

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

ESTUDO DE PREVALÊNCIA SOBRE ALGUNS PATÓGENOS DE
IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA, EM
QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL

ANNA CASSIA GOMES CORBIA

SEROPÉDICA

2000

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

ESTUDO DE PREVALÊNCIA SOBRE ALGUNS PATÓGENOS DE
IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA, EM
QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL

ANNA CASSIA GOMES CORBIA

ORIENTADORA: Dra. MARIA DA GRAÇA FICHEL DO NASCIMENTO

Tese submetida como
requisito parcial para obtenção
do grau de *Magister Scientiae*
em Medicina Veterinária, área
de Concentração em Medicina
Veterinária Preventiva.

ESTUDO DE PREVALÊNCIA SOBRE ALGUNS PATÓGENOS DE
IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA, EM
QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL

ANNA CASSIA GOMES CORBIA

APROVADA EM 28/2/2000

Maria da Graça Fichel do Nascimento
MARIA DA GRAÇA FICHEL DO NASCIMENTO

Elmiro Rosendo do Nascimento
ELMIRO ROSENDO DO NASCIMENTO

Norma dos Santos Lázaro
NORMA DOS SANTOS LÁZARO

Dedico esta tese:

A meus pais e irmão, pelo constante
apoio, incentivo, amor e paciência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que é Soberano;

À pesquisadora da Embrapa/Agrobiologia, e orientadora, Dra. MARIA DA GRAÇA FICHEL DO NASCIMENTO, em primeiro lugar, por ter criado a infra-estrutura laboratorial em Microbiologia de Alimentos e suporte financeiro, dentro do Subprojeto da Embrapa e Projeto do CNPq, permitindo a realização deste trabalho; em segundo lugar, pelos ensinamentos e obtenção especial na orientação e análise do conteúdo deste trabalho;

Ao co-orientador, Dr. ELMIRO ROSENDO DO NASCIMENTO pelos esclarecimentos e ajuda das análises estatísticas e interpretações epidemiológicas deste trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão de Bolsa de Auxílio à Pesquisa, no segundo ano desse estudo;

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação, Prof^a. Maria da Conceição Estellita Vianni e Otacilho José Domingues pelo apoio acadêmico;

A JOSIMAR GONÇALVES DOS SANTOS, pela paciência, carinho e apoio durante a realização desta tese;

Ao amigo e colega de Pós-Graduação, CARLOS ZARDEN FEITOSA DE OLIVEIRA, pelo prestimoso auxílio nos exames laboratoriais e informática deste trabalho;

Às colegas do alojamento pela amizade e carinho;

Ao Dr. GILBERTO BRASIL LIGNON, pela colaboração nas coletas e preparos de insumos e pelo apoio da infraestrutura laboratorial básica;

Ao Projeto Sanidade Animal, EMBRAPA/UFRRJ, Seropédica, pela concessão das suas instalações laboratoriais onde foi realizado o trabalho;

Aos técnicos LUIS CARLOS CHAVES, MARILDO DE AZEVEDO E LUIS ANTONIO DA SILVA JACINTHO, do setor de meio de cultura e esterilização do PSA-EMBRAPA/UFRRJ, pelo auxílio e dedicação na elaboração dos meios de cultura e esterilização;

Ao supervisor de laboratório da EMBRAPA-CNPAB, GERALDO BAETA DA CRUZ, pela confecção dos slides;

A todos os professores deste Curso, pelos ensinamentos ministrados;

E a todos que direta e indiretamente contribuiram para a realização desse estudo.

BIOGRAFIA

ANNA CASSIA GOMES CORBIA, filha de Pasquale Corbia e Hernordina Gomes Corbia, nasceu em 27 de janeiro de 1972, em Niterói, Rio de Janeiro.

Ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) em 1992, graduando-se em Medicina Veterinária, em abril de 1997.

Em janeiro de 1996, foi aprovada no concurso para estágio (bolsista) em Medicina Veterinária na Prefeitura Municipal do Rio de Janeiro, lotada no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), classificando-se em 8º lugar.

Em março de 1998, ingressou no curso de Mestrado em Medicina Veterinária, na área de Medicina Veterinária Preventiva na UFRRJ. Neste mesmo ano, iniciou atividades laboratoriais na área de Segurança de Alimentos, cujos resultados foram publicados no V Congresso Latino-Americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos, em Águas de Lindóia, São Paulo, sob o título: “Ocorrência de *Staphylococcus aureus* coagulase positivo em queijo Minas Frescal”. Publicou também resumo na VIII Jornada Científica da UFRRJ, em Seropédica, Rio de Janeiro, intitulado: “Análise microbiológica e determinação da

umidade e pH de queijo tipo Minas Frescal”. No ano de 1999, publicou resumos nos Anais do V Congresso de Brasileiro de Higienista de Alimentos, em Foz do Iguaçu, Paraná, intitulados: “Avaliação e controle higiênico-sanitário de uma queijaria artesanal de queijo Minas Frescal”, “Queijo tipo Minas Frescal com e sem Serviço de Inspeção Federal-contaminação por coliformes fecais e *Escherichia coli*”, “Estudos comparativos entre meios de Baird-Parker e Vogel-Johnson no isolamento de *Staphylococcus* sp de queijos” e “Susceptibilidade antimicrobiana, “in vitro”, de bactérias de gênero *Staphylococcus*, isoladas de queijo Minas”. Outros resumos foram publicados no XX Congresso de Microbiologia, em Salvador, Bahia, intitulados: “Análise bacteriológica para *Salmonella* spp em queijo tipo Minas Frescal” e “Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em queijo tipo Minas Frescal”. Trabalho completo foi apresentado e publicado nos Anais do IV Congresso Pernambucano de Medicina Veterinária, em Recife, Pernambuco, intitulado: “Efeito do pH e umidade sobre o crescimento de bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus* em Queijo Minas Frescal”. Participou como co-autora de uma Recomendação Técnica publicada pela Embrapa-CNPAB, Seropédica, Rio de Janeiro, intitulada: “Análise de perigos e pontos críticos de controle (HACCP), em queijaria tipo artesanal”.

ÍNDICE GERAL

I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	4
2.1.1. Características da <i>Listeria monocytogenes</i>	4
2.1.2. Epidemiologia	6
2.1.2.1. Listeriose humana	10
2.1.2.2. Surtos e casos esporádicos.....	14
2.1.2.3. Alimento como via de transmissão	16
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	20
2.2.1. Características do <i>Staphylococcus aureus</i>	20
2.2.1.1. Fatores que afetam o crescimento e produção de enterotoxinas.....	25
2.2.2. Epidemiologia e importância em Saúde Pública.....	27
2.2.3. Surtos.e casos esporádicos.....	31
III. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1. Amostragem	37
3.2. Métodos	38
3.2.1. Isolamento e identificação de <i>Listeria monocytogenes</i>	38
3.2.2. Isolamento e identificação de <i>Staphylococcus aureus</i>	40
3.2.3. Contagem em placa para mesófilos aeróbicos	41

3.2.4. Determinação das características físico-químicas dos queijos sob estudo	42
3.2.4.1. pH	42
3.2.4.2. Determinação da % de água	42
3.2.5. Testes bioquímicos usados para <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Listeria monocytogenes</i>	42
3.2.5.1. Coloração de Gram	42
3.2.5.2. Prova da catalasc	43
3.2.6. Testes bioquímicos usados para <i>Listeria monocytogenes</i>	43
3.2.6.1. Teste de oxidase	43
3.2.6.2. Teste de uréia	43
3.2.6.3. Fermentação de açúcares	43
3.2.6.4. Teste de esculina	44
3.2.6.5 Hemólise em Ágar Sangue	44
3.2.6.6. Teste de motilidade	44
3.2.7. Testes bioquímicos usados para <i>Staphylococcus aureus</i>	45
3.2.7.1. Teste de coagulase	45
3.2.7.2. Resistência à bacitracina	45
3.2.7.3. Teste de Vogel-Proskauer	46
3.3. Método estatístico	46
IV. RESULTADOS	53
4.1. Distribuição das amostras de queijos analisadas, provenientes em quatro microrregiões do Estado do Rio de Janeiro	53
4.2. Ocorrência de <i>Listeria monocytogenes</i> em queijo tipo Minas frescal	54
4.3. Avaliação dos meios utilizados para isolamento de <i>Listeria monocytogenes</i>	54
4.4 Contagem total dos mesófilos aeróbicos, pH e umidade	55
4.5. Ocorrência de <i>Staphylococcus aureus</i> em queijo tipo Minas frescal	55
4.6. Avaliação dos meios utilizados para isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i>	56
4.7. Análise estatística	56
V. DISCUSSÃO	70

VI. CONCLUSÕES	80
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
APÊNDICE	92

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Características diferenciais das espécies de <i>Listeria</i>	36
TABELA 2. Relação das amostras coletadas e resultados microbiológicos (Número total de microorganismos/g de queijo), usando-se contagem padrão em placas e características (pH e umidade) de 59 queijos tipo Minas frescal examinados.....	58
TABELA 3. Resultados das provas bioquímicas das cinco colônias “suspeitas” mais semelhantes com <i>Listeria monocytogenes</i> , isoladas de 58 amostras de queijo Minas frescal consumidos no Estado do Rio de Janeiro.....	60
TABELA 4. Isolamento e classificação de colônias pretas, Gram positiva (suspeitas de <i>Staphylococcus aureus</i>) isoladas de 59 amostras de Queijo tipo Minas frescal....	61
TABELA 5. Resultados da análise estatística descritiva do pH, umidade, tempo de prateleira e crescimento bacteriano (UFC de <i>Staphylococcus</i> e/ou <i>Micrococcus</i>) de 55 queijos Minas frescal.....	63
TABELA 6. Resultado da análise de Regressão Linear de crescimento bacteriano (UFC) de <i>Staphylococcus</i> e/ou <i>Micrococcus</i> em relação às variáveis independentes pH, umidade e tempo de prateleira, em 47 amostras de queijos Minas frescal.....	64
TABELA 7. Resultados de Regressão Linear de crescimento bacteriano (UFC/g <i>Staphylococcus/Micrococcus</i>) com todas as possíveis combinações de pH, umidade e tempo de prateleira em 47 queijos Minas frescal.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Fluxograma da metodologia utilizada para pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> em queijos tipo Minas frescal.....	48
FIGURA 2. Fluxograma da representação esquemática dos testes bioquímicos utilizados para o isolamento de <i>Listeria monocytogenes</i> em queijo Minas frescal.....	49
FIGURA 3. Fluxograma da metodologia utilizada para pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> em queijos tipo Minas frescal.....	50
FIGURA 4. Fluxograma da representação esquemática dos testes bioquímicos utilizados para o isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> em queijo Minas frescal.....	51
FIGURA 5. Fluxograma da metodologia utilizada para a pesquisa da contagem total de mesófilos aeróbicos em queijos tipo Minas frescal.....	52

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. Resultados do total de amostras de queijo Minas frescal em relação ao padrão da percentagem de água estabelecido pela Portaria nº 451.....	66
GRÁFICO 2. Resultados das percentagens de crescimento bacteriano (UFC/g) <i>coccus Gram positivos</i> isolados de 58 amostras de queijo Minas frescal disponíveis para consumo em quatro microrregiões no Estado do Rio de Janeiro.....	67
GRÁFICO 3. Comparação do crescimento de colônias típicas dos meios de “Baird-Parker” (BP) e “Vogel-Jonhson” (VJ) utilizados para isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> em amostras de queijo tipo Minas frescal.....	68
GRÁFICO 4. Comparação do desempenho dos meios “Baird-Parker” (BP) e “Vogel-Jonhson” (VJ), em relação a crescimento melhor (menos contaminação e/ou maior UFC/g) suspeitas de <i>Staphylococcus aureus</i> em 58 amostras de queijo Minas frescal.....	69

GRÁFICO 5. Distribuição da freqüência da contagem de mesófilos aeróbicos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por amostra de queijo Minas frescal.....	78
GRÁFICO 6. Distribuição da contagem total de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de 57 amostras de queijo Minas frescal consumidos no Estado do Rio de Janeiro.....	79

RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar a qualidade higiênico-sanitária de queijo tipo Minas frescal através da pesquisa de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), contagem total de microorganismos além da análise físico-química (determinação do teor de água e pH). Um total de 59 amostras de queijo tipo Minas frescal foi analisado, correspondendo a 25 marcas comerciais disponíveis para consumo, com a presença ou não do Serviço de Inspeção Federal (SIF). As amostras foram obtidas de supermercados, propriedades rurais e queijaria artesanal abrangendo quatro microrregiões do Estado do Rio de Janeiro, cuja produção foi originária de três Estados: Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais. Todos os 58 queijos submetidos à pesquisa de *L. monocytogenes*, utilizando-se ágar “Lithium Phenylethanol Modified” (LPM) e ágar “MacBride Modified” (MMA), foram negativos para essa bactéria, concluindo-se que o produto estava em acordo com a Legislação. Para *S. aureus*, foram analisadas 57 amostras. Utilizou-se dois meios seletivos: ágar “Baird-Parker” e ágar “Vogel-Jonhson”. Os resultados encontram-se em tabelas. Foram isoladas 93 colônias (38,91%) de *Staphylococcus* sp. coagulase negativa, 25 (10,46%) de *Staphylococcus* sp. coagulase

positiva, 18 (7,53%) de *S. aureus*, 35 (14,64%) de *Micrococcus* spp., 64 (26,78%) de *Streptococcus* spp. e quatro (1,67%) de leveduras. No total, sete (10,56%) amostras apresentaram positividade para *S. aureus* das quais quatro tinham SIF e três não. Também foi observado que nove (15,79%) das amostras de queijos não cresceram em placa, cujo crescimento foi atribuído o valor zero. A contagem total de microorganismos mesófilos aeróbicos em placas, das 59 amostras examinadas, variou de zero a $8,7 \times 10^9$ UFC/g ou “Too Numerous To Count” (TNTC). A percentagem média de umidade foi 60,91% com desvio.padrão de 7,12. A média de pH foi 5,53, com desvio padrão de 0,66. A presença de *S. aureus* coagulase positivo em valores acima do permitido sugere contaminação cruzada por manipuladores portadores e/ou pasteurização inadequada de leite proveniente de vacas com mastite por *S. aureus*, ou ainda esses fatores juntos, ou utensílios e/ou equipamentos contaminados. Os resultados das análises de regressão linear ao analisar as variáveis isoladamente revelaram que o pH foi altamente significativo ($p < 0,01$), enquanto a umidade e tempo de prateleira não tiveram significância estatística.

SUMMARY

The objective of the present study was to evaluate the hygienic sanitary condition of frescal Minas soft cheese, through the research of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), total plate count of microorganisms, and physicochemical exams (water content and pH). A total of 59 Minas soft cheese samples was analysed, including 25 cheeses commercially available, with the presence or not of the Federal Inspection (FI) . Samples were obtained from supermarkets, farms and “artesanal” manufacture from four microrregions of Rio de Janeiro State, which production was originated from three states: Rio de Janeiro, São Paulo and Minas Gerais. All the 58 samples analised to investigade *L. monocytogenes* by utilization of Lithium Phenylethanol Modified agar (LPM) and Mac Bride Modified agar (MMA) were negative, so it was concluded that this product was in agreement with the current legislation. For the investigation of *S. aureus*, 57 samples were analysed. Two selective agar were used: Baird Parker agar and Vogel Johnson agar. Ninety and three isolated colonies of *Staphylococcus* spp. (38.91%) were coagulase negative; 25 colonies of *Staphylococcus* spp. (10.46%) were coagulase positive; 18 isolated colonies (7.53%) were classified as *S. aureus*, 35

(14.64%) were *Micrococcus* spp., 64 (26.78%) *Streptococcus* spp and four (1.67%) colonies of yeasts. Seven samples (10.56%) were positive to *S. aureus* from which three did not have FI. It was also observed that nine cheese samples (15.79%) showed no growth in plate, which was equivalent to zero. The total plate count (aerobic mesophilis) from the 59 samples ranged from zero to 8.7×10^9 UFC/g or too numerous to count (TNTC). The moisture average was 60.91%, with standard deviation of 7.12. The pH average was 5.53 with standard deviation of 0.66. The presence of *S. aureus* coagulase positive in higher numbers than the tolerated limit suggests cross contamination by human source and/or inadequate pasteurization of milk originated from cows with mastitis caused by *S. aureus*, or these factors in association, or contaminated equipment or utensilis. Results of the linear regression analysis with isolated variables showed that the pH was highly significant ($p<0,01$), while moisture and shelf time did not show statistical significance.

I. INTRODUÇÃO

Os alimentos de origem animal são componentes importantes da dieta humana. Dentre eles, o leite e seus derivados, merecem destaque por serem muito consumidos. Entre esses derivados, o queijo, principalmente, o tipo Minas frescal é um alimento de grande demanda. Segundo PINTO et al. (1996), na década de 80, por motivos econômicos a produção dos queijos frescais teve um aumento significativo em relação às outras variedades de queijos, por ser um produto de fácil e rápida elaboração e, consequentemente, de baixo custo. Um outro fator que contribuiu para este aumento, foi a utilização do mesmo nas dietas alimentares por ser um queijo de baixo valor calórico. O aumento da produção leiteira, durante o período da safra, leva a um aumento da fabricação artesanal de produtos lácticos, com certa predominância do queijo “Minas frescal”, que pode refletir também no surgimento de queijos com menor qualidade higiênico-sanitária (PINTO et al., 1996).

De um modo geral, os produtos lácticos são produzidos a partir de leite pasteurizado e sendo assim, não deveriam apresentar nenhum microorganismo patogênico. Porém, pode haver contaminações durante ou após o processamento, e/ou quando acondicionados, após

preparo, em temperaturas inadequadas e/ou durante o período de transporte. Alguns produtos, principalmente o queijo Minas frescal são fabricados a partir de leite não pasteurizado, proporcionando grandes riscos ao consumidor. Os alimentos têm grande importância na transmissão de microorganismos, por servirem como substratos para estes que poderão produzir substâncias nocivas, ocasionando doenças quando ingeridos (GONÇALVES, 1998).

A contaminação de alimentos por *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), nos últimos anos, tornou-se uma grande preocupação para a indústria. Tudo isso deve-se ao surgimento de inúmeros casos isolados e surtos de listeriose humana associados com a ingestão de alimentos, incluindo leites e derivados (SCHUCHAT et al., 1992, OLIVEIRA, 1993). A listeriose humana tem aparecido como consequência da mudança de hábitos alimentares, marcadamente pela popularidade do consumo de alimentos crus ou semi-crus, e pelo uso do frio na conservação de alimentos (ROBERTS, 1990; NASCIMENTO, 1991; NASCIMENTO & CULLOR, 1994; ROCOURT, 1996).

