de amostra de queijo minas frescal, controle positivo e negativo (Marca F)

AMOSTRAS	RESULTADO
F26	370 pb + bandas não-características
F27	370 pb + bandas não-características
F28	370 pb
F29	370 pb
F30	370 pb + banda não-característica
C+2 (F)	370 + 691 pb
C -	Sem bandas

Abaixo segue a foto do gel em agarose:

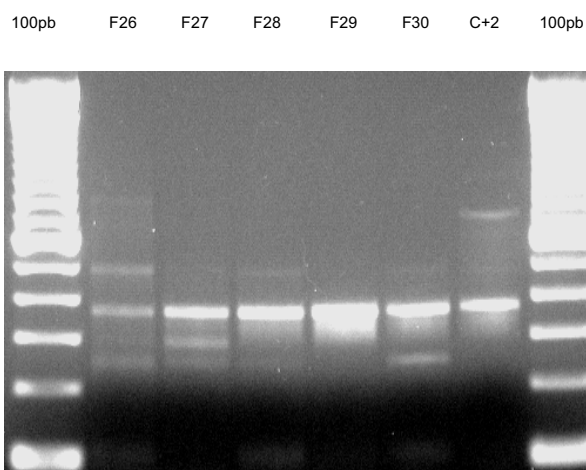


Figura 10 – Gel ilustrativo da amplificação pela Multiplex-PCR do DNA extraído de *Listeria spp.* isoladas de amostra de queijo minas frescal (Marca F), controle positivo 2 e controle negativo. Padrão de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

4.7 Marca A – Caldo Half Fraser e Fraser

4.7.1 – Caldo Half Fraser

Também foi realizada a extração de DNA pelo Kit Qiagen do caldo Half Fraser após 24h de incubação a 30°C:

Quadro 45 - Multiplex-PCR de isolados obtidos de amostra de queijo minas frescal e controles positivos (Marca A) - Caldo Half Fraser

AMOSTRAS	RESULTADO
A1	Sem bandas características
A2	Sem bandas características
A3	370 pb
A4	370 + 691 pb
A5	370 pb
C+1 (A)	370 + 471 + 691pb
C+2 (A)	370 + 471 + 597 + 691pb

100pb A1 A2 A3 A4 A5 C+1 C+2

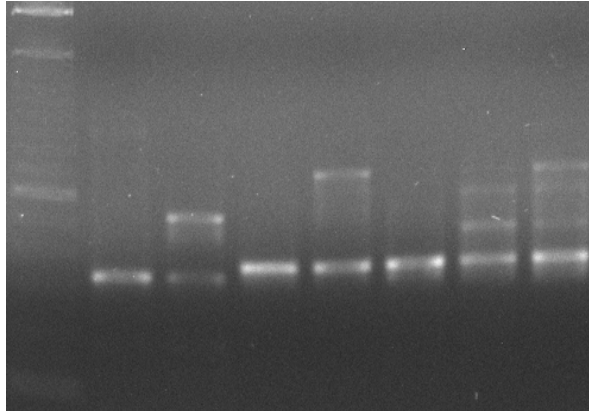


Figura 11 – Gel ilustrativo da amplificação pela Multiplex-PCR do DNA extraído de *Listeria spp.* isoladas de amostra de queijo minas frescal (Marca A) e controles positivos - Caldo Half Fraser. Padrão de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

Para confirmação do resultado foi feito um Simplex-PCR com apenas o par de primer (*Imo0737*) que amplifica a banda 691 pb. Nesta PCR foi observada a mesma banda 691 pb em A4, C+1(A) e C+2 (A).

100pb C+1 C+2 A4 C- 100pb

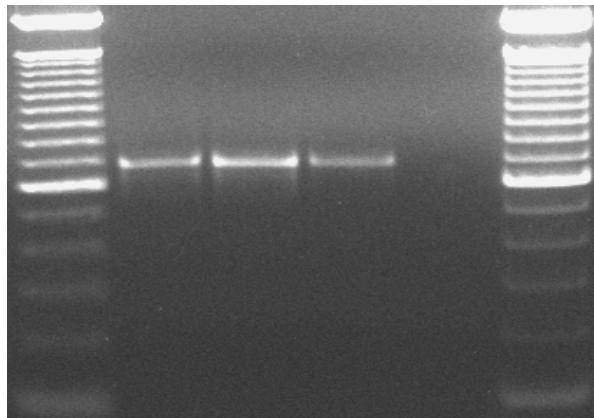


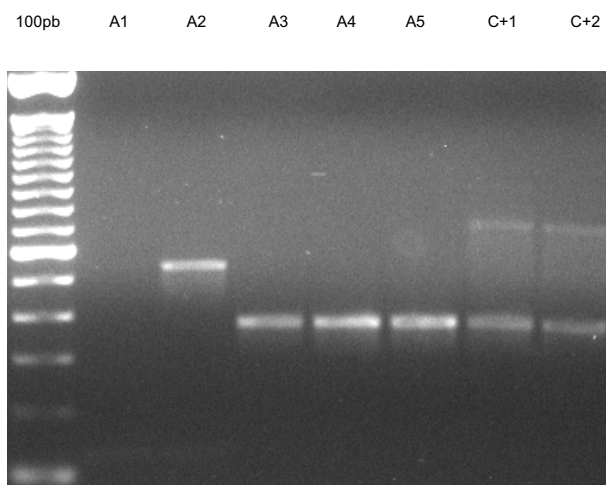
Figura 12 – Gel ilustrativo da amplificação por Simplex-PCR do DNA extraído de *Listeria spp.* isolada de amostra de queijo minas frescal (Marca A), controles positivos e negativo - Caldo Half Fraser. Padrão de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

4.7.2 – Caldo Fraser

Foi realizada a extração de DNA pelo Kit Qiagen do caldo Fraser após incubação:

Quadro 46 - Multiplex-PCR de isolados obtidos de amostra de queijo minas frescal e controles positivos (Marca A) - Caldo Fraser

	MULTIPLEX-PCR
A1	Sem bandas características
A2	Sem bandas características
A3	370 pb
A4	370 pb
A5	370 pb
C+1 (A)	370 + 691pb
C+2 (A)	370 + 691pb



*Figura 13 – Gel ilustrativo da amplificação pela Multiplex-PCR do DNA extraído de *Listeria spp.* isoladas de amostra de queijo minas frescal (Marca A) e controles positivos - Caldo Fraser. Padrão de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).*

4.8 Marca F – Caldo *Half Fraser* e *Fraser*

Foi realizada a extração de DNA do *Half Fraser* e do *Fraser* da marca F segundo o protocolo de Kaclíková et al. (2003). Não houve o visualização de bandas no gel.

OBS: Os resultados de alguns dos ensaios realizados com as Marcas A, B, C, D, E e F encontram-se compilados ao final deste trabalho (Anexo – Itens: 8.16 a 8.22)

4.9 Rotulagem dos queijos

No quadro 47 estão descritas as informações que constavam na rotulagem das embalagens dos queijos, assim como o percentual de amostras com *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*.

Quadro 47 – Informações sobre a rotulagem dos queijos e percentual (%) de amostras com *Listeria spp.*

	<i>MARCA A</i>	<i>MARCA B</i>	<i>MARCA C</i>	<i>MARCA D</i>	<i>MARCA E</i>	<i>MARCA F</i>	%
<i>Listeria spp.</i>	3 amostras	-	1 amostra	-	5 amostras	5 amostras	14 de 30 = 47%
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	5 amostras	-	5 de 30 = 17%
Local de Fabricação	Pouso Alto - MG	Belmiro Braga - MG	Campanha - MG	Aiuruoca - MG	Lagoa Dourada - MG	Miradouro - MG	
Data de Fabricação	04/12/06	05/01/07	08/03/07	09/03/07	29/04/07	05/06/07	
Data de Validade	24/12/06	04/02/07	24/04/07	08/04/07	13/06/07	05/07/07	
Data de Processamento	12/12/06	16/01/07	13/03/07	27/03/07	08/05/07	12/06/07	
Processamento após fabricação	8 dias	11 dias	5 dias	18 dias	9 dias	7 dias	
Supermercado da compra	A	B	A	C	A	C	
Valor nutricional (30 g):							
HC (g)	1	1	1,2	1	1	1	
PTN (g)	6	7	4,8	6	6	5	
GORD. TOTAIS (g)	6	7	4,8	5	5	5	
GORD. SAT. (g)	4	-	3	4	4	3	
COLESTEROL (mg)	20	19	-	-	-	20	
FIBRA (g)	0	0	0	0	0	0	
CÁLCIO (mg)	202	95	-	-	-	210	
FERRO (mg)	0	0	-	-	-	0	
SÓDIO (mg)	160	129	160,2	105	144	160	

5 DISCUSSÃO

Das 30 amostras de queijo minas frescal analisadas, 14 (47%) apresentaram *Listeria* sp., e 5 (17%) apresentaram contaminação por *L. monocytogenes*. Esse resultado está em desacordo com a RDC Nº 12, de 2 de janeiro de 2001, que aprova a Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Esta preconiza ausência de *L. monocytogenes* em 25g de queijo minas frescal. Silva, Hofer e Tibana (1998) encontraram *L. monocytogenes* em 41% das amostras de queijos macios frescos produzidos no Rio de Janeiro. Em 3% das amostras de queijo minas frescal também foi encontrada essa bactéria. Segundo Nero et al. (2004) porém, resultados negativos para esse patógeno devem ser interpretados com cautela, pois podem não refletir a realidade. No estudo desse autor foi encontrada uma alta percentagem de amostras com antimicrobianos e pesticidas, e esses compostos podem inibir o crescimento desse patógeno durante o enriquecimento das amostras, além da intensa competição com a flora que também pode interferir no resultado. Alguns microrganismos podem afetar a eficiência no isolamento do patógeno ou induzir a uma injúria sub-letal, interferindo na sua detecção. E também, os microrganismos que produzem bacteriocina podem inibir o crescimento especialmente a *L. monocytogenes*.

Neste estudo foi observado que queijos estocados de 0-8°C por até 18 dias, dentro do prazo de validade, são estáveis e homogêneos para realização de análises microbiológicas nesse período. Esses dados vão além dos encontrados por Scotter et al. (2001), que obtiveram resultados satisfatórios ao analisar queijos armazenados a 4°C por 7 dias.

De acordo com a rotulagem dos queijos foi verificado que houve crescimento de *Listeria* sp. em amostras com 0,53% de sódio, e *L. monocytogenes* em amostras com 0,48% de sódio. Porém, amostras com baixo teor de sódio, 0,35-0,43% não apresentaram *Listeria* spp. De acordo com a FSAI (2005), *L. monocytogenes* pode crescer a 0,5-16% de sal, podendo sobreviver em ambientes com mais de 20% de sal.

Nas amostras da marca A, como as 45 colônias coletadas (15 do meio Oxford, 15 do meio Palcam e 15 do meio Cromogênico) não apresentaram hemólise, não houve necessidade de prosseguir com o restante dos ensaios

confirmatórios microbiológicos. Até aqui sugere-se que 3 das 5 amostras analisadas, A3, A4 e A5 estejam contaminadas com *Listeria* sp. Com a Multiplex-PCR esse resultado foi confirmado, pois houve o aparecimento da banda 370 pb no gel de agarose, banda comum a todas as espécies de *Listeria* de acordo com Doumith et al. (2004).

Na marca B, foi realizado o teste de hemólise somente na amostra B9 do meio Oxford, pois algumas colônias desta placa apresentaram halo negro. Foram coletadas 10 colônias, que não apresentaram hemólise. Na Multiplex-PCR também não foi visualizado aparecimento de bandas características. Isso indica que nas amostras analisadas dessa marca não há *Listeria* sp. e *L. monocytogenes*.

Foram coletadas 15 colônias da amostra C11 da marca C (5 do meio Oxford, 5 do meio Palcam e 5 do meio Cromogênico). Elas foram submetidas ao teste de hemólise, entretanto não houve formação de halo hemolítico ao redor das estrias. Na Multiplex-PCR não foi observado o aparecimento de bandas. Também foram realizados o teste de motilidade e utilização de carboidratos (glicose e maltose) para confirmação do resultado, pois a amostra C11 do meio Oxford e Palcam apresentou algumas colônias características apesar do teste de hemólise ter sido negativo, e na caracterização molecular (extração por Kačíková) não haver a visualização de bandas no gel de agarose. Segundo Farber e Peterkin (1991), a mobilidade “acrobática” da *Listeria* sp., que ocorre numa estreita faixa de temperatura, se dá devido aos seus flagelos peritríqueos; a flagelina é produzida e se reúne na superfície celular. Koneman et al. (2001) afirma que é característico o desenvolvimento dessa bactéria, em forma de “guarda-chuva”, 2 a 5 mm abaixo da superfície do ágar. Com os resultados observados nesses testes há indicação da presença de *Listeria* sp., conforme descrito pela International Standard ISO 11290-1 (1996). No gel com o DNA extraído com o Kit Qiagen, foi observada a banda 370 pb, característica de *Listeria* sp. Vale ressaltar que segundo Scotter et al (2001), a maioria dos resultados falso-negativo são devido a dificuldade de interpretação das reações de hemólise, o que pode ocorrer mais ainda quando *L. monocytogenes* está presente no alimento em associação com *L. innocua*, e o duplo enriquecimento pode permitir que *L. innocua* se torne dominante.

Nenhuma das amostras da marca D apresentaram colônias

características nos meios de cultura utilizados, por isso não foi realizado o teste de hemólise e os demais testes confirmatórios. Na Multiplex-PCR não houve formação de bandas características de *Listeria* sp. e nem *L. monocytogenes*.

Das 75 colônias coletadas (25 do meio Oxford, 25 do meio Palcam e 25 do meio Cromogênico) das amostras da marca E, todas apresentaram halo de hemólise característico. De acordo com Farber e Peterkin (1991), algumas espécies de *Listeria* expressam beta-hemolisina, produzindo uma zona clara no ágar sangue; a expressão dessa listeriolisina O é reconhecida como o maior fator de virulência. Koneman et al. (2001) afirma que as colônias que crescem em ágar sangue são pequenas, translúcidas e acinzentadas; a maioria das cepas produz um estreito halo de beta-hemólise que usualmente não se difunde muito além das bordas. A formação de “guarda-chuva” no teste de motilidade, teste de catalase positivo (formação imediata de bolhas de gás) e coloração característica de Gram + indicam a presença de *Listeria* sp. No teste dos carboidratos, a utilização de glicose, maltose (meio roxo para amarelo) indica presença de *Listeria* sp., e ramnose (meio roxo para amarelo) indica presença de *L. monocytogenes*. A não-utilização da xilose e manitol também sinaliza a presença de *L. monocytogenes*. Tais resultados estão de acordo com International Standard ISO 11290-1 (1996). Apesar do resultado ter sido negativo para alguns inoculados da amostra 22, conforme descrito nos resultados deste estudo, esta amostra possui *Listeria* sp. e *L. monocytogenes*. Na Multiplex-PCR foi verificada a presença de bandas características de *Listeria* sp. (370 pb) e *L. monocytogenes* (471 pb). Enfim, pode-se considerar que todas as amostras da marca E são positivas para *L. monocytogenes*.

Foram coletadas 55 colônias (25 do meio Oxford, 5 do meio Palcam e 25 do meio Cromogênico) das amostras da marca F. Destas, nenhuma apresentou halo de hemólise. Foram realizados teste de motilidade e utilização de carboidratos para confirmação do resultado, pois houve dúvida na interpretação do teste das amostras, apesar de aparentemente somente os controles terem apresentado hemólise. Na motilidade, todos os inoculados apresentaram formação de “guarda-chuva”, indicando presença de *Listeria* sp. Na utilização de carboidratos, a alteração do meio (roxo para amarelo) para todas as colônias e para glicose e maltose, também indica presença de *Listeria* sp. Como para os demais açúcares (xilose, ramnose e manitol) não foi observado

alteração do meio, e que na amostra 26.2 Palcam não houve utilização de ramnose, isso mostra que não há presença de *L. monocytogenes* nas amostras dessa marca. Na Multiplex-PCR houve visualização somente da banda 370 pb, característica de *Listeria* sp.