A *L. monocytogenes* é capaz de sobreviver e crescer em alimentos mantidos a 4°C podendo contaminar outros alimentos a sua redondeza e manter a integridade visual do produto sem gerar qualquer odor e gás que possibilite suspeita de contaminação, sendo assim um grande risco ao homem. Nos Estados Unidos (EUA), só em 1985, foram detectados 314 casos de listeriose, dos quais 40 foram fatais. Foram atribuídos ao consumo de queijo mole, ou seja, queijo tipo fresco (LINNAN et al., 1988).

O *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) pode estar presente em vários produtos alimentícios como doces, carnes e derivados e leites e derivados sem causar alteração de suas características organolépticas. A maioria das cepas de *S. aureus* produz uma

enterotoxina que é resistente ao calor, e que tem propriedades de induzir os sintomas clássicos de vômitos, diarréia e dores abdominais. Este microorganismo é considerado a maior causa de intoxicação alimentar do mundo (SENA, 2000).

A fonte mais provável de contaminação primária de alimentos por *S. aureus* é o próprio ser humano. Uma grande parte da população humana possui *S. aureus* como parte da flora microbiana do nariz, pescoço e mãos e, consequentemente, essas pessoas que manuseiam os alimentos podem contaminar o produto cru, os equipamentos, e/ou o produto final (BRYAN, 1976). Durante o período de 1975 à 1979, dos 540 surtos registrados nos “Center for Disease Control”, nos EUA, 153 foram por *S. aureus*, sendo que a causa primária para tais surtos foi a temperatura imprópria na qual os alimentos foram mantidos (SMITH et al., 1983). No Brasil, tem-se observado vários surtos (CARMO & BERGDOLL, 1990; SABIONI et al. 1994; PEREIRA et al., 1996) de intoxicação alimentar com queijo tipo Minas frescal causados por *S. aureus*. Apesar do queijo Minas ter boas propriedades físico-químicas, suas características higiênico-sanitárias podem ser deficientes, pois uma grande parte é feita de maneira artesanal, sem muitos cuidados higiênicos, repercutindo assim, na saúde do consumidor (WENDPAP & ROSA, 1993).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de bactérias importantes à Saúde Pública: *L. monocytogenes* e *S. aureus* em queijo tipo Minas frescal disponíveis para consumo no Estado do Rio de Janeiro, além de avaliar a qualidade higiênica desses queijos por meio da contagem total de microorganismos mesófilos aeróbicos em placa, e determinar o pH e percentagem de água. Objetivou-se também obter informações para gerar subsídios para a prevenção e controle desses patógenos nesse tipo de alimento, melhorando sua qualidade e aumentando a segurança alimentar.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Listeria monocytogenes*

2.1.1. Características da *Listeria monocytogenes*

A *L. monocytogenes* foi isolada pela primeira vez por MURRAY et al. (1926) a partir de focos necróticos de figado de coelho num surto envolvendo animais de laboratório e denominada de *Bacterium monocytogenes* em virtude da infecção ser caracterizada por uma monocitose. Posteriormente, PIRIE (1927), descreveu este microorganismo denominando-o *Listeria monocytogenes*, em homenagem a Lord Lister, descobridor da antisepsia, cujo nome foi mais tarde aceito e é usado até hoje.

SEELIGER & JONES (1986) descreveram a *L. monocytogenes* como pequeno bastonete regular; Gram positivo, aeróbico ou microaerófilo, oxidase negativa, catalase positiva, parasita intracelular facultativo, não formador de cápsula e móvel por flagelos peritíquios quando cultivados a 20-25°C, com movimento de tombamento ou rotatório, apresentando assim, um crescimento em forma de guarda-chuva em meio usado para observar sua motilidade. Estudos demonstraram que a temperatura mínima de crescimento

de *L. monocytogenes* é abaixo de 0°C em caldo de galinha, com uma faixa de variação entre -0,1°C a 0,4°C (WALKER et al., 1990). Essa bactéria cresce normalmente na faixa de 1-45°C, sendo a temperatura ótima entre 30-37°C (LOW & DONACHE, 1997). É bastante tolerante ao sal. Cresce em meio contendo 10% de cloreto de sódio, sobrevivendo em 30% a 22°C (EIROA, 1989). Cresce melhor em meio neutro ou ligeiramente alcalino, podendo entretanto, se multiplicar na faixa de pH 5,0 até 9,6 (SILVA, 1997; LOW & DONACHE, 1997). Estudos reportam sua sobrevivência em pH abaixo de 4,7, sem apresentar crescimento (RYSER & MARTH, 1987). Em determinada ocasiões a *L. monocytogenes* pode sobreviver em pH 4,3 (EIROA, 1989). Outras características bioquímicas do gênero estão relacionadas na TABELA 1. Com base principalmente na análise das características genéticas e fenotípicas do gênero *Listeria*, segundo a nona edição do “Bergey's Manual of Systematic Bacteriology” (SEELIGER & JONES, 1986), constitui-se de sete espécies: *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria murrayi*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria grayi*. A *L. denitrificans* foi transferida para o gênero *Jonesia denitrificans* (ROCOURT et al., 1987) e *L. grayi* e *L. murrayi* passaram a constituir uma única espécie, *L. grayi* (ROCOURT et al., 1992). De acordo com a revisão feita por PEREIRA & ROCOURT (1993), com exceção de *L. grayi* e *L. murrayi*, todas são contaminantes de alimentos. A *L. ivanovii* é responsável por aborto em bovinos e caprinos e a *L. monocytogenes* prima-se em importância como patógeno para o homem e animais.

Sorologicamente, as *L. monocytogenes* isoladas de fontes patológicas, foram classificadas como sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 5, 6a, 6b e 7 (LOVETT, 1987). Os sorogrupos 1 e 4 são os mais encontrados no meio ambiente,

animais ou vegetais. Segundo PEREIRA & ROCOURT (1993) os sorovars 1/2a, 1/2b e 4b são responsáveis por 90% dos casos de listeriose humana.

2.1.2. Epidemiologia

A *L. monocytogenes* foi reconhecida pela primeira vez em 1926 como um patógeno de importância veterinária e em 1929 foi relatado o primeiro caso de listeriose humana. Antes da década de 60, os casos eram raros, no entanto de 1960 à 1982, foram notificados dez mil casos e a partir daí, os relatos vem sendo feitos em todo o mundo (EIROA, 1989; OLIVEIRA, 1993; SILVA, 1997). De acordo com revisão feita anteriormente, NASCIMENTO & CULLOR (1994), a listeriose não é uma zoonose típica, apesar de inicialmente se acreditar nisto pelo fato de um mesmo sorotipo de *L. monocytogenes* ter sido encontrado em animais e homem, e que na maioria das infecções humanas e animais, revelaram a não existência de qualquer relação entre os sorotipos de *Listeria* isolados de ambos tipos de hospedeiros. Adicionalmente, a listeriose humana já ocorreu em locais na qual o contato com animais era raro.

A *L. monocytogenes* é considerada contaminante ambiental, pois encontra-se amplamente difundida na natureza. Essa bactéria tem sido isolada de várias fontes como solo, plantas em decomposição, vegetais, rios, lagos, esgotos, material fecal e poeira (EIROA, 1989; PEREIRA & ROCOURT, 1993). A *L. monocytogenes* pode permanecer na silagem, sendo mais encontrada em silagem de baixa qualidade, particularmente naquelas onde o pH é elevado (MENARD et al., 1993). Uma variedade de animais podem servir como hospedeiros (portadores sadios ou assintomáticos) para *L. monocytogenes* (NASCIMENTO & CULLOR, 1994) e no entanto, os animais domésticos de fazendas são

na maioria identificados como reservatórios, provavelmente porque a listeriose é mais comumente reconhecida neste âmbito. O homem também pode ser reservatório para a *L. monocytogenes*. Segundo a revisão feita por PEREIRA & ROCOURT (1993) e NASCIMENTO & CULLOR (1994), indivíduos saudáveis são capazes de eliminar esta bactéria no ambiente, inclusive nas fezes. Entretanto, pouco se sabe sobre a importância do meio ambiente na epidemiologia da listeriose humana, pois existem inúmeras maneiras da *L. monocytogenes* ser transmitida para um indivíduo suscetível (NASCIMENTO & CULLOR, 1994). De acordo com a revisão feita por NASCIMENTO & CULLOR (1994), em um estudo feito na Hungria, esse microorganismo foi encontrado nas fezes de 0,4% a 21% de indivíduos saudáveis, sendo a sua maior prevalência (21%) detectada em trabalhadores de abatedouros. Este microorganismo está normalmente associado a infecção no trato intestinal ou infecções subclínicas em animais (SILVA, 1997) ou em humanos (NASCIMENTO & CULLOR, 1994; SILVA, 1997).

A *L. monocytogenes* está presente em vários tipos de alimentos, quer seja "in natura" ou processados, como carnes frescas ou produtos cárneos, frangos, pescados, leite e derivados e vegetais. Isso se deve ao fato desse microorganismo estar amplamente distribuído na natureza, aliado pela sua natureza psicotrófica, tendo um crescimento ótimo entre 30-37°C, porém com capacidade de crescer lentamente abaixo de 0°C (WALKER et al., 1990) e a 45°C (ROBERTS, 1990). Essa característica o torna importante em alimentos refrigerados e congelados prontos pois, via de regra, a baixa temperatura aumenta a vida de prateleira de vários produtos podendo proporcionar um elevado número de *Listeria* nos alimentos. O somatório de todas essas características contribuem para que vários casos esporádicos e surtos tenham o alimento como veiculador da *L. monocytogenes*. Sendo

assim, as indústrias de alimentos e autoridades de saúde de vários países concentram hoje sua atenção sobre este microorganismo.

Após os surtos ocorridos na Europa e EUA, envolvendo possivelmente leite pasteurizado e queijos, diversos estudos vêm sendo direcionados à obtenção de dados quanto a presença dessa bactéria sobretudo em produtos lácteos. Dentre as medidas de controle de *L. monocytogenes*, a pasteurização tem sido destacada, pois esse microorganismo parece ser mais resistente ao calor do que outros patógenos, não formadores de esporos, de origem alimentar (PEREIRA & ROCOURT, 1993). De acordo com a revisão feita por estes autores, vários estudos com respeito a termoresistência têm sido realizados com leite e seus derivados. FERNADEZ-GARAYZABAL et al. (1987), não detectaram o microorganismo previamente inoculado no leite cru quando submetido ao tratamento de 73°C. A hipótese de que a localização intracelular de *L. monocytogenes*, nos leucócitos e macrófagos, constitui um fator de proteção ao microorganismo (FLEMING et al., 1985), deve ser considerada, uma vez que representa o estado real do microorganismo no leite, procedente de animais assintomáticos ou com listeriose. DOYLE et al. (1987) desenvolveram um experimento no qual o gado foi previamente inoculado com *L. monocytogenes* e após verificação de sua presença no interior dos leucócitos, o leite foi submetido a pasteurização. Os autores não detectaram o microorganismo no tratamento conduzido a 76,4-77,8°C, durante 15,4 segundos, mas detectaram a 71,7-73,9°C, durante 16,4 segundos. Isto sugere que a não uniformidade dos métodos utilizados na recuperação de *L. monocytogenes* aliada a contaminação secundária na usina de processamento e pasteurização grosseira podem explicar esta controvérsia (PEREIRA & ROCOURT, 1993). De acordo com a "World Health Organization" - WHO, (1988), a *L. monocytogenes* é

destruída quando o processo de pasteurização do leite é corretamente conduzido. Entretanto, queijos e outros produtos de laticínios fabricados a partir de leite pasteurizado, têm se apresentado contaminados por *L. monocytogenes* durante processamento ou mesmo estocagem, a exemplos dos tipos “Brick” (RYSER & MARTH, 1989), “Feta” (PAPAGEORGIOU & MARTH, 1989), “Anary” (AZADIAN et al., 1989), Minas (DESTRO & SERRANO, 1990), “Cheedar” e “Cottage” (REED, 1994). Na revisão feita por PEREIRA & ROCOURT (1993), os queijos de textura mole e aqueles que são submetidos à maturação com fungos de crescimento branco ou vermelho, parecem oferecer melhores condições para o desenvolvimento da bactéria, possivelmente em função da elevação do pH.

EIROA (1989) em sua revisão, relatou os fatores que afetam a sobrevivência e multiplicação da *L. monocytogenes* nos alimentos. Os alimentos com elevado teor de gordura e carboidrato propiciam um desenvolvimento mais intenso da bactéria. Esta se desenvolve melhor em leite integral do que desnatado. Quanto ao pH, a *L. monocytogenes* pode sobreviver e crescer dentro de um amplo intervalo. Em algumas ocasiões tem sido constatada a sobrevivência do microorganismo em pH 4,3 e em pH 4,8. Entretanto, em uma das literaturas revisadas por EIROA (1989), foi observado que a bactéria pode permanecer viável em silagem de boa qualidade com pH 4,0 ou inferior. Para atividade aquosa (Aw), foi observado em valor mínimo de Aw inferior a 0,93 para o desenvolvimento da bactéria, porém, a sua sobrevivência foi constatada em alimentos desidratados com Aw inferior a 0,93, o que faz supor que a *L. monocytogenes* seja capaz de tolerar baixas atividades de água pelo menos por um certo tempo. EIROA (1989) pesquisou também sua sobrevivência em relação ao teor de cloreto de sódio. A *L. monocytogenes* exibe uma elevada resistência

ao sal, sendo capaz de sobreviver durante 15 dias em concentração 10,5% de cloreto de sódio e cinco dias em concentração de 20-30% em temperatura de 37°C. A diminuição da temperatura para 22°C duplica o tempo de resistência do microorganismo. A *L. monocytogenes* é capaz de tolerar concentração de nitrito de sódio da ordem de 156 ppm, porém combinando o uso de nitrato de sódio com outros parâmetros é possível controlar o desenvolvimento do microorganismo. Um outro parâmetro é a atmosfera. Baixa concentração de O₂ e suplemento de anidro carbônico estimulam a multiplicação de *L. monocytogenes*. Considerando-se o já exposto, segundo EIROA (1989), pode-se concluir que o controle da bactéria em alimentos não é muito simples, visto ela ter capacidade de sobrevivência em baixas temperaturas, elevadas concentrações de cloreto de sódio, baixos valores de atividade de água e haver estímulo do desenvolvimento em ausência de oxigênio. Apenas a aplicação de temperaturas elevadas e a diminuição do pH parecem ser eficientes na inativação e na inibição do desenvolvimento, respectivamente. O uso de nitrito de sódio e de conservantes em condições definidas parece ser eficiente, porém são necessários maiores estudos a respeito, levando-se também em consideração a influência de outros parâmetros.

2.1.2.1. Listeriose humana

A listeriose humana pode provocar estados patológicos no homem e nos animais. No ser humano, a *L. monocytogenes* é responsável por infecções oportunistas, que afetam preferencialmente idosos e indivíduos imunodeprimidos, como aqueles que se submeteram por longos períodos ao uso de corticosteróides e quimioterápicos (EIROA, 1989; NASCIMENTO, 1991; PEREIRA & ROCOURT, 1993; McLAUCHLIN, 1996). As

mulheres grávidas e recém nascidos também são afetados. Sabe-se que as grávidas, quando portadoras, desempenham um papel importante na epidemiologia da listeriose porque elas podem armazenar a bactéria no trato genital, sangue e infectar o feto por via transplacentária ou o recém nascido durante o parto (NASCIMENTO, 1991). Os alcoólatras, diabéticos, transplantados renais e aidéticos também compõem o grupo de risco (EIROA, 1989; NASCIMENTO, 1991; PEREIRA & ROCOURT, 1993; McLAUCHLIN, 1996). A ocorrência de listeriose relatada no período de 1986 à 1990 na França, mostrou que a população de risco seguiu a seguinte ordem decrescente: transplantados, aidéticos, grávidas, cancerosos e idosos (ROCOURT, 1996). O adulto sem imunodepressão conhecida também pode adquirir a doença (BILLE, 1986; NASCIMENTO, 1991; PEREIRA & ROCOURT, 1993; NASCIMENTO & CULLOR, 1994).

A listeriose humana manifesta-se normalmente como meningite, meningoencefalite, septicemia, abcessos, aborto ou parto pré-maturo (EIROA, 1989). Pode também apresentar-se com manifestações oculares como conjuntivite, que pode evoluir para meningite purulenta, acompanhada de alta taxa de mortalidade (EIROA, 1989). Outro tipo de manifestação da listeriose é a forma cutânea contraída principalmente por veterinários e fazendeiros pelo contato, ao toque de vacas infectadas ou outros tecidos contaminados, entretanto, é rara (EIROA, 1989; NASCIMENTO & CULLOR, 1994; McLAUCHLIN, 1996) e também, infecções adquiridas em hospitais (McLAUCHLIN, 1996) e manifestações respiratórias como pneumonias (EIROA, 1989). Um dos casos raros de listeriose, revisado por NASCIMENTO & CULLOR (1994), foi de um norueguês de 54 anos que desenvolveu uma infecção fatal por *L. monocytogenes*, com meningite e broncopneumonia. Acredita-se que o fazendeiro adquiriu a infecção pela inalação de *L. monocytogenes*.

monocytogenes durante a limpeza do estábulo de ovinos. Dois meses depois do incidente, foi diagnosticada listeriose em um ovino de sua fazenda, o qual desenvolveu encefalite. A cepa de *L. monocytogenes* isolada foi a mesma no ovino e no fazendeiro.

As mulheres grávidas apresentam, no início, sintomas semelhantes aos do resfriado benigno, febre, calafrios, dor de cabeça, dores nas costas (EIROA, 1989; NASCIMENTO & CULLOR, 1994). Um caso também revisado por NASCIMENTO & CULLOR (1994), foi de um bebê recém nascido que adquiriu listeriose através do leite materno. O mesmo leite foi fornecido a cães recém nascidos que também adquiriram listeriose. Um outro caso de transmissão rara de *L. monocytogenes* ocorreu através do equipamento de ressurreição que havia sido usado previamente por um recém nascido com listeriose. O outro bebê foi infectado após ter usado o mesmo aparelho e este incriminado como veículo da bactéria. De acordo com uma estimativa feita por EIROA (1989), a taxa de mortalidade por listeriose nos EUA é aproximadamente de 20%. Porém, em neonatos e indivíduos com mais de 60 anos, este número eleva-se para 30%. Foi estimada também que a taxa de portadores sãos é de aproximadamente 5%.