Vale ressaltar que as colônias sem formação de halo opaco do meio cromogênico também foram coletadas quando havia formação de colônias características no meio Oxford e Palcam, pois o meio cromogênico estava sendo testado pela primeira vez no laboratório.

Com a extração de DNA pelo Kit Qiagen do caldo Half Fraser após 24h de incubação a 30°C da marca A, foi constatado que o resultado obtido foi diferente de quando a extração foi feita do BHI de acordo com Kaclíková et al. (2003). Com a extração com o Kit é possível visualizar uma banda característica de *L. monocytogenes* (691 pb) na amostra A4 do Half Fraser. Para confirmação do resultado foi feito um Simplex-PCR com apenas o par de primer (*Imo0737*) que amplifica a banda 691 pb. Nesta PCR foi observada a mesma banda 691 pb em A4, C+1(A) e C+2 (A), o que ratifica o resultado encontrado anteriormente.

Já com a extração de DNA pelo Kit Qiagen do caldo Fraser após 24h de incubação da marca A, o resultado encontrado foi igual ao obtido com a extração de DNA do BHI feita de acordo com Kaclíková et al. (2003), apesar das bandas 471 e 597 pb do C+1 não aparecerem.

Sendo verificada a presença de *L. monocytogenes* no Half Fraser, mas não no Fraser e no BHI, pois a banda 691 pb não aparece no gel, significa que havia *L. monocytogenes* no queijo, mas não se pode garantir que ela estava viva ou morta no experimento. Supõe-se que ela estava morta, pois não cresceu quando foi colocada em vários meios enriquecidos, porque se ela tivesse se multiplicado, teria sido observada no Fraser e no BHI. Mesmo assim demonstra perigo para saúde pública, pois poderia estar viva quando esse queijo contaminado fosse ingerido por algum consumidor. Farber e Peterkin (1991) afirmam em seu estudo que níveis de *L. monocytogenes* tão altos como 10^7 UFC/g tem sido encontrados em alguns queijos naturalmente contaminados. Com esses resultados então, pode-se concluir que é possível realizar extração de DNA diretamente do queijo. Vale destacar aqui que no

estudo de Kaclíková et al. (2003), o enriquecimento antes da PCR aumenta a janela de detecção, o que facilita a detecção de 10^0 UFC de *L. monocytogenes*/amostra, sem o perigo de falso-positivo originado pela detecção de células mortas. A vantagem é conseguida devido ao uso de PCR sensível, permitindo um enriquecimento *overnight* eficiente e envolvendo a diluição do alimento num fator de 10^5 . Por causa da múltipla diluição da amostra durante o enriquecimento, as células mortas não são detectadas.

Seguindo o protocolo de Kaclíková et al. (2003), a extração de DNA do Half Fraser e do Fraser da marca F foi realizada, e não houve a visualização de bandas no gel. Por isso conclui-se que essa metodologia de extração não é eficaz para Half Fraser e Fraser. Lembrando que a marca F apresentou *Listeria* sp. nas 5 amostras cujo DNA foi extraído do crescimento em BHI de acordo com o mesmo autor. É importante ressaltar que o autor indica que a extração deve ser realizada pós-enriquecimento. E com a extração com o Kit Qiagen é possível verificar a presença dessa bactéria logo no início do experimento, ou seja, ainda na etapa de enriquecimento.

A extração de DNA realizada no meio de enriquecimento primário (Half Fraser) e secundário (Fraser) da marca A poderia ser feita em qualquer ou em todas as marcas, optou-se por tal procedimento somente para verificar se o mesmo seria possível, ou seja, se seria viável extrair o DNA diretamente desta etapa sem a necessidade de prosseguir com as outras etapas, porém como esse não é um dos objetivos deste estudo, esse procedimento não foi repetido para as demais marcas.

A procedimento de extração de DNA baseando-se no Kit Qiagen poderia ser feita em qualquer etapa do experimento, porém optou-se pela de Kaclíková et al. (2003), pois além de seguir a metodologia do artigo, esta é menos laboriosa, requer um menor tempo, é mais barata e também eficaz, como foi comprovado pelo autor e por este próprio estudo. Entretanto a extração pelo Kit pode ser utilizada em casos de dúvida, onde suponha-se que extração de Kaclíková et al. (2003) não tenha sido eficiente. Durante este estudo porém, verificou-se que a qualidade do DNA observado no gel obtido com a extração pelo Kit é mais nítida que a obtida pela extração do artigo.

Nas amostras analisadas, o meio de enriquecimento seletivo utilizado (caldo Fraser) apresentou coloração amarelo a marrom. Segundo a International Standard ISO 11290-1 (1996) o caldo Fraser deve apresentar uma coloração preta desenvolvida durante a incubação. De acordo com Fraser e Sperber (1988), isso se dá porque todas as espécies de *Listeria* hidrolisam esculina, devido a adição de íons férrico no meio de cultura. Esse íons reagem com o produto da hidrólise da esculina, 6,7-dihidroxicumarina, para formar um precipitado preto. Havendo *Listeria* presente, a cultura fica enegrecida. E culturas que não ficam pretas são julgadas como livres de *Listeria*. Como a *Listeria* spp. não é a única a promover a reação ferro-esculina, a seletividade é provida pela presença do cloreto de lítio, ácido nalidíxico e acriflavina na fórmula. De acordo com Farber e Peterkin (1991), o citrato férrico amoniacal é usado para detectar a hidrólise de esculina já presente no meio. E o caldo Fraser usado como meio de enriquecimento aumenta a recuperação da *Listeria* spp. em cerca de 6%. Scotter et al. (2001) afirma em seu estudo, que sendo o nível de inóculo alto, há maior probabilidade o 1º e 2º enriquecimentos serem positivos (apresentarem coloração escura), porém quando nível de inóculo é baixo, há maior probabilidade de o 1º ser positivo e o 2º negativo. De acordo com Gasanov, Hughes, Hansbro (2005), embora os agentes seletivos sejam necessários para inibir a flora competidora durante o enriquecimento no meio Fraser, existem algumas evidências que apontam para efeitos perigosos desses agentes sobre as células estressadas ou injuriadas de *Listeria*. Por isso a ISO11290-1 preconiza um enriquecimento primário com a metade da concentração dos agentes seletivos (em Half Fraser), o que aumentaria a capacidade das células crescerem e se repararem nesse meio.

No presente estudo foram utilizados 3 tipos de meios de cultura: Oxford, Palcam (ambos preconizados pela ISO 11290-1, 1996) e o Cromogênico da Oxoid. Scotter et al. (2001), em seu trabalho, sugere que seja utilizado outro meio de cultura que possa diferenciar *L. monocytogenes* de outras espécies, principalmente de *L. innocua*, pois quando a *L. monocytogenes* ocorre com *L. innocua* é possível que a primeira não seja detectada devido ao supercrescimento da segunda durante o enriquecimento seletivo que pode mascarar a presença de *L. monocytogenes* nos dois meios de cultura Oxford e Palcam. Lin et al. (2006) aborda em seu estudo que apesar do ágar Oxford ser

recomendado por *U.S. Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (BAM)* para isolar *L. monocytogenes* de queijo, esse meio é incapaz de diferenciar essa espécie de outras do mesmo gênero *Listeria*. Então outros meios devem ser comparados com o Oxford. Gasanov, Hughes, Hansbro (2005) por sua vez, afirmam que os meios cromogênicos são simples, custo efetivo, fácil de interpretar, com alta sensibilidade e especificidade. E Greenwood et al. (2005) sinalizam que vários tipos de ágar cromogênico têm sido disponibilizados comercialmente com objetivo de reduzir o tempo para se obter resultados, e distinguir entre espécies de *Listeria* patogênicas e não-patogênicas.

As colônias dos meios Oxford e Palcam se apresentaram isoladas, esverdeadas, com centro afundado e halo negro, o que vai de acordo com International Standard ISO 11290-1 (1996), onde é descrito que após 48 h de incubação, as colônias do meio Oxford ficam negras com brilho esverdeado, halos pretos e centros rebaixados, assim como as colônias do meio Palcam que se apresentam verdes, com depressão central e circundadas com halo preto. Segundo Gasanov, Hughes, Hansbro (2005), a reação da esculinase que ocorre nos meios Oxford e Palcam é baseada na atividade da beta-D-glucosidase em diferenciar *Listeria* de outras bactérias. Já as colônias características de *L. monocytogenes* do meio cromogênico apresentaram-se azuis e com halo opaco. Apesar do resultado só ter sido verificado após 48h de incubação, pois as placas foram incubadas às sextas-feiras, o estudo de Greenwood et al. (2005) garante que após 24h já é possível a identificação de presumíveis colônias de *L. monocytogenes*, o que é uma vantagem desse meio cromogênico. Segundo o fabricante (OXOID, 2007), o ágar cromogênico provém o isolamento, enumeração e identificação de espécies de *Listeria*, assim como diferencia a *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* de outras espécies de *Listeria*. O X-glucosídeo cromogênico presente no meio é clivado pela enzima beta-glucosidase, comum a todas as espécies de *Listeria*, resultando em colônias azuis/verdes visíveis e claras. Outros microrganismos que também possuem essa enzima são inibidos pelos agentes seletivos (cloreto de lítio, ácido nalidíxico e polimixina B) presentes. Além disso, a fosfolipase da *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* patogênica hidrolisa lecitina e produz um halo opaco em redor da colônia. Estudos mostram que esse meio de cultura é

superior ao meio Oxford e Palcam para isolamento de *L. monocytogenes*. De acordo com Gasanov, Hughes, Hansbro (2005) a fosfatidilinositol-específica fosfolipase C é uma enzima que é produzida somente por *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*, sendo a atividade da enzima medida usando o meio cromogênico.

Comparando os três meios de cultura pode-se dizer que o cromogênico é o mais sensível para isolar *L. monocytogenes* de queijo minas frescal. A presença ou não de colônias características, que são grandes e fáceis de serem identificadas, o aparecimento ou não do halo opaco, torna o meio cromogênico o mais aplicável. Os meios Oxford e Palcam são sensíveis a qualquer espécie de *Listeria*, sendo necessária a utilização de ensaios posteriores para confirmação do resultado. Com os resultados obtidos nesse estudo, pode-se até dizer que o uso do meio cromogênico isenta da obrigação de ensaios confirmatórios, visto que os resultados positivos encontrados, onde houve formação de halo opaco, foram confirmados com testes bioquímicos, morfológicos e na biologia molecular.

Os testes confirmatórios realizados: hemólise, motilidade, utilização de carboidratos, catalase, coloração de Gram foram eficazes para a finalidade a qual se propõem, porém além de requererem meios/soluções específicos, os resultados são, de uma forma geral, demorados e precisam de uma maior experiência do laboratorista/manipulador para interpretação correta dos resultados. De acordo com Scotter et al. (2001), se um grande número de colônias suspeitas forem selecionadas, é permitida uma flexibilidade no uso dos testes confirmatórios, sendo então a coloração de Gram, motilidade e o teste CAMP considerados opcionais.

Com os resultados obtidos, observou-se quando havia formação de colônias características de *Listeria* sp. nos três meios de cultura, esse resultado era corroborado pelo surgimento da banda 370pb na biologia molecular. Na amostra B9 do meio Oxford, entretanto, houve dificuldade de interpretação do resultado, sugerindo possíveis colônias características que não foram confirmadas pela biologia molecular, o que fez com que se despendesse tempo e material devido a esse resultado supostamente positivo. A amostra F26, por sua vez, apresentou colônias susceptíveis somente no meio Palcam, enquanto todas as amostras, da marca F, dos demais meios apresentaram colônias características que foram confirmadas também pela Multiplex-PCR.

Apesar dessas falhas que indicam uma menor sensibilidade e dificuldade de interpretação dos meios Oxford e Palcam, pode-se dizer que foi possível isolar a *L. monocytogenes* nos três meios de cultura utilizados. No estudo de Herman, Ridder e Vlaemynck (1995), a Multiplex-PCR também foi comparada com a identificação bacteriológica clássica usando amostras de indústrias leiteiras e fábricas de queijo. Sessenta e quatro das 113 amostras analisadas apresentaram colônias características de *Listeria* sp. na caracterização fenotípica, e esse resultado foi confirmado pela Multiplex-PCR. Entretanto Cocolin et al. (2002) analisaram 99 cepas, encontrando divergência de 9 resultados da caracterização fenotípica para molecular, enquanto a identificação bioquímica apontava para *L. monocytogenes*, a identificação molecular sinalizava *L. innocua*, demonstrando falso-positivos quando se utiliza a caracterização fenotípica.

A extração do DNA foi realizada conforme Kaclíková et al. (2003), o que foi eficaz para as amostras e controles positivos, sendo possível a amplificação do DNA de *Listeria* sp. e *L. monocytogenes*. Entretanto a extração da amostra C11 não foi eficaz, não havendo amplificação de bandas no gel de agarose. Porém com a extração feita com o Kit Qiagen, foi possível a visualização da banda 370 pb no gel.

Com a técnica Multiplex-PCR descrita por Doumith et al. (2004) foi possível identificar *Listeria* sp. e *L. monocytogenes*, e diferenciar este patógeno em principais grupos de sorotipos. O aparecimento da banda 370 pb em A3, A4, A5, C11, F26, F27, F28, F29, F30 indica presença de *Listeria* sp. nas amostras analisadas, indicando porém que as mesmas estariam próprias para o consumo pois a legislação vigente não aborda a presença ou ausência de *Listeria* sp. O surgimento das bandas 370 pb e 471 pb em E21, E22, E23, E24, E25 indica presença de *L. monocytogenes* de um ou mais sorotipos a seguir: 1/2b, 3b, 4b 4d, 4e. De acordo com o mesmo autor cerca de 95% das cepas isoladas de alimentos são dos sorotipos: 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b. Logo, conclui-se os sorotipos encontrados são aqueles mais comumente envolvidos em casos de listeriose. Porém com a M-PCR realizada neste trabalho, baseado no trabalho de Doumith et al. (2004), não há distinção de alguns sorotipos de outros, dentro das espécies de *L. monocytogenes*, como visto aqui, não podemos afirmar que o sorotipo encontrado foi exatamente 1/2b, 3b ou 7. Mas

segundo o mesmo autor, o sorotipo 7 é infrequente em alimentos e raramente reportado como implicado em listeriose humana. De acordo com Silva et al. (2001), nas amostras analisadas de queijo minas frescal comercializados na cidade do Rio de Janeiro, os sorotipos mais comuns encontrados foram: 1/2a e 4b, sendo estes também os que possuem um maior número de fatores de virulência. Segundo Furlanetto et al. (1996) apud Silva et al. (2001), foi detectado a presença do sorotipo 4b em queijo minas frescal manufaturado no Brasil. Enfim, pode-se dizer que no presente estudo, o lote da marca E pode ser considerado inaceitável para o consumo humano, de acordo com a legislação vigente que preconiza ausência desse microrganismo em 25 g de alimento analisado.

Destaca-se ainda o tempo dispendido em cada metodologia de análise realizada neste trabalho. Seguindo o método de Scotter et al. (2001), que se baseia na norma ISO11290-1, é necessário cerca de 15 dias para comprovar se há ou não presença de *L. monocytogenes* na amostra. Já de acordo com a técnica de Kaclíková et al. (2003), em 4 dias já se define se há *L. monocytogenes* presente na amostra e quais os possíveis grupos de sorotipos envolvidos na contaminação. De acordo com Greenwood et al. (2005), com a metodologia baseada na ISO11290-1, é difícil ser pró-ativo para prevenir o consumo de alimento contaminado, e evitar que vários alimentos prontos, com pequena vida de prateleira, sejam consumidos antes dos resultados microbiológicos estarem disponíveis. Em virtude disso, e também porque os resultados obtidos na caracterização fenotípica foram ratificados pela caracterização molecular, não foi realizada a etapa de extração de DNA e Multiplex-PCR após os testes bioquímicos, fisiológicos e morfológicos, na linha de pesquisa de Scotter et al. (2001).

6 CONCLUSÕES

- Em 47% das amostras de queijo minas frescal analisadas neste estudo foi encontrado *Listeria* spp.;

-17% das amostras, todas da mesma marca, apresentaram *Listeria monocytogenes*, por isso são consideradas impróprias para consumo de acordo com a legislação brasileira;

-O melhor meio de cultura que pode ser utilizado para esse tipo de análise é o Cromogênico, por diferenciar *L. monocytogenes* juntamente com *L. ivanovii* de outras espécies de *Listeria*.