A dose mínima infectante ainda não está totalmente estabelecida. De acordo com a revisão feita por ROCOURT (1996), os estudos em macacos e ratos sugerem que diminuindo o nível de exposição poderá diminuir a doença clínica. Mas estes experimentos não afirmaram a dose infectante mínima para o homem. Com base nos casos esporádicos e surtos estima-se que a dose infectante seja baixa (EIROA, 1989; ROCOURT, 1996). ROCOURT (1996) em sua revisão, não exclui a possibilidade de doses muito baixas (<100 *Listeria monocytogenes/g* ou mL) serem infectantes. Todavia, na revisão feita por McLAUCHLIN (1996), os níveis de *L. monocytogenes* detectados ambos nos alimentos

lacrados e retalhados obtidos dos pacientes acometidos de listeriose, tinham níveis altos de células ($>10^3$ *L. monocytogenes*/g ou mL). De acordo com AZADIAN et al., (1989) em seu relato, uma paciente de 40 anos, sem comprometimento imunológico ingeriu queijo “Anary” e desenvolveu sintomas clínicos em menos de 24 horas. Supondo-se que ela tivesse comido 85g do queijo, contendo 3,0 a $5,0 \times 10^7$ células/g de queijo, foi estimado uma dose oral de 2,5 a $4,5 \times 10^9$ *L. monocytogenes*. Porém, tais observações devem ser vistas com cautela, pois o período entre o consumo e detecção no alimento contaminado devem ter resultados atenuados, visto que o organismo neste período pode vir a crescer ou morrer e também, pode haver diferenças devido aos métodos de recuperação celular utilizado para pesquisa de *L. monocytogenes* (ROCOURT, 1996).

Em decorrência de sua ampla disseminação na natureza, é possível assegurar que pessoas com e sem comprometimentos imunológicos entram em contato com *L. monocytogenes*. Visto que nem todas desenvolvem a doença, principalmente os indivíduos saudáveis, acredita-se que este fator se deve a susceptibilidade de cada hospedeiro, quantidade de inóculo e da virulência do microorganismo (EIROA, 1989; NASCIMENTO 1991; PEREIRA & ROCOURT, 1993; SILVA, 1997).

Acredita-se que a *L. monocytogenes* pode penetrar pela mucosa nasal, todavia, a mais provável rota de infecção ocorre através do intestino, na qual o microorganismo penetra na parede do trato gastrointestinal, alcançam os macrófagos e hematócitos, desenvolvem-se intracelularmente, rompem as células, ganhando a corrente linfática e em seguida, corrente sanguínea, podendo alcançar a placenta, baço, Sistema Nervoso Central e o figado. Existem evidências de que a secreção da exotoxina, listeriolisina O, seja de fundamental importância

para a penetração e desenvolvimento de *Listeria* nos tecidos (NASCIMENTO, 1991; PEREIRA & ROCOURT, 1993; LOW & DONACHE, 1997).

2.1.2.2. Surtos e casos esporádicos

Um dos relatos mais antigos de listeriose humana com a possível associação com alimentos, ocorreu em Halo, Alemanha, de 1949 a 1957, tendo o leite não pasteurizado como possível veiculador da *L. monocytogenes*.

De acordo com a revisão feita por McLAUCHLIN (1996) de duas décadas atrás, diferentes tipos de alimentos têm sido envolvidos em vários surtos e casos de listerioses em todo o mundo. Um grande surto de listeriose envolvendo vegetais (alface, tomate e aipo) ocorreu em Boston em 1979, causando 23 casos com cinco mortes (HO et al. 1986). Na Nova Zelândia, em 1980, ocorreu um surto de listeriose, possivelmente devido ao consumo de moluscos e peixes crus, resultando em 22 casos com cinco mortes (LENNON et al., 1984). Na Inglaterra, em 1988, ocorreu um caso envolvendo galinha cozida (KERR et al., 1984). Um outro caso, envolveu ova de bacalhau defumado, na Dinamarca, em 1989 (JENSEN et al., 1994). Na Itália e EUA, ambos em 1989, ocorreram casos esporádicos, envolvendo salsichas (CANTONI et al., 1989; ANON, 1990).

Um surto na Nova Escócia em 1981, devido ao consumo de vegetais (tipo salada de repolho) resultou em 18 mortes (SCHLECH et al. 1983). Neste surto, foram detectados 34 casos de listeriose perinatal e sete casos de listeriose em adultos imunologicamente normais. O sorotipo 4b foi isolado do sangue dos pacientes e da salada de repolho presente no refrigerador de uma das pacientes. Foi isolado também na indústria (na planta) a *L. monocytogenes*, sorotipo 4b, de dois pacotes fechados, pelo emprego das técnicas de

enriquecimento à frio. Por meio de rastreamento epidemiológico, constatou-se que um dos fazendeiros que fornecia repolho para esta indústria, usou adubo orgânico contendo esterco de ovelhas criadas no local, infectadas pela bactéria e que haviam morrido de listeriose anteriormente. O uso de repolhos contaminados, estocados à frio durante o inverno e no início da primavera, provavelmente permitiu que os microorganismos se multiplicassem em grande quantidade, dando origem aos elevados índices de contaminação do repolho.

Em Massachusetts, EUA, no ano de 1983, ocorreu um surto, desta vez envolvendo o leite pasteurizado integral e a 2% que, foi incriminado como veículo de transmissão. Ocorreram 49 casos com 14 mortes (FLEMING et al, 1985). Esse surto envolveu adultos com comprometimento do sistema imunológico e gestantes.

Dois grandes surtos de listeriose ocorreu na Califórnia em 1985 (LINNAN et al., 1988). Em um, teve como fonte de infecção queijo tipo mexicano, levando o aparecimento de 142 casos com 48 mortes. No outro, foram 86 casos de listeriose, dos quais 67% envolviam mulheres e seus bebês e foi isolados sorotipo 4b dos pacientes e de quatro pacotes de produtos “Jalisco”- queijo tipo frescal. Em outro grande surto, ocorrido no Reino Unido entre 1987 e 1989, foram relatados mais de 350 casos envolvendo o consumo de patê (MC LAUCHLIN et al., 1991). Na França, em 1992, foi descrito um surto tendo como veículo língua de porco com 279 casos de listeriose com 85 mortes (ROCOURT et al., 1993).

Relatos de um estudo feito por SCHUCHAT et al., (1992) e de uma revisão feita por NASCIMENTO & CULLOR (1994) indicaram que a maioria dos casos esporádicos de listeriose descritos, têm sido associados a diferentes tipos de queijos. Nos EUA, só em 1985, 314 casos de listeriose humana, foram notificados. Destes, 40 casos foram fatais e a

causa foi devido ao consumo de queijo mole, ou seja, queijo tipo frescal (LINNAN et al., 1988). Na Inglaterra, o queijo mole, tipo frescal, foi o veículo para um caso esporádico de listeriose, envolvendo uma mulher jovem (36 anos), sadia, e não gestante. O sorotipo 4b foi isolado do líquido cérebro-espinhal da paciente e do pacote de queijo que se encontrava aberto no refrigerador da mesma (BANNISTER, 1987). Todavia, não pode ser isolado de pacotes fechados do mesmo queijo, sugerindo que o refrigerador da paciente tivesse sido contaminado e fora a fonte de infecção. Um outro caso de meningite por *L. monocytogenes* envolvendo queijo tipo mole “Anary” produzido a partir de leite de cabra foi também relatado na Inglaterra. Foi isolada *L. monocytogenes*, sorotipo 4b, das fezes e líquido cérebro-espinhal da paciente, uma senhora de 40 anos não gestante sem comprometimento imunológico, e de quatro pacotes fechados da mesma partida do queijo suspeito. A paciente desenvolveu os sintomas em menos de 24 horas após ter comido o queijo (AZADIAN et al., 1989).

2.1.2.3. Alimento como via de transmissão

Nos últimos anos, vem se observando um crescente interesse, sobretudo por parte das indústrias de alimentos, na pesquisa de *L. monocytogenes*, tendo em vista sua comprovada relevância como patógeno emergente de origem alimentar, documentada pelos inúmeros surtos e casos esporádicos de listeriose que surgiram nas décadas de 80 e 90, acompanhados de alta taxa de mortalidade, envolvendo alimentos como veículos (SCHLECH et al., 1983; BANNISTER, 1987; LINNAN et al., 1988; AZADIAN et al., 1989; PEREIRA & ROCOURT, 1993; JENSEN et al., 1994; NASCIMENTO & CULLOR, 1994).

Saúde Pública, juntamente com as agro-indústrias vêm desenvolvendo estratégias para reduzir a sua quantidade durante o processamento, bem como para prevenir a recontaminação pós-processamento. A aplicação de um programa que permita o monitoramento de pontos críticos de controle de riscos “Hazard Analysis of Critical Control Point” (HACCP), vai assegurar a qualidade do produto final e, em consequência, prevenir o aparecimento de futuros casos de listeriose humana e outras doenças derivadas de outros patógenos (COX et al., 1989; NASCIMENTO, 1991; SILVA, 1997). Além do monitoramento visual para controle de limpeza e higiene dos equipamentos, na aplicação o programa de HACCP, são realizados também testes microbiológicos com intuito de rastrear possíveis fontes de contaminação que, uma vez localizado, devem ser imediatamente removidas. Devido a isso, tem-se estimado estudos para o desenvolvimento de novos métodos e meios de cultura para a sua detecção (PEREIRA & ROCOURT, 1994), inclusive o enriquecimento à frio, porém nenhum desses estudos foram conclusivos por possuírem limitações (FURLANETTO et al., 1996).

Felizmente, a maioria das pessoas sadias não são susceptíveis à listeriose, o que explica, de certa forma, o baixo poder de disseminação de *L. monocytogenes* neste grupo. Mesmo assim, os EUA (FDA) e o Brasil (BRASIL, 1997) têm adotado padrão zero de tolerância para presença de *L. monocytogenes* em alimentos. Já os países da Europa, como a Alemanha, têm sido mais tolerantes, permitindo um máximo de 100UFC/g para alguns alimentos (SILVA & TIBANA, 1995). Tal discordância tem gerado uma polêmica muito grande, considerando-se a dificuldade em conhecer a dose infectante desse microorganismo oportunista, diante de uma população de risco tão heterogênea (SILVA & TIBANA, 1995).

1994; SILVA & TIBANA, 1995; McLAUCHLIN, 1996; ROCOURT, 1996; FURLANETTO et al., 1996).

A freqüência destes surtos e casos esporádicos deve-se a larga distribuição ambiental, dessa bactéria, a sua capacidade de sobreviver em diferentes tipos de alimentos e condições adversas e, sobretudo, em temperatura de refrigeração (AZADIAN et al., 1989; EIROA, 1989; NASCIMENTO, 1991; PEREIRA & ROCOURT, 1993; NASCIMENTO & CULLOR, 1994; SILVA & TIBANA, 1995), sem gerar qualquer odor ou gás que possibilite qualquer suspeita visual de contaminação (NASCIMENTO, 1991). Um outro fator que tem influenciado para evolução da listeriose é decorrente às mudanças de hábitos ocorridas nos padrões sociais (PEREIRA & ROCOURT, 1993; ROCOURT, 1996, SILVA, 1997), sem haver diferenças entre raças e grupos étnicos (ROCOURT, 1996). Essas mudanças são devidas ao desenvolvimento da agroindústria alimentar através da expansão da cadeia de frio na estocagem de alguns alimentos de origem animal e vegetal aos níveis industrial, comercial e, mais recentemente, ao nível doméstico, através do uso de alimentos congelados prontos, semi-prontos ou crus para o consumo (COX et al., 1989; SILVA & TIBANA, 1995; McLAUCHLIN, 1996).

Dentre as medidas de controle de *L. monocytogenes* em alimentos destacam-se o uso adequado do calor, aplicação das práticas de higiene e a prevenção contra recontaminação do produto pós-preparo (COX et al., 1989; NASCIMENTO, 1991). Num estudo feito por ROCOURT (1996), sobre os surtos ocorridos na França, quase todos os casos humanos de listeriose causados por alimentos processados foram enquadrados como fortemente suspeitos de terem ocorrido por contaminações cruzadas. Ele relatou também uma similaridade nas contaminações comumente ocorridas na cozinha. Com isso, o órgão de

No Brasil, FURLANETTO et al. (1996), encontraram uma amostra de queijo positiva para *L. monocytogenes* e oito estavam contaminadas por *Listeria* sp., das 30 amostras de queijo frescal industrializados e comercializados em São Paulo. SILVA et al. (1998), isolaram *L. monocytogenes* a partir de queijos consumidos no Estado do Rio de Janeiro. Esses autores encontraram essa bactéria presente em sete amostras de queijo Minas frescal caseiro, uma amostra de queijo Minas e Ricota industrializados e três amostras em queijos maturados (Gorgonzola, Brie e Roquefort), todavia nenhuma ocorrência de listeriose foi relatada.

No Brasil, são poucos os relatos quanto ao isolamento de *Listeria* a partir de alimentos e mesmo quanto a sua implicação em termos de Saúde Pública. Segunda revisão feita por SILVA & TIBANA (1995), vários registros divulgados quanto ao isolamento de *L. monocytogenes* são em animais e ambiente – esgoto, supondo-se, entretanto, que o problema de listeriose no Brasil esteja sendo subestimado (SILVA & TIBANA, 1995). A prevenção da listeriose é extremamente difícil haja visto ser uma doença de baixa ocorrência (NASCIMENTO & CULLOR, 1994). A falta de informações epidemiológicas deixa lacunas nas medidas de prevenção e controle (NASCIMENTO & CULLOR, 1994). De acordo com o exposto, a presença de *L. monocytogenes* em um produto alimentar é suficiente para que o mesmo seja, automaticamente, considerado sem segurança para consumo (NASCIMENTO & CULLOR, 1994).

2.2. *Staphylococcus aureus*

2.2.1. Características do *Staphylococcus aureus*

O *S. aureus* foi descrito pela primeira vez em 1878, por ROBERT KOCK a partir de pús humano. Em 1880, o cirurgião escocês, Alexander Ogston, em suas publicações, relatou que *coccus* em formato de cacho de uva, eram a causa de um grande número de doenças piogênicas no homem. Subseqüentemente, em 1882, ele chamou este organismo de *Staphylococcus*, nome derivado da palavra grega *staphylé*, que tem o significado de cacho de uva (BAIRD-PARKER, 1990).

Segundo a nona edição do Manual Bergey's, atualmente, 28 espécies e outras sub-espécies foram descritas em base nos estudos de homologia de DNA e características bioquímicas e imunoquímicas (HOLT et al., 1994). Destas, somente 16 espécies são encontradas em humanos (MURRAY et al., 1998).

Segundo HOLT et al. (1994), o *S. aureus* tem 0,5 a 1,5 μ m de diâmetro; pode aparecer de forma isolada, em pares, cadeias curtas ou em cachos. É Gram positivo, imóvel, não produz esporos, catalase positivo e anaeróbico facultativo o que o diferencia dos *Micrococcus* que só crescem em aerobiose. É quimiorganotrófico, com ambos metabolismo respiratório e fermentativo, e geralmente oxidase negativa. Comumente não produz cápsulas, no entanto, algumas cepas podem apresentar cápsulas, especialmente em culturas jovens. Como as exigências nutricionais são poucas, os *Staphylococcus* spp. crescem bem nos meios de cultura comuns como o caldo e ágar simples. As bactérias pertencentes a este gênero são tolerantes a concentração de 10% de NaCl e também a nitritos, permitindo

assim seu crescimento, mesmo em alimentos curados (MURRAY et al., 1998). Crescem na faixa de pH 4,0-10, porém crescem melhor em pH em torno de 7,0 (BAIRD-PARKER, 1990).

O *Staphylococcus* spp. é uma bactéria mesófila, apresentando temperatura de crescimento na faixa de 6,7°C (ANGELOTTI, 1961) a 48°C, com uma temperatura ótima para crescimento de 37°C (BAIRD-PARKER, 1990). Os *S. aureus* produz enterotoxinas a temperaturas entre 10-48°C e pH na faixa de 4,0-9,6, todavia o pH ótimo para produção é 7,0. Apresenta crescimento ótimo entre 40-45°C (GENIGEORGIS, 1989; BAIRD-PARKER, 1990).

Segundo a nona edição do Manual Bergey's (HOLT et al., 1994), somente as espécies *S. aureus*, *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. schleiferi coagulans* e algumas cepas de *S. hyicus* são coagulase positiva. A maioria das espécies de *Staphylococcus* são coagulase negativa. Estas não são reconhecidas como importante causa de doenças (GENIGEORGIS, 1989), mas sabe-se que algumas também podem produzir enterotoxinas (GENIGEORGIS, 1989; BAIRD-PARKER, 1990) e podem ser isoladas nos alimentos uma vez que tanto o homem quanto os animais são portadores usuais destas estirpes (PEREIRA et al., 2000).

O *S. aureus* produz três toxinas, dentre elas as enterotoxinas, que são reconhecidas como responsáveis pela intoxicação alimentar. As enterotoxinas do *S. aureus* formam um grupo de cinco proteínas extracelulares sorologicamente distintas, designadas A, B, C, D e E, sendo que a enterotoxina C se divide em três subtipos: C₁, C₂ e C₃ (ARBUTHNOTT et al., 1990; BETLEY & HARRIS, 1994; MURRAY et al., 1998). As enterotoxinas são produzidas entre 10°C-48°C, com temperatura ótima de produção entre 40°C-45°C

assim seu crescimento, mesmo em alimentos curados (MURRAY et al., 1998). Crescem na faixa de pH 4,0-10, porém crescem melhor em pH em torno de 7,0 (BAIRD-PARKER, 1990).

O *Staphylococcus* spp. é uma bactéria mesófila, apresentando temperatura de crescimento na faixa de 6,7°C (ANGELOTTI, 1961) a 48°C, com uma temperatura ótima para crescimento de 37°C (BAIRD-PARKER, 1990). Os *S. aureus* produz enterotoxinas a temperaturas entre 10-48°C e pH na faixa de 4,0-9,6, todavia o pH ótimo para produção é 7,0. Apresenta crescimento ótimo entre 40-45°C (GENIGEORGIS, 1989; BAIRD-PARKER, 1990).

Segundo a nona edição do Manual Bergey's (HOLT et al., 1994), somente as espécies *S. aureus*, *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. schleiferi coagulans* e algumas cepas de *S. hyicus* são coagulase positiva. A maioria das espécies de *Staphylococcus* são coagulase negativa. Estas não são reconhecidas como importante causa de doenças (GENIGEORGIS, 1989), mas sabe-se que algumas também podem produzir enterotoxinas (GENIGEORGIS, 1989; BAIRD-PARKER, 1990) e podem ser isoladas nos alimentos uma vez que tanto o homem quanto os animais são portadores usuais destas estirpes (PEREIRA et al., 2000).

O *S. aureus* produz três toxinas, dentre elas as enterotoxinas, que são reconhecidas como responsáveis pela intoxicação alimentar. As enterotoxinas do *S. aureus* formam um grupo de cinco proteínas extracelulares sorologicamente distintas, designadas A, B, C, D e E, sendo que a enterotoxina C se divide em três subtipos: C₁, C₂ e C₃ (ARBUTHNOTT et al., 1990; BETLEY & HARRIS, 1994; MURRAY et al., 1998). As enterotoxinas são produzidas entre 10°C-48°C, com temperatura ótima de produção entre 40°C-45°C

(GENIGEORGIS, 1989; BAIRD-PARKER, 1990). Entretanto, segundo WENDPAP & ROSA (1993), as enterotoxinas tornam-se evidentes em 4-6 horas, a 18°C. Os extremos de temperatura estão na dependência dos demais parâmetros que devem encontrar-se em condições ótimas (BERGDOLL, 1989; HALFIN-DOHNALER & MARTH, 1989). As enterotoxinas são produzidas na faixa de pH 4,0-9,6, todavia a produção é ótima no pH 7,0 (GENIGEORGIS, 1989; BAIRD-PARKER, 1990). Quanto a termoresistência, as enterotoxinas resistem à fervura de 20 a 60 minutos, podendo manter-se ativas até mesmo após autoclavação à 120° C por 15 minutos (BAER, 1976; FURLANETTO et al., 1987; WENDPAP & ROSA, 1993). A enterotoxina A cresce numa faixa de temperatura mais variada do que as toxinas B e C (BAIRD-PARKER, 1990).

As enterotoxinas A e D são as mais comuns (BAIRD-PARKER, 1990), principalmente a A, nos casos de intoxicação alimentar (BETLEY & HARRIS, 1994; SENA, 2000). Segundo MERRILL et al. (1984) e HARBRECHT & BERGDOLL (1980), a enterotoxina B é raramente envolvida com intoxicação alimentar, exceto em casos especiais semelhantes tais como ovo cozido duro. Entretanto, a enterotoxina B tem sido encontrada em surtos causados por queijos contaminados (CARMO & BERGDOLL, 1990; PEREIRA et al., 1991; SABIONI et al., 1994).

A intoxicação alimentar causado pelo *S. aureus* é mais caracterizado por uma toxemia do que por uma infecção (MURRAY et al., 1998). A doença é causada pela ingestão do alimento contaminado pela pré-toxina e não pelo efeito direto da bactéria (MURRAY et al., 1998). Após a ingestão do alimento contaminado com a toxina pré-formada, o desenvolvimento dos sintomas de vômito, diarréia, dores abdominais, eventualmente dor de cabeça e prostatite e surgem rapidamente (BETLEY & HARRIS,

1994; MURRAY et al., 1998). O período de incubação é de 30 minutos à oito horas (BETLEY & HARRIS, 1994), todavia a média varia entre 2-6 horas (ARBUTHNOTT et al., 1990; PEREIRA et al., 1996). Esta rapidez é decorrente da ingestão da toxina já pré-formada e não a sua produção após a ingestão (MURRAY et al., 1998). Calcula-se que a ingestão de apenas 1 µg da toxina de *S. aureus* seja suficiente para o desenvolvimento dos sintomas no homem (GENIGEORGIS, 1989). Contudo, tem se encontrado dificuldades no esclarecimento do modo de ação das enterotoxinas porque a ação emética só pode ser induzida no homem e macaco (KOKAN & BERGDOLL, 1987; ARBUTHNOTT et al. 1990). É de amplo conhecimento que ambos, epitélio intestinal e centro do vômito do SNC são envolvidos (HUMPHREYS et al., 1989; BAIRD-PARKER, 1990; BETLEY & HARRIS, 1994). Entretanto, os sintomas variam com o grau de suscetibilidade e peso do indivíduo, concentração da enterotoxinas no alimento e a quantidade do alimento consumido (BAIRD-PARKER, 1990). As enterotoxinas são resistentes as enzimas proteolíticas do trato intestinal do homem (GENIGEORGIS, 1989; MURRAY et al., 1998), exceto a pepsina em pH menor do que 2,0 (GENIGEORGIS, 1989). As proteases produzidas por algumas bactérias ácido láticas podem destruir as enterotoxinas. As toxinas são resistentes a desidratação, pH>2,0 e <12,0 e podem permanecer ativas em certos alimentos por anos (GENIGEORGIS, 1989).

A multiplicação de *S. aureus* e a liberação de enterotoxinas estão associadas, porém existem controvérsias quanto ao número de *S. aureus* por grama necessário para o início da produção de enterotoxinas. De acordo com GELLI & MARTINS (1986), em condições favoráveis, verifica-se que a presença de *S. aureus* em torno de 10^5 UFC/g a 10^6 UFC/g do

produto está associada à liberação de enterotoxinas em quantidade capaz de afetar o homem, desde que a cepa em questão seja capaz de produzi-la. Porém, CAMPOS (1980) em sua revisão, relatou surtos de intoxicação alimentar com a presença de 10^6 UFC/g a 10^9 UFC/g e 10^5 UFC/g como nível mínimo para que as cepas enterotoxigênicas produzam enterotoxinas e causem a doença. SILVA et al. (1981), verificaram que havia produção de enterotoxinas em intervalos da população de *S. aureus* entre 10^4 UFC/g a 10^5 UFC/g e 10^6 UFC/g, respectivamente. CARMO & BERGDOLL (1990) constataram produção de enterotoxina com 10^6 UFC/g, PEREIRA et al. (1991) em população de 10^7 UFC/g de *Staphylococcus* sp. *Staphylococcus* sp. e PEREIRA et al. (1996), em população 10^8 UFC/g de *Staphylococcus* sp. FURLANETTO et al. (1987) e CAMPOS (1980) relataram que o potencial para causar toxinfecção estafilocócica não pode ser assegurado somente por elevados números de *S. aureus* no alimento, uma vez que a simples determinação populacional do mesmo para se estabelecer a presença ou não de enterotoxinas é de valor limitado, devido a toxina ser termoestável e uma vez produzida persistir em alimentos aquecidos ou fermentados mesmo em queijos elaborados a partir de leite pasteurizado, enquanto as células viáveis declinam em número, atingindo níveis não detectáveis.

Trabalhos realizados por BAIRD-PARKER (1990), WENDPAP & ROSA (1993), PEREIRA et al. (1991) mostraram que ao comparar os meios seletivos, as técnicas de enumeração e isolamento variavam entre si devido ao seu maior ou menor grau de seletividade. WENDPAP & ROSA (1993) afirmaram que os agentes seletivos, comumente utilizados para detecção e enumeração do índice de *S. aureus* no meio, são geralmente inibitórios à recuperação de bactérias estressadas o que poderia subestimar a quantidade de células necessárias para possibilitar a produção de enterotoxinas.

2.2.1.1. Fatores que afetam o crescimento e a produção de enterotoxinas

De acordo com a revisão feita por WENDPAP & ROSA (1993), há vários fatores que afetam o crescimento e a produção de enterotoxinas, além da detecção de *S. aureus*. Entre os fatores de maior relevância estão o estado fisiológico do organismo, a posição competitiva do *S. aureus* nas amostras e limitações do meio de isolamento. Experimentos têm sido feitos para observar os fatores que afetam o crescimento e a produção de enterotoxinas. De um modo geral, os *Staphylococcus* sp. triplicam nas primeiras 24 horas após a fabricação do queijos (SPAHR & URL, 1994; PINTO et al., 1996), contudo, não se multiplicam durante a fase de maturação em diferentes tipos de queijos (SANTOS & GENIGEORGIS, 1981; OTERO et al., 1988; BARBOSA et al. 1993; SPAHR & URL, 1994). BARBOSA et al. (1993) observaram também, que a contagem de *S. aureus* na massa era maior em queijo prato que a encontrada no soro e resultados semelhantes foram obtidos por MINOR & MARTH (1972), porém em queijo tipo Colby.

OTERO et al. (1988) concluíram que o queijo frescal é ótimo para crescer *Staphylococcus* sp. devido as suas características: pH alto, umidade alta, concentração de ácido lático baixa e baixa concentração de NaCl. O *S. aureus* não é um bom competidor (GILMOUR & HARVEY, 1990). Numa revisão feita por GENIGERORGIS (1989), foi relatado que o organismo quando inoculado em concentrações iniciais alta, é capaz de crescer e produzir enterotoxinas dentro das mais diversas condições, enquanto, que em baixas concentrações, é mais exigente para crescer e desenvolver toxina. SANTOS & GENIGEORGIS (1981), observaram que ao acrescentar leite pasteurizado na elaboração do queijo Minas frescal, sem cultura "starter", havia mais crescimento de *S. aureus* com maior

produção de enterotoxina do que no queijo com cultura "starter". De acordo com SANTOS & GENIGEORGIS, 1981; GILMOUR & HARVEY, 1990; PINTO et al., 1996, as culturas starter são potentes inibitórios (antagonistas) para *S. aureus*, por aumentar a acidez, decorrente da produção de ácidos e H₂O₂ e consequentemente baixar rapidamente o pH. SANTOS & GENIGEORGIS (1981) também observaram que o crescimento de *S. aureus* era maior em queijo Minas feito a partir de leite pasteurizado do que leite cru. Sendo assim, a ocorrência de *S. aureus* em alimento cru é reduzida devido à competição entre os microorganismos presentes (GENIGERORGIS, 1989; PINTO et al., 1996). Uma vez crescido no alimento, essa bactéria se desenvolve normalmente e produz enterotoxinas. Segundo GILMOUR & HARVEY (1990), o leite deve ser tratado com "Ultra High Temperature" (UHT) ou utilizar pasteurização rápida e, mesmo assim, a enterotoxina, por ser termoresistente, poderá permanecer inalterada. O pH dos queijos, em geral varia de 4,0-6,5 (PINTO et al., 1996) e de 4,9-5,9 (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

O *S. aureus* não cresce em produtos com altos níveis de gordura (GILMOUR & HARVEY, 1990). É também capaz de crescer em Aw de 0,86 (GENIGEORGIS, 1989), podendo tolerar Aw de 0,84 (FRANCO & LANDGRAF, 1996). Entretanto, foi demonstrado que não somente a Aw baixa mas também, o modo de ajustagem da Aw nos alimentos influencia na viabilidade e crescimento da bactéria (TATTINI et al., 1973). À medida que se eleva a concentração de sal, ou se reduz a atividade de água, preserva-se a capacidade de multiplicação da bactéria, mas inibe-se a produção de enterotoxinas (FERNANDEZ-ESCARLETIN et al., 1983). Em temperatura ambiente, o *S. aureus* tem um potencial muito grande de crescer e produzir enterotoxinas (BARBOSA et al., 1993). Há redução do número de *S. aureus* na fase de maturação dos queijos, entretanto esta redução depende da

temperatura, sendo lenta em temperaturas baixas (PINTO et al., 1996). A produção de enterotoxinas é mais sensível do que a de crescimento nos decréscimos de temperaturas de alimentos estocados (GENIGEORGIS, 1989), não deixando, entretanto, de haver a possibilidade de crescimento em temperaturas mais baixas (GENIGEORGIS et al., 1969).

2.2.2. Epidemiologia e importância em Saúde Pública

Os *Staphylococcus* sp. estão bem adaptados na pele dos animais de sangue quente (BAIRD-PARKER, 1990) e no homem (MURRAY et al., 1998). O *S. aureus* e *Staphylococcus* sp. coagulase negativa são também encontrados na região orofaríngea (BAIRD-PARKER, 1990; MURRAY et al., 1998), trato gastrointestinal e trato urogenital (BAIRD-PARKER, 1990; MURRAY et al., 1998). Segundo MURRAY et al. (1998), 15% dos adultos no homem (MURRAY et al., 1998). Numa revisão feita saudáveis possuem *S. aureus* persistentemente, na região nasofaríngea. Numa revisão feita por GENIGEORGIS (1989), foram relatados que 10-50% das pessoas saudáveis possuem *S. aureus* na cavidade nasal e pacientes e pessoas que trabalham em hospital têm uma prevalência de 60-80%. Cerca de 5-40% das pessoas saudáveis eliminam pequeno número de *Staphylococcus* sp. (<500UFC/g) nas fezes (GENIGEORGIS, 1989). As cepas que estão presentes no nariz podem passar para as mãos, dedos, rosto, pele e podem vir a contaminar o ar, água, solo, esgoto, alimento, principalmente o leite, e qualquer superfície ou objeto que tenha entrado em contato com o portador (GENIGEORGIS, 1989; MURRAY et al., 1998). O número de *Staphylococcus* sp. presente na região nasal varia consideravelmente de indivíduo para indivíduo e a mesma cepa pode permanecer por meses no mesmo indivíduo, enquanto que em outro pode permanecer por uma semana ou menos (GENIGEORGIS, 1989). MINOR & MARTH (1976), relataram que 5-80% das pessoas

que trabalham com alimentos têm *Staphylococcus* sp. na pele e ROSKEY & HAMDY (1972), isolaram *Staphylococcus* spp. em 40% das mãos de trabalhadores (manipuladores) que tinham contato direto com carne de ave. Segundo BRYAN (1976), os animais também são reservatórios importantes de *Staphylococcus* sp. Segundo GENIGEORGIS (1989), o *Staphylococcus* sp. pode sobreviver ao processamento, pois em um de seus relatos, um pedaço de carne, que fora utilizado para fazer bacon estava com uma lesão e causou intoxicação alimentar. Nos bovinos, o *S. aureus* tem sido encontrado na cavidade nasal (5%) (BRYAN, 1976) e na pele do úbere com uma freqüência média de 38% (MINOR & MARTH, 1976). A alta freqüência de infecção inaparente de úbere tem contribuído extensivamente para alta ocorrência *S. aureus* em leite cru em todo mundo (GILMOUR & HARVEY, 1990).

De acordo com a revisão feita por PINTO et al. (1996), em Ribeirão Preto, São Paulo, 92,3% das amostras de queijos Minas apreendidas pela Vigilância Sanitária da prefeitura local, entre 1989 e 1990, estavam em desacordo com os padrões físico-químicos e microbiológicos, sendo encontrados *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* sp., clostrídios redutores, coliformes, bolores e leveduras. Exames realizados por RODRIGUES et al. (1995), com queijos Minas frescal, coletados de bares, supermercados, padarias e feiras livres da cidade de Viçosa, Minas Gerais, sendo 78,5% provenientes de fazenda e 21,5% de laticínios, revelaram os seguintes níveis médios de contaminação: $3,2 \times 10^7$ UFC/g para mesófilos totais. Esses resultados indicaram *Staphylococcus* sp. e $2,8 \times 10^9$ UFC/g para mesófilos totais. Na cidade do Rio de Janeiro, RODRIGUES et al. (1995), elevados de *Staphylococcus* sp. Na cidade de Rio de Janeiro, RODRIGUES et al. (1995), relataram que 38,4%, das amostras de queijo Minas frescal examinadas, apresentavam *S.*

aureus. FRANCO & ALMEIDA (1992), num estudo feito com queijo parmesão ralado, na cidade de Niterói, Rio de Janeiro, encontraram contagem de *S. aureus*, variando de $1,5 \times 10^2$ a $3,1 \times 10^3$ UFC nas amostras analisadas de queijo ralado, vendido a granel, sugerindo, como causa das contaminações por esta bactéria, as baixas condições inadequadas de manipulação, limpeza e desinfecção.

Em estudos recentes, CORBIA et al.,(1998) relataram, além da presença de *S. aureus* (22,22%), a ocorrência de *Micrococcus* sp. (33,33%) em queijo Minas frescal. A presença de *Micrococcus* sp. em queijos torna-se de importância, pelo fato dessa bactéria pertencer ao grupo das bactérias deteriorantes de alimentos (PARDI et al., 1996). Os *Micrococcus* sp. são bactérias oportunistas, consideradas como flora contaminante da pele, podendo facilmente contaminar os alimentos (GENIGEORGIS, 1989; BAIRD-PARKER, 1990; MURRAY et al., 1998).

A intoxicação alimentar abrange todas as classes sociais e em todo o mundo (ARBUTHNOTT et al., 1990). Dentre as bactérias passíveis de serem encontradas no leite, pode-se destacar o *S. aureus*, já que vários fatores propiciam condições favoráveis para contaminação deste alimento, tais como, a sua ubiqüidade na natureza, o baixo nível sócio-econômico dos ordenhadores, muitas vezes portadores assintomáticos de microorganismo patogênico e possuidores de maus hábitos higiênicos (GILMOUR & HARVEY, 1990; PINTO et al., 1996) e também pela elevada prevalência de *S. aureus* como agente etiológico da mastite bovina no mundo (GILMOUR & HARVEY, 1990). Segundo BANSAL et al. (1994), mais de 30% das mastites clínicas e subclínicas são causadas por *S. aureus*.

O queijo é um dos produtos mais envolvidos em surtos de intoxicação alimentar no mundo (BERGDOLL, 1989). No Brasil, o queijo Minas é um alimento tradicional (PINTO et al., 1996), podendo ser produzido de forma artesanal e industrial. A matéria-prima utilizada, do ponto de vista higiênico-sanitário, nem sempre é de boa qualidade pois de acordo com a revisão feita por SENA (2000) a contagem microbiana média de *S. aureus* em leite cru no Brasil, está em torno de 10^5 UFC/g. Numa revisão feita por PINTO et al. (1996), foi relatado que estudos realizados com queijo Minas, produzido artesanalmente, apresentava fosfatase na totalidade das amostras examinadas, comprovando a utilização do leite cru como matéria-prima. Deve-se destacar, que no artigo 600 do Regulamento do Serviço de Inspeção Federal (RIISPOA), “só é permitida a fabricação de queijos frescos e moles a partir de leite pasteurizado” (PINTO et al., 1996). No entanto, PINTO et al. (1996) e GONÇALVES (1998), afirmam que o fato é extremamente preocupante, pois o leite cru constitui importante via de transmissão para inúmeros agentes etiológicos de enfermidades zoonóticas. WENDPAP & ROSA (1993) relataram que a presença de *S. aureus* é freqüente nos queijos produzidos de maneira artesanal, pois o processamento de queijo Minas em nível artesanal não obedece às normas industriais, bastando para tal, poucos utensílios e certas regras de higiene.

Alguns autores (WENDPAP & ROSA, 1993; PINTO et al., 1996) afirmam que o queijo Minas frescal produzido dentro do setor industrial também pode oferecer risco. Embora o processo de pasteurização assegure a destruição das linhagens de *S. aureus* originalmente presentes no leite cru, essa bactéria poderá ser encontrada em leite pasteurizado, se houver alguma falha durante o processamento ou após processamentos e/ou acondicionamentos ~~após~~ preparo em temperatura inadequada. Deste modo, PINTO et

al. (1996) concluiram que o queijo Minas assume considerável importância em Saúde Pública, dadas as suas condições peculiares de produção, exigindo maior atenção por parte dos órgãos oficiais, principalmente no que concerne ao controle higiênico-sanitário do produto.