-A técnica de extração de DNA preconizada por Kaclíková et al. (2003) e a do Kit foram eficazes. Entretanto, o uso do Kit apresentou uma melhor eficácia na extração de DNA nas amostras de queijo minas frescal analisadas neste trabalho.

-A utilização desta técnica descrita por Doumith et al. (2004) na detecção de *L. monocytogenes* isolada de queijo minas frescal é viável, e de acordo com a mesma a *L. monocytogenes* isolada pertence ao grupo dos sorovares 1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e, sendo que provavelmente o sorovar encontrado nas amostras analisadas é o 1/2b e/ou 3b.

-Tanto a caracterização fenotípica quanto a molecular foram eficazes na identificação de *L. monocytogenes*, porém foi verificado que a primeira requer mais tempo para obtenção de resultados conclusivos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; KAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. Tecnologia do DNA Recombinante. In: _____. **Biologia Molecular da Célula**. 3 ed. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul Ltda., 1997a, cap. 7, p. 291-334.

_____. O Citoesqueleto. In: _____. _____. 3 ed. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul Ltda., 1997b, cap. 16, p. 786-861.

ALLERBERGER, F. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 35, p. 183-189, 2003.

BERVELY, J. M.; BEATTIE, S. E. Food Safety: Emerging Trends in Foodborne Illness Surveillance and Prevention. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 104, p. 1708-1717, 2004.

BLANCOU, J.; CHOMEL, B. B.; BELOTTO, A.; MESLIN, F. X. Emerging or re-emerging bacterial zoonoses: factors of emergence, surveillance and control. **Veterinary Research**, v. 36, p. 507 – 522, 2005.

BORUCKI, M. K.; CALL, D. R. *Listeria monocytogenes* Serotype Identification by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5537-5540, 2003.

BORUCKI, M. K.; REYNOLDS, J.; CALL, D. R.; WARD, T. J.; PAGE, B.; KADUSHIN, J. Suspension Microarray with Dendrimer Signal Amplification Allows Direct and High-Throughput Subtyping of *Listeria monocytogenes* from Genomic DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 3255-3259, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 15 fev. 2006.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC Nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br>>. Acesso em: 20 out. 2005.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC Nº 275, de 21 de outubro de 2002. Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 out. 2003. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br>>. Acesso em: 18 fev. 2005.

BRASIL. Congresso Nacional. Lei nº 8080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 1990. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br>>. Acesso em: 10 mar. 2006.

BRASIL. **Constituição da República Federativa do Brasil**. Título VIII. Seção II. Brasília, DF: Senado, 1988.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA). Portaria nº 352, de 4 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, set. 1997a. Disponível em: <<http://www.cda.sp.gov.br/www/legislacoes>>. Acesso em: 20 out. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria MS Nº 1428, de 26 de novembro de 1993. Aprova o Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos, Diretrizes para o Estabelecimento de Boas Práticas de Produção e de Prestação de Serviços na Área de Alimentos, Regulamento Técnico para o Estabelecimento de Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ's) para Serviços e Produtos na Área de Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2 dez. 1993. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br>>. Acesso em: 18 fev. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria SVS/MS Nº 326, de 30 de julho de 1997. Aprova o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 01 ago. 1997b. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br>>. Acesso em: 18 fev. 2005.

BRASIL. Congresso Nacional. Lei nº 9782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional da Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 jan. 1999. Disponível em: <<http://www.senado.gov.br>>. Acesso em: 1 fev. 2005.

BUBERT, A., HEIN, I.; RAUNCH, M.; LEHNER, A.; YOON, B.; GOEBEL, W.; WAGNER, M. Detection and Differentiation of *Listeria* spp. by a Single Reaction Based on Multiplex PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4688-4692, 1999.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E.coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios no estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 281-287, 2001.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Department of Health and Human Services. Division of Bacterial and Mycotic Diseases. **Listeriosis**. 2005. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/listeriosis_g.htm>. Acesso em: 23 out. 2005.

COCOLIN, L.; RANTSIOU, K.; IACUMIN, L.; CANTONI, C.; COMI, G. Direct Identification in Food Samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by Molecular Methods. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 6273-6282, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 15 fev. 2006.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (CEC). Commission Recommendation of 19 December 2003 concerning a coordinated programme for the official control of foodstuffs for 2004. **Official Journal of the European Union**, 2004. Disponível em: <<http://europa.eu.int/eur-lex.pdf>>. Acesso em: 21 out. 2005.

CONSELHO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS (CCE), **DIRECTIVA 92/46/CEE DO CONSELHO**, de 16 de junho de 1992 que adota as normas sanitárias relativas à produção de leite cru, leite tratado termicamente e produtos à base de leite e à sua colocação no mercado. Disponível em: <<http://europa.eu.int/legislacao>>. Acesso em: 21 out. 2005.

COSTA, E. A. Vigilância Sanitária: proteção e defesa da saúde. In: ROUQUAYROL, M. Z.; ALMEIDA FILHO, N. **Epidemiologia & Saúde**. 6 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, p. 357-387, 2003.

_____. Elementos teóricos para o estudo da vigilância sanitária. In: COSTA, E. A. **Vigilância Sanitária: proteção e defesa da saúde**. São Paulo: Sobravime, p. 67-98, 2004.

DALLARI, S. G. Vigilância Sanitária, Direito e Cidadania. In: Conferência Nacional de Vigilância Sanitária. **Cadernos de Textos**. Brasília, Anvisa, 2001.

DOUMITH, M.; BUCHRIESER, C.; GLASER, P.; JACQUET, C.; MARTIN, P. Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3819-3822, 2004.

DOUMITH, M.; JACQUET, C.; GERNER-SMIDT, P.; GRAVES, L. M.; LONCAVERIC, S.; MATHISEN, T.; MORVAN, A.; SALCEDO, C.; TORPDAHL, M.; VASQUEZ, J. A.; MARTIN, P. Multicenter Validation of a Multiplex PCR Assay for Differentiating the Major *Listeria monocytogenes* Serovars 1/2a, 1/2b, 1/2c, and 4b: Toward an International Standard. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 12, p. 2648-2650, 2005.

DREVETS, D. A.; LEENEN, P. J. M.; GREENFIELD, R. A. Invasion of the Central Nervous System by Intracellular Bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 323-347, 2004.

EU - EUROPEAN UNION. **Trends and sources of zoonotic agents in the European Union and in Norway**, 2001. Disponível em: <<http://europa.eu.int/comm/food>>. Acesso em: 21 out. 2005.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 55, n. 3, p. 476-511, 1991.

FDA / CFSAN - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION / CENTER FOR FOOD SAFETY & APPLIED NUTRITION. **Bacterial Analytical Manual – BAM (Online)**. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. Chapter 10. 2003. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov>>. Acesso em: 29 out. 2005.

FDA / CFSAN - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION / CENTER FOR FOOD SAFETY & APPLIED NUTRITION. **Bad Bug Book**. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. *Listeria monocytogenes*. 2004. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov>>. Acesso em: 23 out. 2005.

FDA / CFSAN; USDA / FSIS; CDC. Quantitative Assessment of Relative Risk to Public Health from Foodborne *Listeria monocytogenes* Among Selected Categories of Ready-to-Eat Food. **FOOD SAFETY**, 2003. Disponível em: <<http://www.foodsafety.gov>>. Acesso em: 23 out. 2005.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 23 (supl), p. 162-165, 2003.

FRASER, J. A.; SPERBER, W. H. Rapid Detection of *Listeria* spp. in Food and Environmental Samples by Esculin Hydrolysis. **Journal of Food Protection**, v. 51, n. 10, p. 762-765, 1988.

FREITAS, E. I. **Detecção de genes de enteroxinas de *Staphylococcus* spp. isolados de queijo minas frescal**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2005. 106p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro.

FRÖDER, H. **Emprego de um método molecular para avaliar a presença de *Listeria monocytogenes* em saladas de hortaliças folhosas minimamente processadas**. São Paulo: USP, 2005. 93 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>> . Acesso em: 12 fev. 2006.