2.2.3 Surtos e casos esporádicos

Conforme a revisão feita por BAIRD-PARKER (1990), o primeiro relato de intoxicação alimentar por *Staphylococcus* sp. foi provavelmente descrito por Vaughn e Stekneberg em 1884 a partir de um grande surto da doença em Michigan (EUA). Os queijos contaminados com *Staphylococcus* foram considerados como a provável fonte de intoxicação. Posteriormente, BARBER (1914) demonstrou que o *Staphylococcus* spp. era capaz de causar intoxicação alimentar em consequência do consumo de leite de vacas acometidas de mastite estafilocócica. Desde então, o *S. aureus* tem sido o organismo mais comumente envolvido e bastante difundido em todo o mundo nas intoxicações alimentares causadas pelos diversos tipos de alimentos (BAIRD-PARKER, 1990). A freqüência de intoxicação alimentar por *S. aureus* é subestimada porque a maioria dos casos não são notificados (TODD, 1989; BETLEY & HARRIS, 1994). Nos EUA, 54-70% das notificações de surtos feitas ao "Center for Disease Control", ficam sem esclarecimento da etiologia do surto porque os dados epidemiológicos ou análises laboratoriais são insuficientes (BETLEY & HARRIS, 1994). A maioria dos sintomas, vômito e diarréia, são de curta duração e, com isso, grande parte dos afetados não procuram médicos (BERGDOLL, 1979). Somente nos últimos anos há relatos oficiais, de importância na Saúde Pública, com intoxicação alimentar por *S. aureus*, em muitas cidades do Brasil. Com

o resultado de várias investigações de surtos, tem sido possível detectar a presença de *Staphylococcus* no alimento, estabelecer o tipo de alimento envolvido, a enterotoxina formada e o número de microorganismo (WEINEKE et al., 1993).

Nos EUA, durante o período de 1975 à 1979, dos 540 surtos de intoxicação alimentar, registrados nos "Center for Disease Control", 153 foram por *S. aureus*. A temperatura abusiva, ou seja, a temperatura imprópria para manter os alimentos foi o fator primário que contribuiu para os surtos de intoxicação alimentar por *S. aureus* (SMITH et al., 1983). Conforme a conclusão feita por SABIONI et al. (1994), mesmo possuindo energia elétrica abundante, uma grande disponibilidade de equipamentos para refrigerar e aquecer alimentos, e uma população com um nível de educação relativamente alto, a intoxicação alimentar é ainda um problema presente nos EUA. Numa revisão feita por WEINEKE et al. (1993), no período de 22 anos (1969-1990) no Reino Unido, 44% das doenças de origem alimentar, examinadas pelo "Food Hygiene Laboratory", tiveram como causa a intoxicação alimentar por *S. aureus*. Do total, 359 incidentes (4836 casos) foram investigados, sendo 325 originados da Inglaterra e Países de Gales, 27 da Escócia, seis da Irlanda do Norte e um das Ilhas de Channel. Dos 359 incidentes, foram 193 surtos generalizados, 86 surtos familiares e 45 casos esporádicos, sendo que 35 incidentes ficaram sem maiores esclarecimentos por falta de informações detalhadas. Esses autores relataram que 170 incidentes, ou seja, metade, ocorreram nos meses mais quentes do ano (junho, julho e agosto) e a outra metade, 163 incidentes, ocorreram nos outros nove meses do ano. Os locais mais envolvidos com os incidentes foram as casas privadas, correspondendo a um terço dos casos, em seguida, por ordem decrescente, lugares não identificados, restaurantes, shopping, escolas, hospitais, recepções de casamentos, cantinas, intituições, festas e

fábricas. Vários tipos de alimentos foram implicados nos 359 incidentes relatados. Dentre eles, 53% foram causados por carnes e produtos cárneos contaminados, a maioria com presunto; 22% foram com aves e derivados, a maioria com galinha cozida fria; 7% com peixes e frutos do mar; 8% com leites e derivados e 3,5% com ovos. O número de microorganismos chegou a $1,5 \times 10^{10}$ UFC/g e a média foi de $3,0 \times 10^3$ UFC/g. Setenta e nove por cento das cepas isoladas eram produtoras da enterotoxina A isolada ou associada com outra enterotoxina. A intoxicação alimentar é raramente fatal, porém ocorreram cinco mortes neste período de 22 anos, onde todas as vítimas eram idosas.

SABIONI et al. (1988) identificaram o queijo Minas contaminado com *S. aureus* como causa de um surto de envenenamento alimentar em quatro pessoas de uma mesma família, das quais duas tiveram internação hospitalar. Foram encontradas as toxinas A, B, D e E, sendo 80% do tipo A. Além do *S. aureus*, o número de coliformes fecais no queijo consumido excedia os padrões.

CARMO & BERGDOLL (1990) registraram na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, 18 surtos nos anos de 1989-1990 envolvendo 60 pessoas e os alimentos envolvidos foram 10 amostras de queijos e oito amostras de bolos recheados. Os alimentos apresentaram variação de 10^4 - 10^8 UFC/g na contagem para *Staphylococcus* spp. e foram detectadas linhagens de *Staphylococcus* enterotoxigênicos do tipo A e B. O autor afirma que estes cremes são facilmente contaminados por *Staphylococcus* por serem bastante manipulados e geralmente, após a sua confecção, são deixados a temperatura ambiente por várias horas, com o tempo adequado para o crescimento de *Staphylococcus* e produção de enterotoxinas além do clima quente que, no Brasil também contribui para o seu crescimento. Sendo assim, CARMO & BERGDOLL (1990) concluíram que a refrigeração



é a melhor forma de controlar esta situação, pois o *Staphylococcus* spp. crescem muito pouco em baixas temperaturas.

SABIONI et al. (1994) identificaram um surto causado por queijo Minas frescal procedente de uma fazenda próxima a Ouro Preto, Minas Gerais, produzido a partir de leite cru e comercializado pelo próprio fabricante, sem refrigeração. Neste surto, foram relatados 11 casos, com três pessoas hospitalizadas e com um período de incubação médio de 3h e 30min. Os dados microbiológicos, os sintomas observados (vômito, diarréia, cólica, dor abdominal e náusea) e o período de incubação indicaram que o *S. aureus* era o agente etiológico do surto.

PINTO et al. (1996) em sua revisão, relataram que dos 21 surtos de envenenamento alimentar em 11 municípios do Estado de Minas Gerais, entre 1992 e 1994, o queijo Minas, incluindo o tipo frescal, foi o principal alimento envolvido nos surtos. Duzentos e dezoito pessoas entre 239 expostos (91,3%) apresentaram sintomatologia característica e 49 (20,5%) foram hospitalizadas. As más condições higiênico-sanitárias dos queijos ficaram evidentes pela sua alta contaminação por coliformes fecais, pois 61,9% das amostras apresentaram valores entre 10^3 e 10^5 NMP/g. Nenhuma amostra revelou a presença de *Salmonella* spp., mas o *S. aureus* foi encontrado em 85,7% das amostras, sendo apontado como o agente etiológico potencial dos surtos analisados, com evidente participação da toxina pré-formada no alimento.

PEREIRA et al. (1996) relataram um surto em Minas Gerais em sete pessoas de uma família. Todos apresentaram sintomas de vômito e diarréia quatro horas após terem comido queijo Minas frescal. A contagem de *Staphylococcus* spp. no queijo foi de 10^8 UFC/g, suficiente para produção de enterotoxinas. Ao usar métodos mais sensíveis a exemplo de

ELISA RIDASCREEN, para detecção de enterotoxinas, foi isolada a enterotoxina H, (SU & WONG, 1995).

TABELA 1. Características diferenciais das espécies de *Listeria*.

Características	<i>Listeria</i>					
	<i>monocytogenes</i>	<i>innocua</i>	<i>seeligeri</i>	<i>ivanovii</i>	<i>welshimeri</i>	<i>grayi</i>
β-hemólise	+	-	+	+	-	-
Test CAMP	+	-	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	+	-	-	+	-	-
<i>R. equi</i>	-	-	-	-	-	-
Fermentação de:						
Glicose	+	+	+	+	+	+
Raminose	+	v	-	+	+	-
Xilose	-	-	-	-	+	ND
Manose	+	+	-	-	-	+
Manitol	-	-	-	-	-	V
Red. de nitrato	-	-	-	+	-	-
Patogenicidade em camundongos	+	-	-	-	-	-

Fonte: Adaptado de Seeliger & Jones, 1986.

(+) positivo; (-) negativo; (v) variável; (ND) não definido.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem

O Estado do Rio de Janeiro é dividido em microrregiões. Para o presente estudo, escolheu-se aleatoriamente duas delas: Vale do Paraíba Fluminense e Grande Rio. O Vale do Paraíba Fluminense é composto pelos seguintes municípios: Barra Mansa, Itatiaia, Pirai, Resende, Rio Claro e Volta Redonda. Enquanto o Grande Rio é composto por Duque de Caxias, Itaboraí, Magé, Maricá, Nilópolis, Niterói, Nova Iguaçú, Rio de Janeiro, São Gonçalo e São João de Meriti. Devido ao fato de algumas marcas desaparecerem do mercado e, principalmente, pela falta de recursos e dificuldade para locomoção para as localidades, adicionou-se os municípios de Seropédica, Barra do Piraí e Valença com intuito de contemplar o número necessário de amostras de queijo tipo Minas frescal disponíveis para consumo (queijos come sem Serviço de Inspeção Federal).

O número representativo de queijos foi calculado de acordo com o método de amostragem previamente descrito (DIGIACOMO & KOEPSELL, 1986), usando-se a média das prevalências de *L. monocytogenes* em queijos, descritas na literatura (BECKERS et al., 1987; ARCHER, 1988; MASSA et al., 1990), uma vez que a prevalência para *S.*

aureus é maior e, sendo assim, estaria representada dentro da amostragem calculada para *Listeria*. De acordo com essa amostragem, foram analisadas 59 amostras de queijos no período de maio de 1998 à maio de 1999. Além disso, também houve uma variação no número de queijos analisados, em relação às bactérias pesquisadas, uma vez que os diferentes cultivos foram introduzidos no trabalho, à medida que se adquiria cada meio específico.

As amostras foram obtidas com a embalagem intacta, as quais eram acondicionadas em caixas de isopor com gelo até a chegada ao laboratório de Segurança de Alimentos, localizado no Projeto Sanidade Animal (PSA), convênio entre a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, onde foram identificadas e colocadas em refrigerador até o momento do uso.

3.2. Métodos

3.2.1. Isolamento e identificação de *Listeria monocytogenes*

Uma amostra de 25g de cada queijo, após pesagem asséptica, foi liquidificada assepticamente, por dois minutos, com 225mL de Caldo de Enriquecimento (EB) suplementado com antibióticos (Apêndice), obtendo-se a diluição 10^{-1} , e incubada à 30°C, de acordo com o método de enriquecimento a frio, descrito anteriormente (LOVETT, 1988), com pequenas modificações (FIGURA 1). Após 24 horas, realizou-se dois procedimentos:

a) Inoculou-se 0,1mL, com auxílio de pipeta automática “(P200), peptman/GILSON”, em duplicita, em placas contendo respectivamente meios de “Lithium Phenylethanol Modifield” (LPM) e “McBride Agar” (MMA) e, em seguida, espalhou-se o inoculado com auxílio da alça de Drigalski e mesa giratória. Após o cultivo, as placas foram invertidas e incubadas à 37°C, por 24-48 horas, e examinadas para a presença de colônias suspeitas de *Listeria* spp.

b) Fez-se transferência, com auxílio da pipeta automática “(P1000), peptman/GILSON”, de 1 mL da diluição 10^{-1} para 9mL de EB, incubando-se essa nova diluição (10^{-2}) a 30°C, por 24 horas. Após as 24 horas de incubação, fez-se o mesmo procedimento descrito no item a; Após o cultivo, a diluição 10^{-2} foi mantida a 4°C até 28 dias. A partir daí, foi semeada em MMA e LPM, e incubada a 37°, por 24-48 horas (FIGURA 1).

Após o crescimento, as colônias suspeitas (colônias pequenas e transparentes) de cada amostra, foram semeadas para crescimento isolado em meio sólido de LPM e MMA para obtenção de colônias puras. Depois deste procedimento, seguiu-se a identificação padrão de bactérias Gram positivas e catalase positiva (NASCIMENTO, 1991). Para as colônias positivas nesses testes, fez-se outras baterias de testes, tais como: oxidase, hemólise em ágar sangue, esculina, motilidade a 25°C e 37°C, uréia, fermentações de açúcares (manitol, xilose, glicose, rhamnose e maltose) (FIGURA 2). Os organismos suspeitos foram comparados com o crescimento e testes da amostra padrão de *L. monocytogenes*, ATCC-7644, cedida pelo Setor de Microbiologia e Imunologia – Laboratório de Substâncias Biológicas de Referência e Coleção de Culturas, localizado na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Após finalizar todos os testes bioquímicos, as colônias suspeitas foram

inoculadas em caldo “Brain Heart Infusion” (BHI), a 37°C, por 24 horas e estocadas em freezer (BHI mais glicerol P.A. na proporção de 1:1) para identificações futuras.

3.2.2. Identificação e isolamento de *Staphylococcus aureus*

O método de análise utilizado seguiu as recomendações do “American Public Health Association” (APHA, 1976) para isolamento de *S. aureus*. Uma amostra de 25g de cada queijo, após pesagem asséptica, foi liquidificada assepticamente, por dois minutos, com 225mL de água peptonada a 0,1%, obtendo-se a diluição 10^{-1} . Fez-se transferência de 1mL da diluição 10^{-1} , com auxílio da pipeta automática (P1000), para um tubo contendo 9mL do mesmo diluente obtendo-se a diluição 10^{-2} . Após agitação no agitador de tubos, “Phoenix, mod. at. 56”, procedeu-se de maneira semelhante para preparar as diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} , visto que nas diluições subseqüentes o crescimento foi pouco significativo para contagem. Para cada diluição, inoculou-se 0,1mL com auxílio de pipeta automática (P200), em duplicita, em placas contendo, respectivamente, meios de “Baird Parker” (BP) e “Vogel and Johnson” (VJ). Em seguida, espalhou-se o inoculado com auxílio da alça de Drigalski e mesa giratória. Após o cultivo, as placas foram invertidas e incubadas a 37°C, por 24-48 horas e examinadas para detectar a presença de colônias pretas, suspeitas de *Staphylococcus* spp. (FIGURA 3).

Para contagem escolheu-se para ambos os meios, placas de diluições que continham entre 30 e 300 colônias negras (colônias suspeitas). O resultado da contagem foi representado pela média do número de colônias das duas placas, multiplicado pelo fator de diluição e levando-se em consideração a alíquota de 0,1mL. Para o meio de BP, as colônias escolhidas apresentavam-se na sua maioria com bordas regulares, tinham ou não um anel

opaco, eram rodeadas ou não por um halo claro, transparente, contrastante com o meio de cultura devido à redução dos lipídios na gema de ovo (THATCHER & CLARK, 1973). Os agentes seletivos são idênticos em ambos, BP e VJ, porém, o aspecto das colônias pode ser um pouco diferenciado pela presença de halo claro no BP e halo dourado no VJ, devido à fermentação do manitol presente no meio (ANONYMOUS, 1987a).

Após contagem, as colônias suspeitas foram repicadas em meios sólidos de BP e VJ, para obtenção de colônias isoladas, puras e incubadas a 37°C, por 24-48 horas. Após crescimento essas colônias foram submetidas aos testes de diferenciação bioquímica (FIGURA 4), seguindo-se as recomendações de BIBERSTEIN (1990), para diferenciar *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. coagulase positiva e negativa e *Micrococcus* spp. Tais testes foram: coloração de Gram, catalase, coagulase, resistência à bacitracina, Vogel-Tal. P.A. na proporção de 1:1) para identificações das espécies não classificadas.

3.2.3. Contagem em placa de mesófilos aeróbicos

O procedimento inicial foi idêntico ao descrito no subitem anterior. Porém, as inoculações foram feitas em “Standard Method Agar” (SMA) e as diluições utilizadas somente puderam ser feitas de 10^{-4} à 10^{-7} (FIGURA 5), visto que, durante a realização dos cultivos, a maioria das amostras tiveram crescimento que inviabilizaram a contagem nas diluições menores que 10^{-4} , ou seja, todas deram acima de 300 colônias (TNTC). Foi também utilizado o mesmo método subitem anterior para contagem em placa (ANONYMOUS, 1987b).

3.2.4. Determinação das características físico-químicas dos queijos sob estudo

3.2.4.1. pH

Uma amostra de 10g de cada queijo foi pesada, misturada e homogeneizada com 20mL de água destilada esterilizada e o pH foi medido através do medidor de pH “pHestr 2, waterproof”, conforme metodologia previamente descrita (SANTOS & GENIGEORGIS, 1981).

3.2.4.2. Determinação da % de água

A quantidade de água cada queijo foi determinada por meio de secagem. Uma amostra de 10g de cada queijo foi pesada e incubada a 140°C, por duas horas. A diferença de peso antes e depois da secagem indicou a percentagem de água do produto.

3.2.5. Testes bioquímicos usados para *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*

Todos os testes foram feitos a partir de colônias isoladas.

3.2.5.1. Coloração de Gram

Após ter feito o esfregaço na lâmina, adicionou-se sobre o esfregaço os corantes na seguinte seqüência: cristal violeta deixando agir por um minuto. Retirou-se o excesso, adicionou-se lugol deixando-se agir por também por um minuto. Retirou-se o excesso, lavou-se com álcool-acetona e imediatamente enxaguou-se com água corrente para retirar todo o álcool-acetona. Em seguida, adicionou-se fuccina e esperou-se agir por 30 segundos para então enxaguar-se em água corrente.

3.2.5.2. Prova da catalase

Numa lâmina contendo uma gota de água oxigenada a 3% adicionou-se uma pequena porção da colônia misturando-se e presenciando-se imediatamente a formação de bolhas de ar para o teste positivo devido a degredação da água oxigenada formando água e oxigênio.

3.2.6. Testes bioquímicos usados para *Listeria monocytogenes*

3.2.6.1. Teste de oxidase

Pegou-se, assepticamente, com alça de platina, colônias de placas e espalhou-se em uma pequena área de papel filtro previamente impregnado com o reagente de oxidase para posterior leitura. As colônias positivas que possuem o citocromo C, que é um elétron tipo receptor, rapidamente oxidam, tornando lilás o local onde há o contato da colônia com o reagente. As bactérias que não possuem o citocromo C não podem fazer isto e, consequentemente, são oxidase negativas, resultado representado pela coloração amarelada.

3.2.6.2. Teste de uréia

A detecção da atividade de urease foi realizada pela inoculação das colônias suspeitas em caldo uréia contendo vermelho de fenol como indicador. As amostras foram incubadas a 37°C, por 24 horas e as reações foram consideradas positivas para aquelas que degradam a uréia ocorrendo, assim, mudanças da cor rosa para vermelho.

3.2.6.3. Fermentação para açúcares

As amostras suspeitas foram inoculadas nos tubos contendo cada carboidrato correspondente e incubadas a 37°C, por 24 horas. Considerou-se positiva as amostras

capazes de desdobrar, em aerobiose, o respectivo carboidarato em ácidos, evidenciadas pela mudança de cor vermelha, do meio, dado pelo indicador púrpura de bromocresol, para o amarelo. Os carboidratos utilizados foram: xilose, rhamnose, glicose, maltose e manitol.