FSAI - FOOD SAFETY AUTHORITY OF IRELAND. **The Control and Management of *Listeria monocytogenes* Contamination of Food**. 2005. Disponível em: <http://www.fsai.ie/publications/report/listeria_report.pdf>. Acesso em: 23 out. 2005.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 19 out. 2006.

GANDRA, E. A. **Multiplex-PCR para detecção de S.aureus, S.intermedius, S.hyicus em leite UHT artificialmente contaminado. Rio Grande do Sul:** Rio Grande do Sul: 2006. 81 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas (UFP), Pelotas (RS). Disponível em: <<http://www.ufpel.edu.br>>. Acesso em: 16 set. 2006.

GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P. M. Methods for isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Reviews**. Publicado por Elsevier B. V. xxx (2005) xxx-xxx.

GRAY, M.; ZADOKS, R. N.; FORTES, E. D.; DOGAN, B.; CAI, S.; CHEN, Y.; SCOTT, V. N.; GOMBAS, P. E.; BOOR, K. J.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* Isolates from Foods and Humans Form Distinct but Overlapping Populations. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 5833-5841, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 15 fev. 2006.

GREENWOOD, M.; WILLIS, C.; DOSWELL, P.; ALLEN, G.; PATHAK, K. Evaluation of chromogenic media for the detection of *Listeria species* in food. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 1340–1345, 2005. Disponível em: <<http://www.blackwell-synergy.com>>. Acesso em: 7 jan. 2008.

GUILBAUD, M.; COPPET, P. de; BOURION, F.; RACHMAN, C.; PREVOST, H.; DOUSSET, X. Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* in Biofilms by Real-Time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2190-2194, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 15 fev. 2006.

HERMAN, L. M. F., RIDDER, H. F. M, VLAEMYNCK, G. M. M. A Multiplex PCR Method for the Identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in Dairy Samples. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 8, p. 867-872, 1995.

IFT - INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. Society for Food Science and Technology. Scientific Status Summary. **Bacteria Associated with Foodborne Diseases**, 2004.

INTERNATIONAL STANDARD ISO 11290-1 / 1ª Edição. **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *L. monocytogenes***. Part 1: Detection method; 1996-12-15.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. Bacilos Gram-Positivos Não-Esporulados: *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Listeria* e *Erysipelothrix*. In: _____. **Microbiologia Médica**. 18 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., cap. 13, p. 156-160, 1991.

KACLÍKOVÁ, E.; PANGALLO, D.; DRAHOVSKÁ, H.; ORAVCOVÁ, K.; KUCHTA, T. Detection of *Listeria monocytogenes* in food, equivalent to EN ISO 11290-1 or ISO 10560, by a three-days polymerase chain reaction-based method. **Food Control**, v. 14, p. 175-179, 2003.

KAWASAKI, S.; HORIKOSHI, N.; OKADA, Y.; TAKESHITA, K.; SAMESHIMA, T.; KAWAMOTO, S. Multiplex PCR for Simultaneous Detection of *Salmonella* spp.; *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in Meat Samples. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 3, p. 551-556, 2005.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**, 2001, 5 ed., RJ/SP/MG: Medsi, 1465 p.

LAKE, R.; HUDSON, A.; CRESSEY, P.; NORTJE, G. **Risk profile: *Listeria monocytogenes* in processed ready-to-eat meats**. Institute of Environmental Science & Research Limited, Christchurch Science Centre. 2002. Disponível em: <<http://www.nzfsa.govt.nz>>. Acesso em: 07 out. 2006.

LATORRE, L.; PARISI, A.; FRACCALVIERI, R.; NORMANNO, G.; LA PORTA, M. C.; GOFFREDO E.; PALAZZO, L.; CICCARESE, G.; ADDANTE, N.; SANTAGADA, G. Low prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods from Italy. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 6, p. 1507-12, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmed.gov>>. Acesso em: 07 nov. 2007.

LIN, C. M.; ZHANG, L.; DOYLE, M. P.; SWAMINATHAN B. Comparison of media and sampling locations for isolation of *Listeria monocytogenes* in queso fresco cheese. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 9, p. 2151-2156, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 14 mar. 2007.

LISITA, M. O. **Evolução da população bacteriana na linha de produção do queijo minas frescal em uma indústria de laticínios**. São Paulo: USP, 2005. 61 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, São Paulo. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>> . Acesso em: 05 fev. 2006.

LUCHESE, G. A. A Vigilância Sanitária no Sistema Único de Saúde. 1ª Conferência Nacional de Vigilância Sanitária. **Cadernos de Textos**. Brasília, Anvisa, 2001.

LUKINMAA, S.; NAKARI, U. M.; EKLUND, M.; SIITONEN, A. Application of the molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens. **APMIS**, v. 112, p. 908-929, 2004.

NAKAMA, A.; MATSUDA, M.; ITOH, T.; KANEUCHI, C. Molecular Typing of *Listeria monocytogenes* Isolated in Japan by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 60, n. 6, p. 749-752, 1998.

NELSON, K. E.; FOUTS, D. E.; MONGODIN, E. F.; RAVEL, J.; DEBOY, R. T.; KOLONAY, J. F.; RASKO, D. A.; ANGIUOLI, S. V.; GILL, S. R.; PAULSEN, I. T.; PETERSON, J.; WHITE, O.; NELSON, W. C.; NIERMAN, W.; BEANAN, M. J.; BRINKAC, L. M.; DAUGHERTY, S. C.; DODSON, R. J.; DURKIN, A. S.; MADUPU, R.; HAFT, D.H.; SELENGUT, J.; VAN AKEN, S.; KHOURI, H.; FEDOROVA, N.; FORBERGER, H.; TRAN, B.; KATHARIOU, S.; WONDERLING, L. D.; UHLICH, G. A.; BAYLES, D. O.; LUCHANSKY, J. B.; FRASER, C. M. Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 8,

p. 2386-2395, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 15 fev. 2006.

NERO, L. A. ***Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção.** São Paulo: USP, 2005. 141 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>>. Acesso em: 12 fev. 2006.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R. de; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; NETTO, D. P.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J. De; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Hazards in no-pasteurized milk on retail sale in Brazil: Prevalence of *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* and chemical residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 211-215, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 15 fev. 2006.

NIGHTINGALE, K. K.; WINDHAN, K.; WIEDMANN, M. Evolution and Molecular Phylogeny of *Listeria monocytogenes* Isolated from Human and Animal Listeriosis Cases and Foods. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 16, p. 5537-5551, 2005. Disponível em: <<http://www.jb.asm.org>>. Acesso em: 9 nov. 2006.

OLIVIERI, D. A. **Avaliação da qualidade microbiológica de amostras de mercado de queijo mussarela, elaborado a partir de leite de búfala (*Bubalus bubalis*).** São Paulo: USP, 2004. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba – São Paulo. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>>. Acesso em: 12 fev. 2006.

OLSEN, J. E. DNA-based methods for detection of food-borne bacterial pathogens. **Food Research International**, v. 33, p. 257-266, 2000.

OXOID. **Dehydrated Culture Media. Chromogenic Listeria Agar.** 2007. Disponível em: <<http://www.oxid.com>>. Acesso em: 9 mai. 2007.

RAMASWAMY, V.; CRESENCE, V. M.; REJITHA, J. S.; LEKSHMI, M. U.; DHARSANA, K. S.; PRASAD, S. P.; VIJILA, H. M. *Listeria*: review of epidemiology and pathogenesis. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 40, p. 4-13, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 07 nov. 2007.

RANTHUM, M.A. **Subnotificação e alta incidência de doenças veiculadas por alimentos e seus fatores de risco: causas e consequências no município de Ponta Grossa – Paraná**. 2004. Rio de Janeiro: ENSP. Dissertação (Mestrado). 97 p. Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz (RJ). Disponível em: <<http://teses.cict.fiocruz.br>>. Acesso em: 28 out. 2006.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; HERNÁNDEZ, M.; VÁSQUEZ-BOLAND, J. A.; SCORTTI, M.; ESTEVE, T. Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by Real-Time PCR: Assessment of *hly*, *iap*, and *lin02483* Targets and AmpliFluor Technology. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 1366-1377, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 15 fev. 2006.