3.2.6.4. Teste de esculina

Com um estilete inoculou-se uma porção de cada colônia suspeita até ao fundo do ágar esculina inclinado em tubo. Incubou a 37°C, por 24 horas e, em seguida fez-se a leitura. Considerou-se positiva a amostra que escureceu o meio, devido a hidrólise da esculina em esculetina e glicose, e, negativa, aquela que não manifestou alteração na coloração do meio.

3.2.6.5 Hemólise em Ágar Sangue

Para verificação da presença de hemólise, foram utilizadas placas contendo Ágar Sangue de bovino. Com ajuda da alça de platina, fez-se esgotamento em placa das colônias suspeitas de *Listeria*, incubou-se a 37°C, por 24 horas. A leitura foi baseada na presença ou não de halo transparente ao redor das colônias. A *L. monocytogenes* é β-hemolítica.

3.2.6.6. Teste de motilidade

Com ajuda de um estilete, fez-se a inoculação da colônia suspeita, em duplicata, no meio adaptado (Apêndice) para este teste. Em seguida, as amostras foram incubadas, uma à 37°C e outra a 25°C, por 24-48 horas. Quando móvel, a *L. monocytogenes* cresce em forma

de guarda-chuva quando incubada a 25°C por causa do desenvolvimento de flagelos peritríqueos e, crescimento imóvel a 37°C.

Utilizou-se sempre, como controle, uma amostra padrão de *L. monocytogenes* ATCC-7644, para todos os testes referentes a sua classificação.

3.2.7. Testes bioquímicos usados para *Staphylococcus aureus*

3.2.7.1. Teste de coagulase

A bactéria coagulase positiva ativa o mecanismo de coagulação com a enzima coagulase (staphylocoagulase), produzindo coagulação no meio. Para cada 1mL de amostra cultivada em Caldo de Infusão de Cérebro e Coração (BHI) previamente incubada, “overnight”, colocou-se 1mL de plasma de coelho, homogeneizou-se e incubou-se a 37°C, sendo feita a leitura quatro horas após. Considerou-se positiva a amostra que solidificou o plasma de coelho e, as que não solidificavam, foram deixadas em temperatura ambiente até completar 24 horas. A partir daí, fez-se a leitura final. As amostras que se apresentavam solidificadas, eram consideradas positivas e as outras, negativas. Qualquer grau de coagulação foi considerado positivo e a não coagulação até 24 horas foi considerado resultado negativo.

3.2.7.2. Resistência à bacitracina

A determinação da sensibilidade à bacitracina foi feita pelo método de difusão de discos, segundo BAUER et al., (1966) utilizando-se somente as amostras coagulase negativa. Plaqueou-se “swabs” embebidos em cultivo de cada amostra de caldo BHI em Ágar Mueller Hinton, dispensando-se o disco de bacitracina 10mcg “Sensibiodisc CECON”

e as placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas. A avaliação foi feita baseada na ausência ou presença de halo de inibição de crescimento abaixo de 10,5mm, para classificar o grupo de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa e halo medindo de 10,5mm a 25mm, *Micrococcus* spp. (BIBERSTEIN, 1990).

3.2.7.3. Teste de Voges-Proskauer

Fez-se, a partir de bactéria Gram + coagulase positiva inoculada em BHI, inoculação em VM com auxílio da alça de platina e incubou-se a 37°C, por 48 horas. Decorrido este tempo, acrescentou-se primeiro, 0,2mL de hidróxido de potássio (KOH)/ mL do cultivo e logo após, 0,6mL de α -naftol)/ mL do cultivo. Homogeneizou-se por um minuto e fez-se a leitura imediatamente ou esperou-se até 10-20 minutos. A mudança de cor para rosa ou vermelho indicou resultado positivo, devido à produção de acetoína. O resultado negativo foi constatado pela insignificante mudança de cor.

3.3. Método estatístico

Usou-se Estatística Descritiva (média, mediana, valores máximo e mínimo) e Análise de Regressão Linear, segundo REMINGTON & SCHORK (1970). Para essas análises, o crescimento bacteriano, obtido em Unidade Formadora de Colônia por grama (UFC/g) de queijo, foi transformado em \log_{10} e, no caso de UFC=0, considerou-se o menor log possível, log=0,00.

A Análise de Regressão Linear abrangeu duas etapas. Na primeira etapa testou-se a relação do crescimento de *Staphylococcus* e/ou *Micrococcus*, com cada variável, pH, percentagem de umidade e tempo de prateleira obtidos dos 47 queijos, independentemente. Na segunda etapa, usou-se as mesmas variáveis, em conjunto, para verificar o efeito sinérgico.

FIGURA 1. Fluxograma da metodologia utilizada para pesquisa de *Listeria monocytogenes* em queijos tipo Minas frescal.

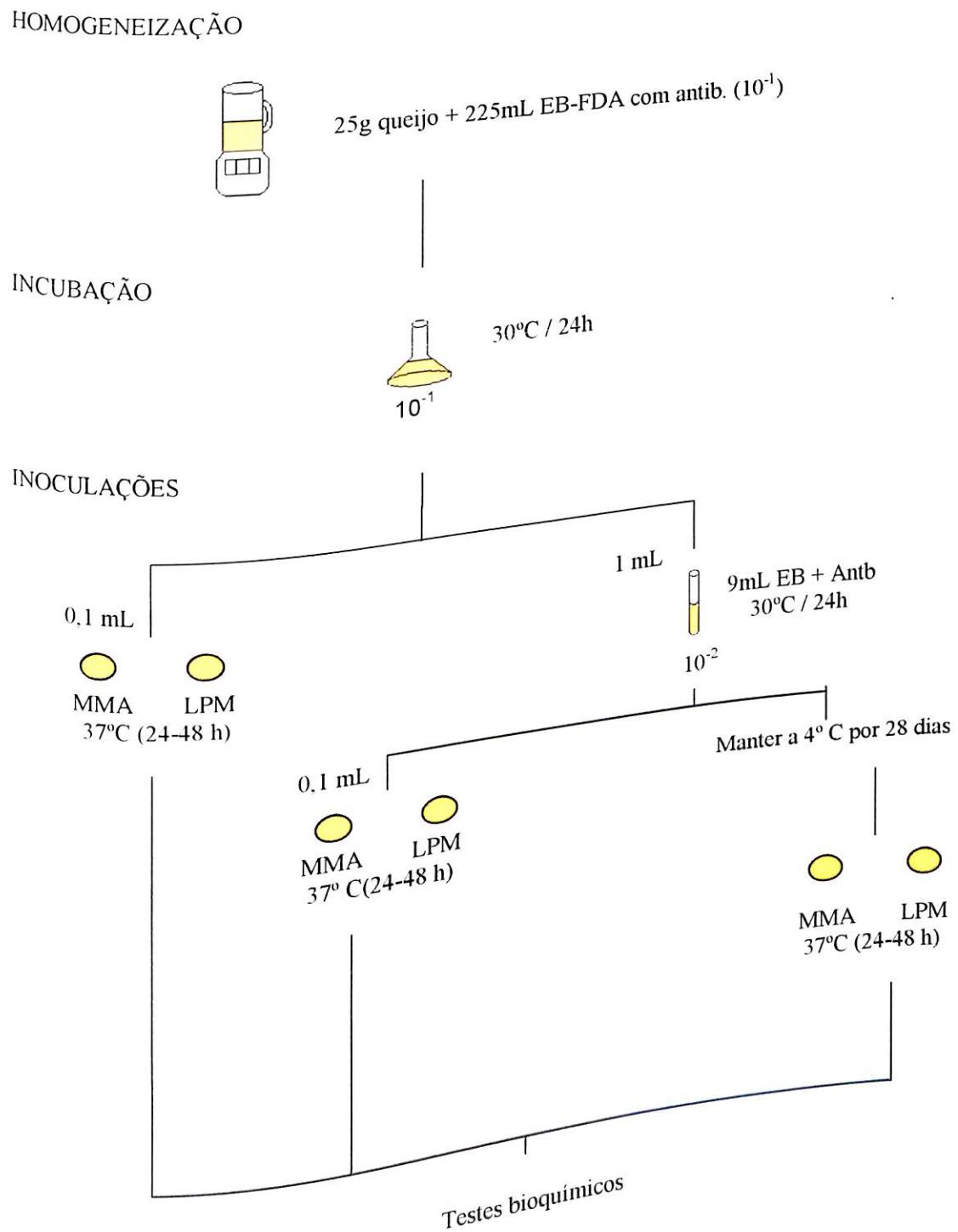


FIGURA 2. Fluxograma da representação esquemática dos testes bioquímicos utilizados para o isolamento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas frescal.

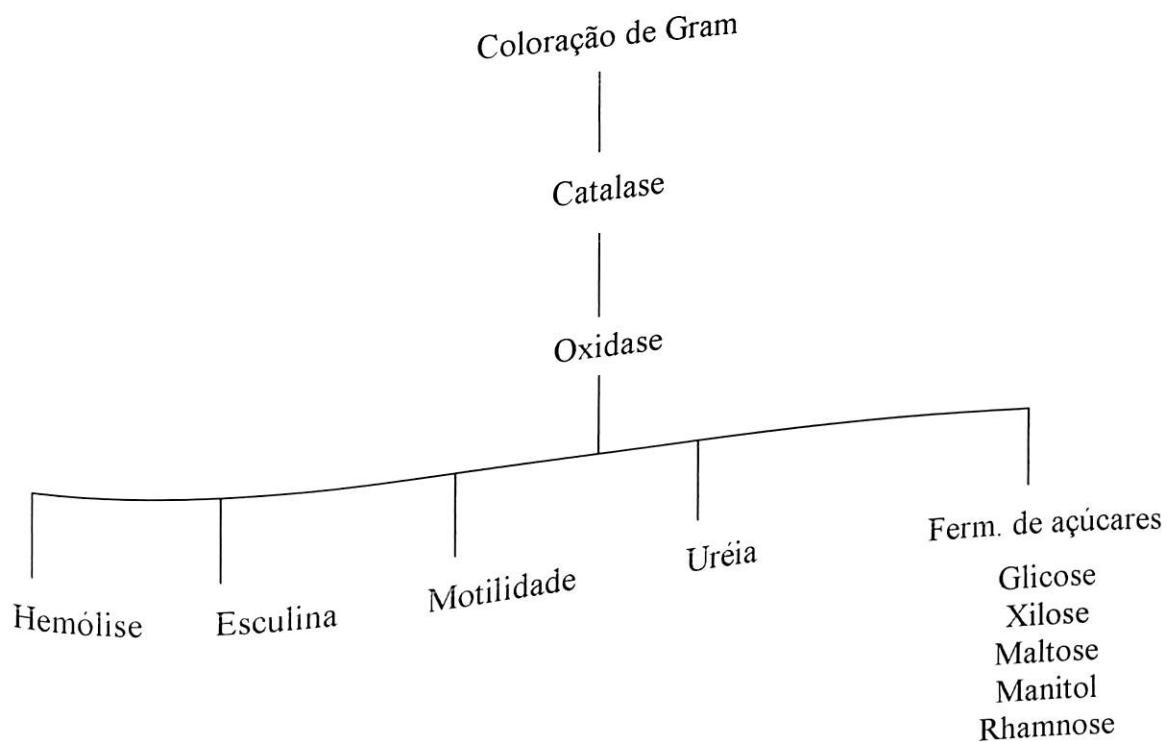
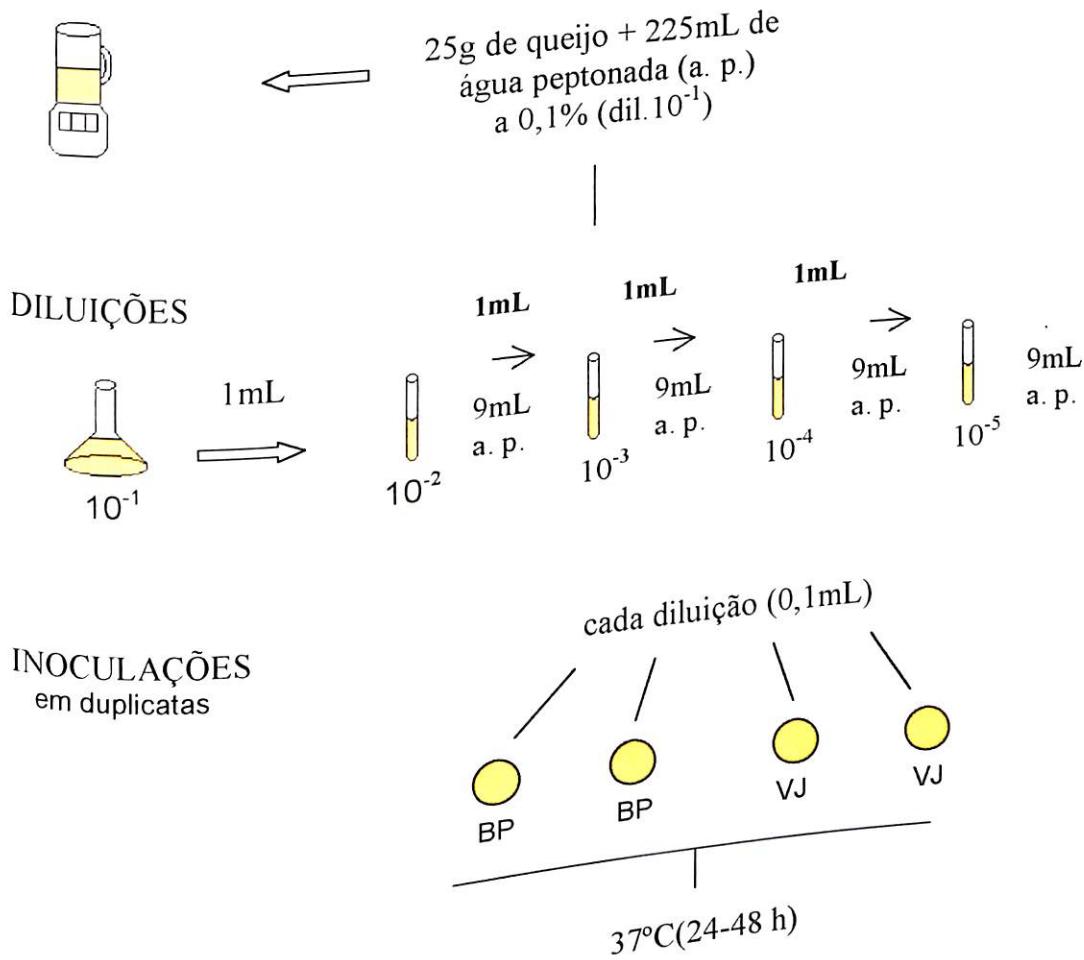


FIGURA 3. Fluxograma da metodologia utilizada para pesquisa de *Staphylococcus aureus* em queijos tipo Minas Frescal.

HOMOGENEIZAÇÃO



INCUBAÇÃO

RESULTADO POSITIVO

FIGURA 4. Fluxograma da representação esquemática dos testes bioquímicos utilizados para o isolamento de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas frescal.

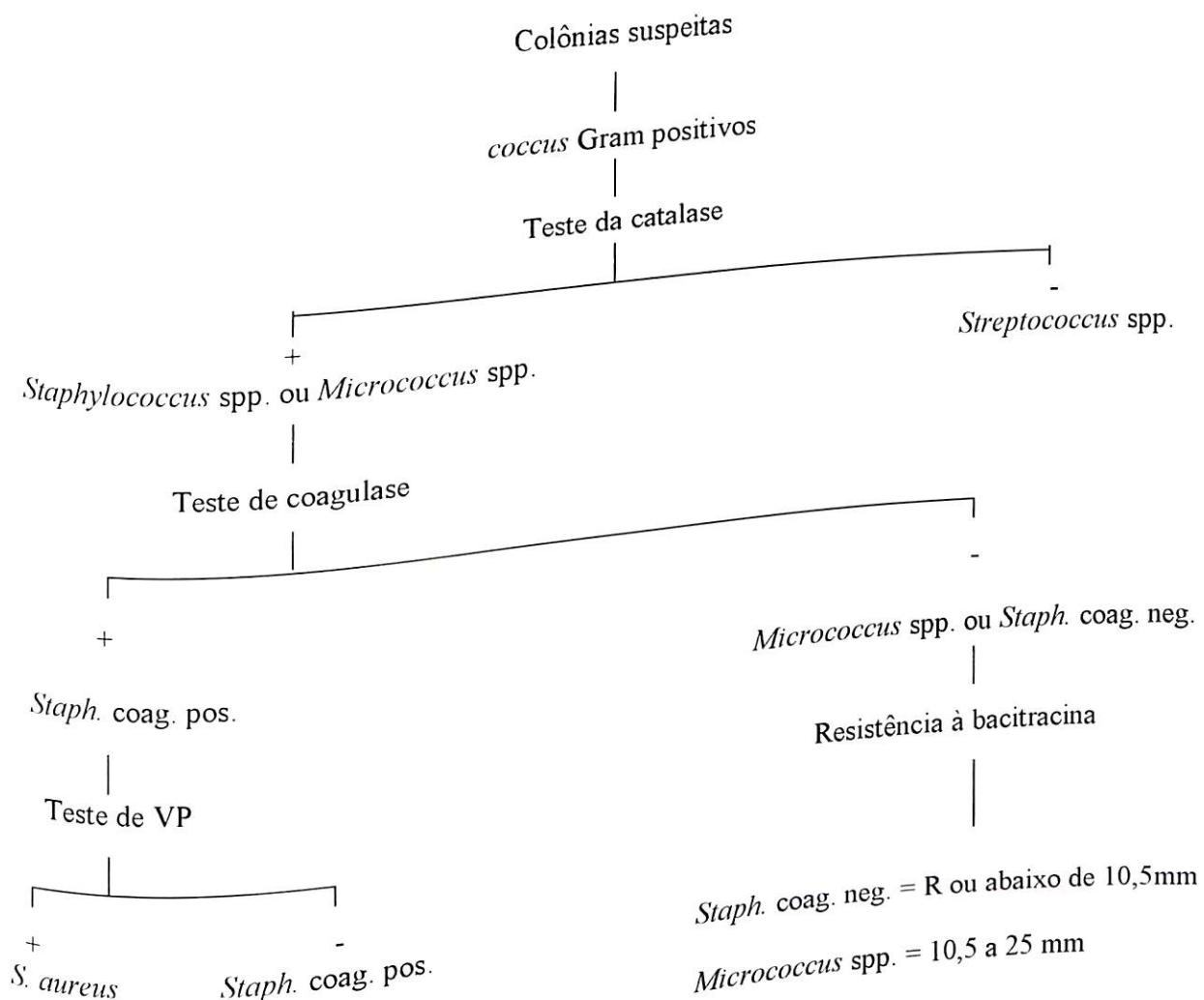
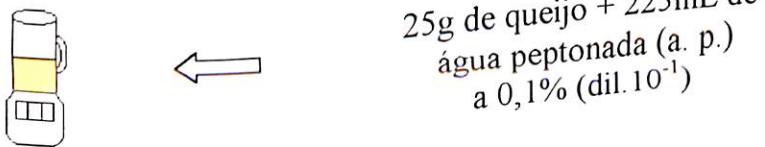
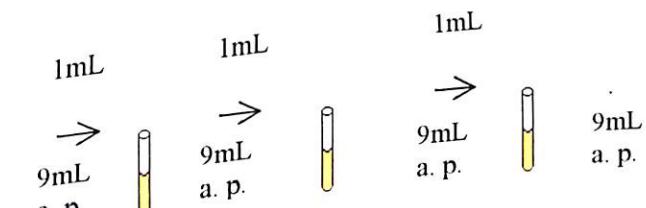
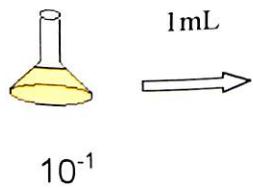


FIGURA 5. Fluxograma da metodologia utilizada para a pesquisa da contagem total de mesófilos aeróbicos em queijos tipo Minas frescal.