SCALCO, A. R. **Proposição de um Modelo de Referência para Gestão da Qualidade na Cadeia de Produção de Leite e Derivados**. 2004. Tese (Doutorado em Engenharia de Produção) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos. Disponível em: <<http://www.bdttd.ufscar.br>>. Acesso em: 26 fev. 2006.

SCOTTER, S. L.; LANGTON, S.; LOMBARD, B.; SCHULTEN, S.; NAGELKERKE, N.; IN'T VELD, P. H.; ROLLIER, P.; LAHELLEC, C. Validation of ISO method 11290 Part 1 – Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 295-306, 2001.

SILVA, I. M. M.; ALMEIDA, R. C. C.; ALVES, M. A. O.; ALMEIDA, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of

Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, p. 241-248, 2003.

SILVA, M. C. D.; DESTRO, M. T.; HOFER, E.; TIBANA, A. Characterization and evaluation of some virulence markers of *Listeria monocytogenes* strains isolated from Brazilian cheeses using molecular, biochemical and serotyping techniques. **International Journal of Food Microbiology**, v. 63, p. 275-280, 2001.

SILVA, M. C.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 3, p. 354-356, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 14 mar 2007.

SWAMINATHAN, B. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food Microbiology – Fundamental and Frontiers**. 2 ed. Washington, DC. ASM Press, cap. 18, p. 383-409, 2001.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999, 586 p.

UEDA, F.; YUGAMI, K.; MOCHIZUKI, M.; YAMADA, F.; OGASAWARA, K.; FUJIMA, A.; SHOJI, H.; HONDO, R. Comparison of Genomic Structures in the Serovar 1/2a *Listeria monocytogenes* Isolated from Meats and Listeriosis Patients in Japan. **Japanese Journal Infection Disease**, v. 58, p. 289-293, 2005. Disponível em: <<http://www.pubmed.gov>>. Acesso em: 05 fev. 2006.

WARBURTON, D.; BOVILLE, A.; PAGOTTO, F.; DALEY, E.; CHOW, C. The detection of *Listeria* spp. in foods and environmental samples using Palcam broth. Government of Canada. Health Products and Food Branch. Evaluation and Research Divisions. Bureau of Microbiol Hazards. **Food Directorate (Health Canada's)**, 2003. Disponível em: <<http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>>. Acesso em: 20 out. 2005.

WESLEY, I. V.; HARMON, K. M.; DICKSON, J. S.; SCHWARTZ, A. R. Application of Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for Simultaneous Confirmation of *Listeria monocytogenes* and Other *Listeria* Species in Turkey Sample Surveillance. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 5, p. 780-785, 2002.

WIEDMANN, M. ASDA Foundation Scholar Award – An Integrated Science – Based Approach to Dairy Food Safety: *Listeria monocytogenes* as a Model System. **Journal Dairy Science**, v. 86, p. 1865-1875, 2003.

WHO/FAO - WORLD HEALTH ORGANIZATION / FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: interpretative summary. **Microbiological risk assessment series**, n. 4, 2004a. Disponível em: <<http://www.fao.org/es/esn>>. Acesso em: 19 out. 2005.

WHO/FAO - WORLD HEALTH ORGANIZATION / FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: technical report. **Microbiological risk assessment series**, n. 5, 2004b. Disponível em: <<http://www.fao.org/es/esn>>. Acesso em: 05 fev. 2006

ZHOU, X.; JIAO, X. Polymerase chain reaction detection of *Listeria monocytogenes* using oligonucleotide primers targeting *act A* gene. **Food Control**, v.16, p. 125-130, 2005.

8 ANEXOS

8.1 Caldo *Fraser*

Proteose peptona	5,0 g
Triptona	5,0 g
Extrato de carne	5,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
Cloreto de sódio	20,0 g
Fosfato de sódio dibásico	12,0 g
Fosfato de potássio monobásico	1,35 g
Esculina	1,0 g
Cloreto de lítio	3,0 g
Água destilada	1000 mL

pH 7.2 + - 0.2 a 25°C

Misturar os componentes, aferir o pH. Distribuir. Autoclavar a 121°C por 15 min.

8.2 Solução de ácido nalidíxico (suplemento caldo *Fraser*)

Ácido nalidíxico de sódio	0,1 g
Solução de hidróxido de sódio 0,05 mol/L	10 mL

Autoclavar a 121°C por 15 min.

8.3 Solução de acriflavina (suplemento caldo *Fraser*)

Hidrocloreto acriflavina	0,25 g
Água	100 mL

Autoclavar a 121°C por 15 min.

8.4 Solução de citrato férrico amoniacal

Citrato férrico amoniacal	5,0 g
Água	100 mL

Autoclavar a 121°C por 15 min.

8.5 Meio Oxford

8.5.1 Ágar base

Ágar Columbra	39,0 g
Esculina	1,0 g
Citrato férrico amoniacal	0,5 g
Cloreto de lítio	15,0 g
Água destilada	1000 mL
* Peptona proteose	23,0 g
Amido	1,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Ágar	9 g – 18 g (depende da espessura do gel)

pH 7,0 + - 0,2 a 25°C

Esterilizar por 15 minutos a 121°C. Verificar o pH. Esfriar a base a 47°C e assepticamente adicionar o suplemento.

8.5.2 Suplemento Oxford (OXOID)

Modified Listeria Selective Supplement SR 206E

Adicionar 5mL de etanol 70% para reconstrução do líófilo, e depois adicionar em 500 mL do ágar fundido (após esfriar um pouco).

8.6 Meio Palcam

Peptona	23,0 g
Amido	1,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
Ágar	9 g – 18 g
D-glucose	0,5 g
D-manitol	10,0 g
Esculina	0,8 g
Citrato férrico amoniacal	0,5 g
Fenol vermelho	0,08 g
Cloreto de lítio	15,0 g
Água	960 mL

pH 7,0 + - 0,2 a 25°C

Esterilizar por 15 minutos a 121°C. Verificar o pH. Esfriar a base a 47°C e assepticamente adicionar o suplemento.

8.6.1 Suplemento Palcam (OXOID)

Palcam Selective Supplement SR 150E

Adicionar 2mL de água destilada estéril, e depois verter em 500 mL de ágar fundido.

8.7 Meio Cromogênico

8.7.1 *Chromogenic Listeria Agar Base (CM 1080B) – OXOID*

Peptona	18,5g
Extrato de levedura	4,0g
Cloreto de sódio	9,5 g
X – mix cromogênico glucosídeo	0,2g
Maltose	4,0g
Piruvato de sódio	2,0g
Cloreto de lítio	15,0 g
Ágar	14,0 g

pH 7,4 + - 0,2 a 25°C

Misturar 33,6g em 480 mL água destilada. Esterilizar em autoclave (121°C – 15 min). Esfriar a 46°C, adicionar suplemento diferencial. Mexer. Depois o suplemento seletivo. Mexer. Colocar em placas de Petri. 500 g faz 7,4L.

8.7.2 Suplementos do meio cromogênico

8.7.2.1 *Chromogenic Listeria Selective Supplement (SR 0227E) - OXOID*

Ácido nalidíxico
Polimixina B
Amphotericina
Ceftazidime

Suspender o pó do frasco em 2 mL de água estéril para 480 mL do ágar.

8.7.2.2 *Chromogenic Listeria Differential Supplement (SR 0228E) – OXOID*

Solução Lecitina

Colocar um frasco de suplemento em 480 mL em ágar a 46°C.

8.8 Base para ágar sangue

Peptona de carne	15 g
Fígado	2,5 g
Extrato de levedura	5 g
Cloreto de sódio	5 g
Ágar	9 g – 18 g
Água destilada	1000 mL

Esterilizar a 15 min a 121°C. Depois da esterilização: pH = 7,2 + - 0,2 a 25°C

8.9 Ágar sangue (POP nº 65.3210.002 Anexo B)

Fundir 300 mL de base para ágar sangue. Esfriar um pouco, e adicionar 15 mL de sangue de ovino desfibrinado (Validade: 15 dias) cedido pela Fundação Oswaldo Cruz-RJ.

OBS: As placas devem ser confeccionadas com o meio ágar sangue de espessura bem fina para melhor visualização da hemólise.