HOMOGENEIZAÇÃO



DILUIÇÕES



INOCULAÇÕES em duplicatas

INCUBAÇÃO

RESULTADO

cada diluição (0,1mL)

10^{-4}

10^{-5}

10^{-6}

10^{-7}

SMA

SMA

30°C (24-48 h)

contagens dos microorganismos em placas

IV. RESULTADOS

4.1. Distribuição das amostras de queijos analisadas, provenientes de quatro microrregiões do Estado do Rio de Janeiro

Do total de 59 amostras de queijo tipo Minas frescal analisadas, foram contempladas 25 marcas diferentes, disponíveis no comércio (supermercados e propriedades rurais) de quatro microrregiões do Estado do Rio de Janeiro (Vale Paraíba Fluminense, Itaguaí, Grande Rio e Barra do Piraí). Quarenta e nove amostras (18 marcas) tinham Serviço de Inspeção Federal (SIF) e apenas 10 amostras (sete marcas) não possuíam SIF, ou seja eram queijos "clandestinos" (TABELA 2). Foram analisadas amostras de queijos originadas de três Estados, das quais, 34 amostras (16 marcas) foram do Estado do Rio de Janeiro, 19 amostras (sete marcas) do Estado de Minas Gerais e seis amostras (duas marcas) do Estado de São Paulo. Estes queijos de outros Estados foram também analisados por serem vendidos no comércio enquadrado no delineamento desse estudo. Dos 59 queijos, 50 foram provenientes de supermercados, cinco de propriedades rurais e quatro de queijaria artesanal (TABELA 2).

4.2. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijo tipo Minas frescal

Para pesquisa bacteriológica de *L. monocytogenes*, utilizando a metodologia tradicional, foram analisadas 58 amostras de queijo tipo Minas frescal, da qual foram isoladas colônias suspeitas (colônias pequenas, transparentes, crescidas em LPM e/ou MMA) em todas as amostras. No total, foram isoladas 192 colônias, e somente cinco (9,09%) amostras apresentaram maior semelhança com a *L. monocytogenes*, quando comparadas com a amostra padrão, ATCC-7644 (TABELA 3). Porém, de acordo com os resultados adquiridos, apesar da semelhança, observou-se 100% de negatividade para isolamento de *L. monocytogenes*.

4.3. Avaliação dos meios utilizados para isolamento de *Listeria monocytogenes*

O Ágar "Lithium Phenylethanol Modified" (LPM) e Ágar "MacBride Modified" (MMA), utilizados para isolamento de *L. monocytogenes*, são reconhecidos pelo "Food Drug Administration" (FDA) e bastante utilizados para isolamento de *L. monocytogenes* em alimentos. Apesar de ambos terem substratos inibitórios, o LPM mostrou-se mais ineficiente em relação a contaminação, obtendo-se cinco amostras contaminadas e apenas duas em MMA. O MMA foi o meio em que melhor pode se obter colônias semelhantes (colônias bem pequenas, transparentes), porém não se obteve crescimento de *Listeria* em ambos meios. Apenas observou-se crescimento de diversas colônias (colônias diferentes das pesquisadas) em maior proporção no LPM.

4.4. Contagem total de mesófilos aeróbicos, pH e umidade

Os resultados relativos a contagem total de microorganismos dos 59 de queijos, encontram-se no TABELA 2. Nas 59 amostras analisadas pertencentes a 25 marcas diferentes, obteve-se uma variação de crescimento de 0 (zero) à $8,7 \times 10^9$ Unidade Formadora de Colônia/g (UFC/g) ou > (TNTC), conforme dados tabulados na TABELA 2.

Os resultados da porcentagem de água revelaram que, das 59 amostras analisadas, houve uma variação de 43,60% a 79,60%, com uma média de 60,91%. De acordo com os resultados, nove amostras estavam dentro dos padrões estabelecidos para alta umidade (46% > umidade < 55%), uma amostra abaixo do padrão ($36\% < \text{umidade} < 46\%$) e 49 amostras estavam acima do padrão (umidade > 55%) (GRÁFICO 1).

Uma diversidade marcante foi observada em relação ao pH nos queijos analisados. Os pH mínimo, médio e máximo foram, respectivamente, 4,2; 5,53 e 6,54 (TABELA 5).

4.5. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo Minas frescal

Do total de 59 amostras de queijos tipo Minas frescal, somente 57 foram usadas para a pesquisa de *S. aureus*, correspondendo a 23 marcas (TABELA 4). Obteve-se variações de crescimento, mínimo e máximo, de 0,00 a $5,13 \times 10^8$ UFC/g, respectivamente, independentemente das amostras apresentarem SIF ou não e serem obtidas de supermercado ou diretamente de propriedades rurais. Ao todo, foram isoladas 239 colônias suspeitas (colônias pretas com halo transparente ou opaco para o meio de "Baird-Parker" e para o meio de "Vogel-Johnson", colônias com halo amarelo. Entretanto, foram também isoladas, inclusive na sua maioria, colônias sem halo em ambos os meios. Todas as colônias (100%) foram *coccus*

Gram positivos. Além de se isolar 18 (7,53%) colônias de *S. aureus* coagulase positiva, que é uma bactéria patogênica, capaz de causar intoxicação alimentar, por possuir enterotoxinas termoresistentes, isolou-se também, 25 (10,46%) colônias de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva, 93 (38,91%) colônias *Staphylococcus* spp coagulase negativo, 35 (14,64%) colônias de *Micrococcus* spp., 64 (26,78%) colônias de *Streptococcus* spp. e quatro (1,67%) colônias de leveduras. (GRÁFICO 2). Os resultados dos isolamentos para cada amostra encontram-se na TABELA 4.

4.6. Avaliação dos meios utilizados para isolamento de *Staphylococcus aureus*

A utilização dos dois meios de isolamentos, o ágar Baird-Parker (BP) e ágar Vogel-Johnson (VJ), não foi possível para todas as amostras. Das 43 amostras cultivadas nos dois meios, observou-se crescimento de colônias típicas (pretas, com formação de halo) em 74,42% e 81,39% dos queijos, respectivamente para BP e VJ (GRÁFICO 3). No BP, observou-se crescimento melhor (sem contaminação) e/ou maior número de UFC/g em 22 amostras (51,16%), enquanto no meio de VJ, observou-se somente em 10 (23,26%) amostras (GRÁFICO 4). Apenas uma amostra (2,32%) cresceu em BP e não cresceu em VJ.

4.7. Análise estatística

Os resultados da análise estatística descritiva dos 55 queijos referentes ao pH, umidade, tempo de prateleira e UFC/g de queijo com bactérias pertencentes aos gêneros *Staphylococcus* e/ou *Micrococcus* revelaram média aritmética, respectivamente, de 5,529;

60,98%, 10,47 e 4,680 UFC/g. Os demais valores mínimo e máximo e desvios padrões para essas variáveis encontram-se tabelados (TABELA 5).

O resultado da análise de Regressão Linear, para testar a influência das variáveis independentes pH, umidade e tempo de prateleira sobre a variável dependente UFC/g para os gêneros *Staphylococcus* e/ou *Micrococcus* encontram-se nas TABELAS 6 e 7.

O coeficiente de regressão para pH e umidade foram negativos e para tempo de prateleira positivo (TABELA 6). Houve um pequeno efeito sinérgico das variáveis umidade e tempo de prateleira com o pH, explicando 25,61% da variação de UFC/g de *Staphylococcus* e/ou *Micrococcus/g* de queijo ($p<0,005$).

TABELA 2. Relação das amostras coletadas e resultados microbiológicos (Número total de microorganismos/g de queijo), usando-se contagem padrão em placas e características (pH e umidade) de 59 queijos tipo Minas frescal examinados.

Queijo (Marca)* nº	Origem Venda/fabricação	SIF	Umidade	Tempo de Prateleira (dias)		pH	Mesófilos (UFC/g)
1A	S/MG	Sim	60,40 %	14	6,20	1,43 x 10 ⁹	
1B	S/MG	Sim	56,00 %	5	4,40	1,5 x 10 ⁹	
2A	S/RJ	Sim	53,70 %	12	5,60	2,135 x 10 ⁷	
2B	S/RJ	Sim	50,60 %	12	5,70	1,535 x 10 ⁸	
2C	S/RJ	Sim	53,50 %	8	5,30	9,2 x 10 ⁸	
3A	S/RJ	Sim	55,20 %	8	4,50	3,45 x 10 ⁸	
3B	S/MG	Sim	53,60 %	15	4,80	TNTC	
3C	S/MG	Sim	54,60 %	3	4,80	1,04 10 ⁸	
4A	S/RJ	Sim	59,70 %	9	5,35	1,04 x 10 ⁸	
4B	S/RJ	Sim	63,00%	7	6,38	1,8 x 10 ⁶	
4C	S/RJ	Sim	59,20 %	8	6,41	6,6 x 10 ⁷	
4D	S/RJ	Sim	63,10 %	5	6,04	1,6 x 10 ⁸	
4E	S/RJ	Sim	63,10 %	8	5,60	1,315 x 10 ⁸	
5A	S/RJ	Sim	60,50 %	14	4,70	TNTC	
5B	S/MG	Sim	55,20 %	15	4,90	TNTC	
6A	S/MG	Sim	55,20 %	23	5,59	4,6 x 10 ⁹	
6B	S/RJ	Sim	60,50 %	8	5,10	6,8 x 10 ⁸	
6C	S/RJ	Sim	67,80 %	2	4,50	TNTC	
7A	S/RJ	Sim	61,80 %	11	5,51	2,16 x 10 ⁷	
7B	S/RJ	Sim	58,00 %	16	5,59	2,505 x 10 ⁸	
7C	S/MG	Sim	56,30 %	10	5,63	5,3 x 10 ⁸	
8A	S/MG	Sim	55,70 %	5	5,50	1,28 x 10 ⁹	
8B	S/MG	Sim	55,70 %	6	5,84	8,1 x 10 ⁸	
9A	S/RJ	Sim	57,60 %	17	6,00	1,67 x 10 ⁷	
9B	S/RJ	Sim	55,10 %	12	5,22	1,74 x 10 ⁹	
9C	S/RJ	Sim	57,70 %	6	6,11	9,5 x 10 ⁷	
9D	S/RJ	Sim	54,90 %	-	5,35	1,8 x 10 ⁹	
10A	S/RJ	Sim	58,10 %	-	6,54	7,25 x 10 ⁶	
11AL	S/RJ	Não	69,70 %	25	6,24	0,00	
11BL	S/RJ	Sim	70,50 %	11	6,30	0,00	
11CL	S/SP	Sim	68,00 %	11	6,46	0,00	
11A	S/SP	Sim	67,50 %	21	5,90	0,00	
11B	S/SP	Sim	61,30 %	14	6,30	0,00	
11C	S/SP	Sim	71,40 %	6			
	S/SP	Sim	62,30 %				

TABELA 2. Relação das amostras coletadas e resultados microbiológicos (Número total de microorganismos/g de queijo), usando-se contagem padrão em placas e características (pH e umidade) de 59 queijos tipo Minas frescal examinados (Continuação).

Queijo (Marca)* nº	Origem Venda/fabricação	SIF	Umidade	Tempo de prateleira (dias)	pH	Mesófilos (UFC/g)
12A		Não	63,60 %	-	5,35	$5,15 \times 10^8$
12B	Q/RJ	Não	71,60%	10	6,14	$4,75 \times 10^9$
12C	Q/RJ	Não	79,60 %	6	5,30	$8,0 \times 10^9$
12D	Q/RJ	Não	57,90 %	1	5,53	TNTC
13A	Q/RJ	Sim	59,20 %	14	5,11	$3,9 \times 10^8$
14A	S/RJ	Não	61,50 %	5	6,52	$2,0 \times 10^7$
15A	P/RJ	Não	69,30 %	-	6,44	$1,34 \times 10^8$
16A	P/RJ	Não	77,30 %	20	6,18	$8,7 \times 10^9$
16B	S/MG	Sim	73,90 %	11	6,18	$8,1 \times 10^9$
16C	S/MG	Sim	67,30%	11	6,00	$7,0 \times 10^8$
17A	S/MG	Sim	63,40%	12	6,42	$3,4 \times 10^6$
17B	S/MG	Sim	61,00 %	17	6,44	$4,0 \times 10^5$
17C	S/MG	Sim	65,10 %	3	6,20	0,00
18A	S/MG	Sim	51,00 %	-	4,90	$5,9 \times 10^6$
18B	S/RJ	Sim	58,70 %	3	4,80	$6,1 \times 10^9$
19A	S/RJ	Sim	59,40 %	2	4,40	$7,1 \times 10^6$
19B	S/RJ	Sim	65,40 %	10	4,20	$8,5 \times 10^7$
20A	S/RJ	Sim	74,10 %	9	5,30	$6,7 \times 10^8$
20B	S/RJ	Sim	63,80 %	9	5,10	$3,3 \times 10^9$
20C	S/RJ	Sim	62,90 %	8	4,80	$1,92 \times 10^9$
21A	S/RJ	Sim	58,60 %	8	5,70	$1,14 \times 10^8$
21B	S/MG	Sim	58,80 %	9	5,70	$7,2 \times 10^8$
21C	S/MG	Sim	53,90 %	-	5,20	TNTC
22A	S/MG	Sim	55,30 %	-	4,40	$9,65 \times 10^8$
23A	P/RJ	Não	43,60 %	-	4,40	$4,1 \times 10^9$
24A	P/RJ	Não	50,10 %	-	5,00	$5,1 \times 10^9$

*Marca seguida da identificação numérica, e repetições por letras do alfabeto, para queijos de composição calórica normal. Adição da segunda letra "L" para queijos "Light", ou seja, de baixo valor calórico.
 UFC = Unidade Formadora de Colônia
 SIF = Unidade Formadora de Colônia
 S = Supermercado ou Quitanda
 P = Propriedade Rural
 Q = Queijaria de pequeno porte
 TNTC = "Too Numerous To Count" (Contagem em placa acima de 300 colônias)

TABELA 3. Resultados das provas bioquímicas das cinco colônias "suspeitas" mais semelhantes com *Listeria monocytogenes*, isoladas de 58 amostras de queijo Minas frescal consumidos no Estado do Rio de Janeiro.

	Gram	C	Ox	H	E	Mot	U	G	MI	R	Mn	X
<i>L. m.</i>	+	+	-	+	+	+	-	+	±	+	-	-
1	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
2	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+
3	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
4	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
5	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+

(C) Catalase; (Ox) Oxidase; (H) Hemólise; (E) Esculina; (Mot) Motilidade (+) a 25 °C e (-) a 37 °C; (U) Uréia; (G) Glicose; (MI) Maltose; (R) Rhamnose; (Mn) Manitol; (X) Xilose; (*L. m.*) *Listeria monocytogenes*.

TABELA 4. Isolamento e classificação de colônias pretas, Gram positiva (suspeitas de *Staphylococcus aureus*) isoladas de 59 amostras de Queijo Tipo Minas Frescal.

Amostra	SIF	<i>Staphylococcus</i> spp.	log	isolados
1A	S	$6,30 \times 10^6$	6,80	<i>Streptococcus</i> , levedura, <i>Stap. coag. neg.</i>
1B	S	$7,3 \times 10^6$	6,86	<i>Stap. coag. neg.</i> , <i>Streptococcus</i>
2A	S	$2,5 \times 10^4$	4,40	<i>Micrococcus</i> , <i>Stap. aureus</i>
2B	S	$1,0 \times 10^4$	4,00	<i>Micrococcus</i>
2C	S	$1,4 \times 10^5$	5,15	<i>Micrococcus</i>
3A	S	$1,2 \times 10^6$	6,08	<i>Micrococcus</i> , <i>Streptococcus</i>
3B	S	$1,31 \times 10^7$	7,11	<i>Streptococcus</i> , <i>Stap. coag. neg.</i>
3C	S	$7,6 \times 10^5$	5,88	<i>Stap. coag. neg.</i>
4A	S	0,00	0,00*	N.A.
4B	S	0,00	0,00*	N.A.
4C	S	$9,1 \times 10^4$	4,96	<i>Stap. aureus</i> , <i>Stap. coag. neg.</i> ,
4D	S	$2,0 \times 10^6$	6,30	<i>Stap. coag. neg.</i> , <i>Micrococcus</i>
4E	S	$1,07 \times 10^5$	5,04	<i>Stap. coag. neg.</i> , <i>Streptococcus</i>
5A	S	$6,1 \times 10^6$	6,00	<i>Micrococcus</i> , <i>Stap. coag. neg.</i> , levedura,
5B	S	$9,9 \times 10^5$	8,71	<i>Stap. aureus</i>
6A	S	$5,13 \times 10^8$		<i>Streptococcus</i> , <i>Stap. coag. neg.</i>
6B	S	$6,6 \times 10^4$	4,82	<i>Streptococcus</i>
6C	S	$3,9 \times 10^5$	5,59	<i>Stap. coag. neg.</i>
7A	S	$1,45 \times 10^6$	6,16	<i>Stap. coag. pos.</i>
7B	S	$1,57 \times 10^6$	6,20	<i>Streptococcus</i> , <i>Stap. coag. neg.</i>
7C	S	$1,33 \times 10^6$	6,11	<i>Streptococcus</i> , <i>Stap. coag. neg.</i>
8A	S	$1,53 \times 10^6$	6,18	N.A.
9A	S	N.F.	N.F.	<i>Micrococcus</i>
9B	S	$1,7 \times 10^5$	5,23	<i>Stap. coag. neg.</i> , <i>Stap. coag. pos.</i>
9C	S	$6,05 \times 10^3$	3,79	<i>Stap. aureus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Stap. coag.</i>
9D	S	$1,93 \times 10^6$	6,28	neg.
10A	N	$3,4 \times 10^6$	6,53	<i>Micrococcus</i>
11AL	S	$2,01 \times 10^5$	5,30	N.A.
11BL	S	0,00	0,00*	N.A.
11CL	S	0,00	0,00*	N.A.
11A	S	$1,6 \times 10^6$	6,20	N.A.
11B	S	0,00	0,00*	N.A.
11C	S	0,00	0,00*	<i>Stap. aureus</i>
12A	N	$1,3 \times 10^5$	5,11	<i>Micrococcus</i>
12B	N	$5,8 \times 10^7$	7,76	

TABELA 4. Isolamento e classificação de colônias pretas, Gram positiva (suspeitas de *Staphylococcus aureus*) isoladas de 59 amostras de Queijo Tipo Minas Frescal (Continuação).