8.10 Solução de BHI

Infusão de cérebro de bezerro	12,5 g
Infusão de coração de boi	5,0 g
Proteose peptona	10,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato monoácido de sódio	2,5 g
Glicose	2,0 g
Água destilada	1000 mL

Suspender os componentes em água destilada e dissolver por aquecimento até ebulição. Distribuir volumes de 3 mL em tubos. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

8.11 Caldo TSB com 0,6% com extrato de levedura

<i>Meio TSB (Caldo Casoy)</i>	30 g
Extrato de levedura	6 g
Água destilada	1000 mL

Suspender os componentes em água destilada, dissolver e distribuir. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Depois da esterilização: pH = 7,3 + - 0,2 a 25°C

8.12 Peróxido de hidrogênio a 3% (Teste de catalase)

Peróxido de hidrogênio a 30%	1,0 mL
Água destilada	10 mL

Homeogeneizar e estocar a temperatura de refrigeração.

8.13 Tampão TBE 5X (POP nº 65.3230.009)

Tris-HCl	54,0 g
Ácido Bórico	27,5 g
Solução EDTA 0,5 M pH 8,0	20 mL
Água mili-Q	1000 mL qsp.

Misturar os componentes, verificar o pH 8,0, avolumar a 1000 mL com água Mili-Q.

8.14 Solução de NaCl 0,85%

Cloreto de sódio	0,85 g
Água destilada	1000 mL

Suspender o componente em água destilada. Distribuir e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 min.

8.15 Solução tampão 20 mM Tris-HCl pH 8.0 e 50 mM KCl

Tris-HCl 100 mM pH 8.0	20 mL
KCl 100 mM	50 mL
Água Mili-Q estéril	30 mL

Misturar os componentes e guardar em frasco rotulado.

8.16 Temperatura de armazenamento antes e após a coleta das amostras de queijo minas frescal

	MARCA A	MARCA B	MARCA C	MARCA D	MARCA E	MARCA F
Supermercado	6°C	2°C	0°C	2°C	8°C	8°C
Refrigerador	4°C/12h	4°C/12h	4°C/12h	4,5°C/12h	3°C/12h	4°C/12h

8.17 Coloração do meio de cultura Half Fraser após incubação por 24h a 30°C

AMOSTRA	RESULTADO					
	MARCA A	MARCA B	MARCA C	MARCA D	MARCA E	MARCA F
1	Marrom claro	Marrom claro	Marrom claro e odor forte	Amarelo-ovo	Amarelo-ovo	Amarelo-ovo
2	Marrom claro	Marrom claro	Marrom claro e odor forte	Amarelo-ovo	Amarelo-ovo	Amarelo-ovo
3	Marrom claro	Marrom claro	Marrom claro e odor forte	Amarelo-ovo	Amarelo-ovo	Amarelo-ovo
4	Marrom claro	Marrom claro	Marrom claro e odor forte	Marrom escuro	Amarelo-ovo	Amarelo-ovo
5	Marrom claro	Marrom claro	Marrom claro e odor forte	Marrom escuro	Amarelo-ovo	Amarelo-ovo
C+1	Marrom escuro	Marrom escuro	Marrom escuro e odor forte	Marrom escuro	Amarelo-ovo	Amarelo-ovo
C+2	Marrom bem escuro	Marrom bem escuro	Marrom bem escuro e odor forte	Marrom bem escuro	Marrom escuro	Marrom escuro

8.18 Aspecto do caldo BHI após incubação por 5h a 35°C

AMOSTRA	RESULTADO					
	MARCA A	MARCA B	MARCA C	MARCA D	MARCA E	MARCA F
1	Levemente turvo	Turvo	Turvo	Turvo	Turvo	Turvo
2	Pouco turvo	Turvo	Turvo	Turvo	Turvo	Turvo
3	Turvo	Turvo	Turvo	Turvo	Turvo	Turvo
4	Turvo	Turvo	Turvo	Turvo	Turvo	Turvo
5	Turvo	Turvo	Turvo	Turvo	Turvo	Turvo
C+1	Pouco turvo	Turvo	Turvo	Turvo	Turvo	Turvo
C+2	Pouco turvo	Turvo	Turvo	Pouco turvo	Pouco turvo	Pouco turvo

8.19 Coloração do caldo Fraser após incubação por 48h a 35°C

AMOSTRA	RESULTADO					
	MARCA A	MARCA B	MARCA C	MARCA D	MARCA E	MARCA F
1	Marrom bem escuro	Marrom bem escuro	Marrom bem escuro	Marrom escuro	Marrom	Marrom
2	Marrom bem escuro	Marrom bem escuro	Marrom bem escuro	Marrom escuro	Marrom	Marrom
3	Marrom bem escuro	Marrom bem escuro	Marrom bem escuro	Marrom escuro	Marrom	Marrom
4	Marrom bem escuro	Marrom bem escuro	Marrom bem escuro	Marrom escuro	Marrom	Marrom
5	Marrom bem escuro	Marrom bem escuro	Marrom bem escuro	Marrom escuro	Marrom	Marrom
C+1	Marrom bem escuro	Marrom bem escuro	Marrom bem escuro	Marrom escuro	Marrom	Marrom
C+2	Marrom bem escuro	Marrom bem escuro	Marrom bem escuro	Marrom	Marrom	Marrom

8.20 Hemólise em meio ágar-sangue das colônias características coletadas dos meios Oxford, Palcam e Cromogênico

TESTE	RESULTADO					
	MARCA A	MARCA B	MARCA C	MARCA D	MARCA E	MARCA F
	A3,A4,A5	B9	C11	-	E21,E22,E23 , E24,E25	F26,F27,F28, F29,F30
Hemólise	Negativo	Negativo	Negativo	Não realizado	Positivo	Negativo

8.21 Multiplex-PCR de isolados obtidos de amostra de queijo minas frescal, controle positivo 1 e 2 (Extração do caldo BHI segundo Kacliková et al. 2003)

AMOSTRA	RESULTADO					
	MARCA A	MARCA B	MARCA C	MARCA D	MARCA E	MARCA F
1	Sem bandas características	Sem bandas	Sem bandas	Sem bandas características	370 + 471 pb	370 pb + bandas não-características
2	Sem bandas características	Sem bandas	Sem bandas características	Sem bandas características	370 + 471 pb	370 pb + bandas não-características
3	370 pb	Sem bandas características	Sem bandas	Sem bandas características	370 + 471 pb	370 pb
4	370 pb	Sem bandas	Sem bandas	Sem bandas características	370 + 471 pb	370 pb
5	370 pb	Sem bandas características	Sem bandas características	Sem bandas características	370 + 471 pb	370 pb + banda não-característica
C+1	370 + 471 + 597 + 691pb	370 + 691pb	370 pb	370 + 471 + 597 pb	370 + 471 + 597 pb	370 + 471 pb
C+2	370 + 691pb	370 + 691pb	370 pb	370 + 691 pb	370 + 471 + 597 + 691 pb	370 + 691 pb

8.22 Multiplex-PCR de isolado obtido de Half Fraser, Fraser e BHI (Extração Kit Qiagen e Kacliková et al. 2003)

AMOSTRA	RESULTADO					
	MARCA A (HALF FRASER – Extração Kit Qiagen)	MARCA A (FRASER – Extração Kit Qiagen)	MARCA A (BHI – Extração Kacliková et al. 2003)	MARCA F (HALF FRASER – Extração Kacliková et al. 2003)	MARCA F (FRASER – Extração Kacliková et al. 2003)	MARCA F (BHI – Extração Kacliková et al. 2003)
1	Sem bandas características	Sem bandas características	Sem bandas características	Sem bandas	Sem bandas	370 pb + bandas não-características
2	Sem bandas características	Sem bandas características	Sem bandas características	Sem bandas	Sem bandas	370 pb + bandas não-características
3	370 pb	370 pb	370 pb	Sem bandas	Sem bandas	370 pb
4	370 + 691 pb	370 pb	370 pb	Sem bandas	Sem bandas	370 pb
5	370 pb	370 pb	370 pb	Sem bandas	Sem bandas	370 pb + banda não-característica
C+1	370 + 471 + 691pb	370 + 691pb	370 + 471 + 597 + 691pb	Sem bandas	Sem bandas	370 + 471 pb
C+2	370 + 471 + 597 + 691pb	370 + 691pb	370 + 691pb	Sem bandas	Sem bandas	370 + 691 pb