Amostra	SIF	<i>Staphylococcus</i> spp.	log	Isolados
12C	N	$1,9 \times 10^6$	6,28	<i>Stap. coag. neg.</i>
12D	N	$4,9 \times 10^3$	3,56	<i>Stap. aureus</i>
13A	S	$8,75 \times 10^5$	5,94	<i>Micrococcus</i>
14A	N	$2,0 \times 10^5$	5,30	<i>Stap. aureus</i>
15A	N	N.F.	N.F.	N.A.
16A	S	$3,20 \times 10^5$	5,51	<i>Micrococcus</i>
16B	S	$9,7 \times 10^5$	5,99	<i>Micrococcus</i>
16C	S	$8,6 \times 10^6$	6,93	<i>Stap. coag. neg. , levedura,</i> <i>Streptococcus</i>
17A	S	0,00	0,00*	N.A.
17B	S	0,00	0,00*	N.A.
17C	S	0,00	0,00*	<i>Stap. coag. neg., Micrococcus, levedura,</i> <i>Streptococcus</i>
18A	S	$2,7 \times 10^6$	6,43	<i>Stap. coag. neg. , Streptococcus</i>
18B	S	$6,3 \times 10^7$	7,20	<i>Streptococcus , Stap. coag. neg.</i>
19A	S	$3,3 \times 10^3$	3,15	<i>Stap. coag. neg.</i>
19B	S	$1,4 \times 10^6$	6,62	<i>Micrococcus, Stap. coag. neg.,</i> <i>Streptococcus</i>
20A	S	$4,2 \times 10^6$	6,99	<i>Stap. coag. neg., Streptococcus</i>
20B	S	$9,7 \times 10^6$	7,00	<i>Stap. coag. neg. , Streptococcus</i>
20C	S	$1,0 \times 10^7$	4,75	<i>Stap. coag. neg.</i>
21A	S	$5,6 \times 10^4$	4,75	<i>Streptococcus</i>
21B	S	$4,4 \times 10^6$	6,64	<i>Stap. coag. neg., Micrococcus</i>
21C	S	$7,6 \times 10^6$	6,88	<i>Stap. coag. neg., Micrococcus</i>
22A	N	$4,9 \times 10^4$	4,69	<i>Stap. coag neg., Micrococcus</i>
23A	N	$6,1 \times 10^4$	4,79	
24A	N	$7,0 \times 10^6$	6,85	

S = Sim

N = Não

N.F. = Não Feito

N.A. = Não Aplicável

* Para análise estatística, considerou-se valor = 0.

TABELA 5. Resultados da análise estatística descritiva do pH, umidade, tempo de prateleira e crescimento bacteriano (UFC de *Staphylococcus* e/ou *Micrococcus*) de 55 queijos Minas frescal.

	UFC (log)	pH	Umidade (%)	Tempo de prateleira (dias)
Média	4,68	5,53	60,98	10,47
Desvio Padrão	2,58	0,66	7,12	5,41
Coef. de Variação	55,11	12,01	11,68	51,63
Mediana	5,51	5,59	59,70	10,00
Valor Mínimo	0,00*	4,20	43,60	1,00
Valor Máximo	8,71	6,54	79,60	25,00

* Atribuiu-se UFC = 0,00 para crescimento igual a zero, para cálculo do log.

TABELA 6. Resultado da análise de Regressão Linear de crescimento bacteriano (UFC) de *Staphylococcus* e/ou *Micrococcus* em relação às variáveis independentes pH, umidade e tempo de prateleira, em 47 amostras de queijos Minas frescal.

Variáveis	Coeficiente
Constante	18,156
pH	- 1,8791
Umidade	- 0,0584
Tempo de prateleira	0,0342

Casos incluídos (que continham tempo de prateleira) = 47
 Graus de liberdade = 43
 F total = 4,9335
 r^2 = 0,2561
 p = 0,49

TABELA 7. Resultados da Regressão Linear de crescimento bacteriano (UFC/g *Staphylococcus/Micrococcus*) com todas as possíveis combinações de pH, umidade e tempo de prateleira em 47 queijos Minas frescal.

P*	r^2	Modelo das variáveis**
1	0,0169	A
2	0,0912	B
3	0,2389	C
4	0,0943	A B
5	0,2413	A C
6	0,2520	B C
7	0,2561	A B C

*P = possíveis combinações

**Variáveis independentes: (A) tempo de prateleira; (B) umidade; (C) pH

GRÁFICO 1. Resultados do total de amostras de queijo Minas frescal em relação ao padrão da percentagem de água estabelecido pela Portaria nº 451.

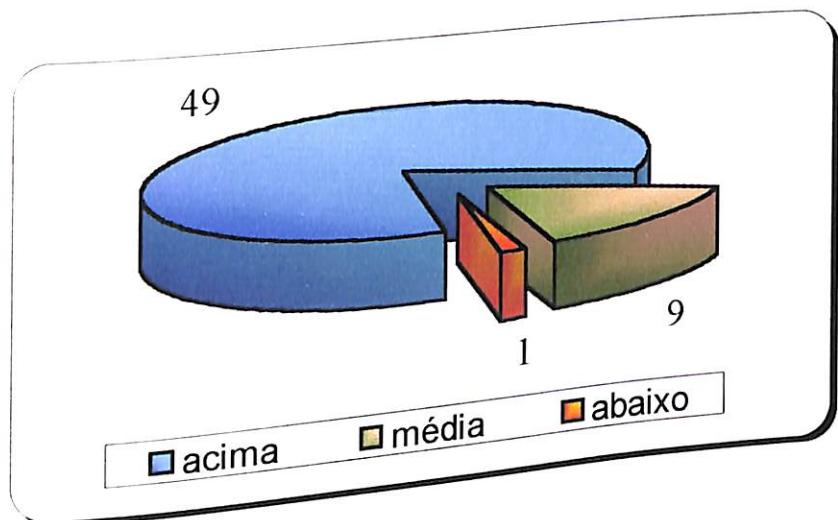
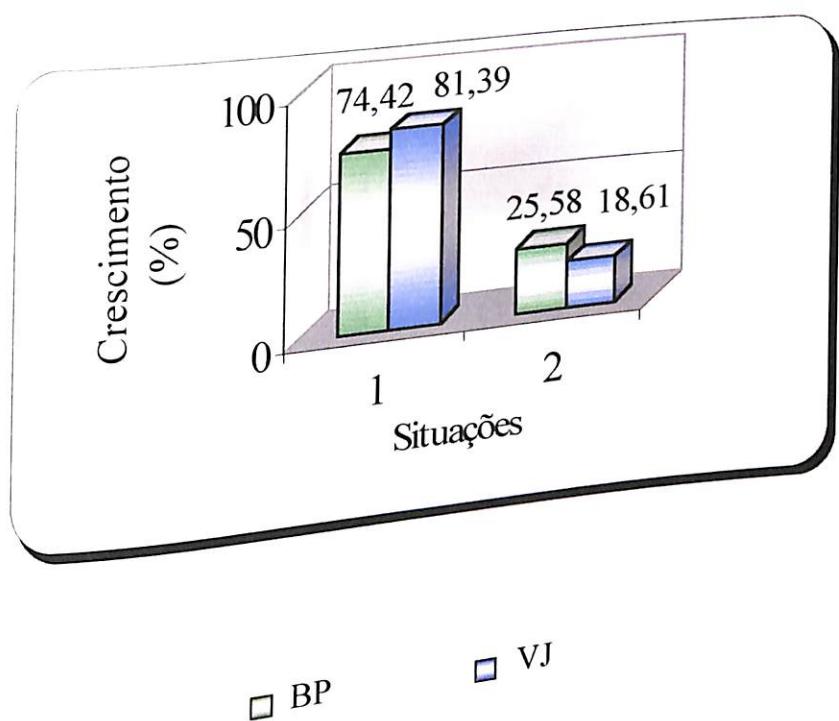


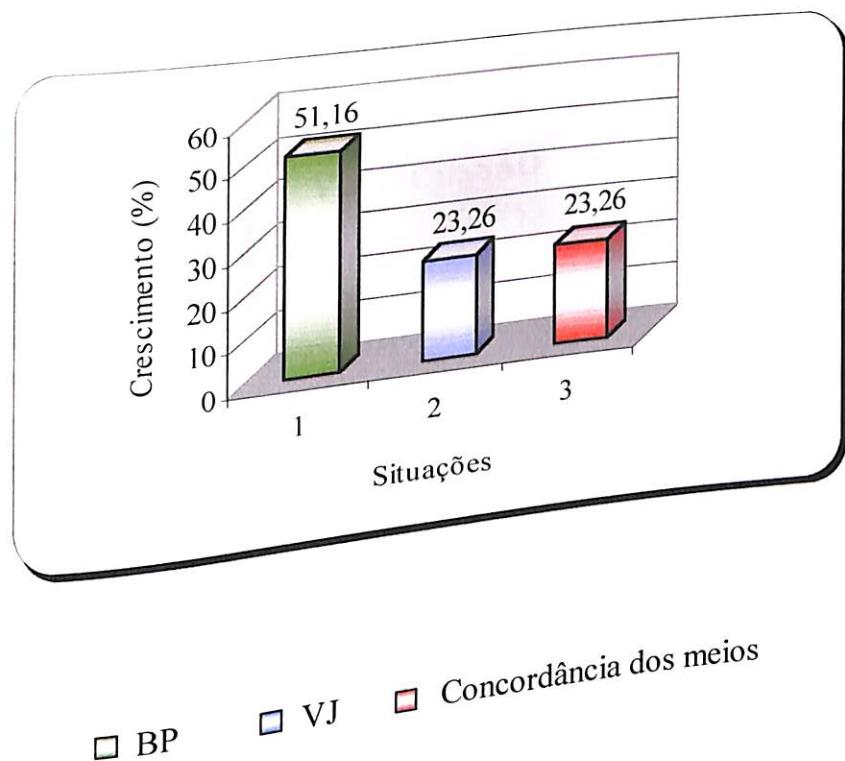
GRÁFICO 3. Comparação do crescimento de colônias típicas dos meios de “Baird-Parker” (BP) e “Vogel-Jonhson” (VJ) utilizados para isolamento de *Staphylococcus aureus* em amostras de queijo tipo Minas frescal.



Situações:

- 1- Crescimento de colônias típicas pretas, com halo
- 2- Crescimento de colônias típicas pretas, sem halo

GRÁFICO 4. Comparação do desempenho dos meios “Baird-Parker” (BP) e “Vogel-Jonhson” (VJ), em relação a crescimento melhor (menos contaminação e/ou maior UFC/g) suspeitas de *Staphylococcus aureus* em 58 amostras de queijo Minas frescal.



V. DISCUSSÃO

No presente estudo, não houve isolamento de *L. monocytogenes* nas amostras pesquisadas, significando que os queijos examinados não apresentavam risco à Saúde Pública, no que se refere a presença de *L. monocytogenes*, estando de acordo com a Legislação vigente (BRASIL, 1997), que não permite a presença dessa bactéria em 25g de alimento. Sabe-se que a prevalência dessa bactéria em queijos é baixa (OLIVEIRA, 1993). FURLANETTO et al. (1996), observaram que em queijos de várias consistências, de massa caprino ou bovino, a presença de *Listeria* spp. é na ordem 0,25 a 33%.

No Brasil, são poucos os relatos quanto ao isolamento de *Listeria* a partir de alimentos e mesmo quanto a sua implicação em Saúde Pública (NASCIMENTO & CULLOR, 1994; SILVA & TIBANA, 1995). Entretanto, contrastando o presente resultado, SILVA et al. (1998), isolaram *L. monocytogenes* de 41,17%, 5,67%, 3,03%, respectivamente, de queijo tipo Minas fabricado artesanalmente, queijos maturados e queijos Minas e ricota industrializados. Não houve relato de casos de listeriose por ingestão

desses queijos contaminados. A competição com a flora natural e até mesmo com microorganismos tecnologicamente desejáveis e introduzidos, como bactéria láticas e leveduras é também mencionada (MCCLAIN et al., 1988). A competição, principalmente com mesófilos aeróbicos talvez explique a ausência de *L. monocytogenes* em 100% das amostras de queijos analisadas, no presente estudo.

Como não se conseguiu isolar *Listeria* das amostras de queijos examinadas, não se pode concluir em favor de um outro meio de cultivo utilizados. Apenas observou-se que o MMA apresentou aparentemente menos contaminação "grosseira", ou seja, menor quantidade de colônias não semelhantes às de *Listeria*.

Os resultados da enumeração de mesófilos aeróbicos revelaram uma variação de 0,0 UFC/g (não houve crescimento, independente da diluição cultivada) a TNTC (contagem acima de 300 colônias em todas as diluições). Muito embora a Portaria nº 451 (BRASIL, 1997) não inclua padrões para contagem total, pode-se observar que cinco amostras apresentaram 0,00 UFC/g (GRÁFICO 5). Acredita-se que isso tenha sido possível de ser atingido porque deve ter havido, por parte da indústria de fabricação desses queijos, uma preocupação maior em atingir o máximo de qualidade higiênico-sanitária desse produto desde o início da linha de produção (matéria-prima) até a estocagem. Ficou comprovado pela ausência total de crescimento em placa que é possível chegar-se a um produto "inócuo".

Em acordo com a Portaria nº 451 (BRASIL, 1997) o queijo Minas frescal é considerado queijo de alta umidade ($46\% < \text{umidade} < 55\%$), sendo assim, ao avaliar os resultados, verificou-se perante a Legislação que os queijos analisados variaram em três classes de umidade: média, alta e muito alta umidade. Todavia a maioria das amostras

analisadas se apresentaram na classe muito alta, enquadrando-se, assim, dentro das normas vigentes (BRASIL, 1997). De acordo com as percentagens de umidade obtidas, estes queijos possuíam condições que favorecem o crescimento microbiano, visto que a água é um dos fatores mais importantes para o seu desenvolvimento.

De acordo com os resultados obtidos para pH, observou-se uma variação de 4,3 a 6,54. Porém, as normas referentes aos Padrões Microbiológicos de Alimentos (BRASIL, 1997) não fazem referência a padrões de pH para os diferentes tipos de queijos. Sabe-se que o pH dos queijos, de um modo geral, está na faixa de pH 4,0 -6,5 (PINTO et al., 1996), o pH dos queijos, de um modo geral, está na faixa de pH 4,0-10 (FRANCO & LANDGRAF, 1996). No presente trabalho, a variação do pH obtido encontra-se dentro da faixa citadas pelos dois autores. Porém, segundo BAIRD-PARKER (1990), o pH mínimo e máximo para crescimento de *S. aureus* é de 4,0-10. Sendo assim, ao analisar os valores pH e acrescido da alta umidade encontrada nas amostras, estas se encontram em condições que favorecem o crescimento de *S. aureus*, pois segundo FRANCO & LANDGRAF (1996), a faixa de pH mais favorável para crescimento de microorganismos é de 6,5-7,5.

Usando-se análise de Regressão Linear para as variáveis pH, umidade e tempo de prateleira individualmente, verso crescimento bacteriano (UFC) como variável dependente, a umidade e tempo de prateleira tiveram pouquíssima influência na carga bacteriana ($P<0,01$) com valores 9,12% ($r^2=0,0912$) e 1,69% ($r^2=0,0169$) respectivamente. O pH teve 23,89% ($r^2=0,2389$) de influência na carga bacteriana ($p<0,01$), evidenciando que o pH baixo favoreceu o crescimento de *Staphylococcus* e/ou *Micrococcus* nos queijos sob estudo (TABELA 7). Embora pareça contraditório, esse fato é plenamente justificável quando se encontrou os queijos mais ácidos, se encontrou maior contagem (>UFC) de *Staphylococcus*

e/ou *Micrococcus*, ou seja, estas bactérias já teriam crescido e acidificado os queijos, na época da análise microbiológica.

Analizando as variáveis pH e umidade associadas, em relação a UFC, só o pH novamente mostrou-se significativo, explicando 25,20% ($r^2=0,2520$) de influência sobre o crescimento bacteriano, o que demonstrou pouquíssima ação sinérgica entre as variáveis dependentes (TABELA 7). No presente estudo a umidade foi bastante variada, mas sem qualquer influência significativa sobre o crescimento de *Staphylococcus* e/ou *Micrococcus* ao contrário, do pH cuja influência foi significativa. Ao analisar as variáveis pH e tempo de prateleira associadas, em relação a UFC observou-se que houve 24,13% ($r^2=0,2413$) de influência e ao analisar-se as variáveis umidade e tempo de prateleira observou-se uma influência de 9,53% ($r^2=0,0943$). Porém, ao analisar-se as três variáveis juntas a ação foi de 25,61% ($r^2=0,2561$) (TABELA 7), evidenciando assim, que houve um acréscimo de 0,034 log UFC de *Staphylococcus* e/ou *Micrococcus/g* de queijo, confirmado que a medida que aumenta o tempo de estocagem aumenta o número de *Staphylococcus*. Em contra partida, à medida que umidade e pH aumentam, há um decréscimo de 0,058 e 1,88 UFC/g respectivamente. Sendo assim, a combinação das três variáveis independentes justifica que pH e umidade baixos e menor tempo de prateleira, tiveram um aumento na UFC/g (TABELA 6). A influência do pH sobre o crescimento bacteriano não é um fato novo (FRANCO & LANDGRAF, 1996). O *Staphylococcus* e *Micrococcus* são bactérias fermentadoras que acidificam rapidamente o meio e a umidade apesar de contribuir para o crescimento das bactérias, em alto teor, inibe o crescimento. Adicionalmente, o tempo de prateleira não foi significante, fato este justificado por ter se usado variações de diferentes tempo de prateleira, porém sem ultrapassar o prazo de validade dos queijos.

Ao fazer comparações entre os meios, observou-se que o meio BP teve colônias típicas em maior número e a enumeração também foi maior quando comparado ao meio de VJ, concordando com observações prévias, obtidas por BAIRD-PARKER (1990) e WENDPAP & ROSA (1993). Segundo BAIRD-PARKER (1990) o meio BP é um meio superior e de melhor reconhecimento em relação aos demais meios para enumeração de *S. aureus* em alimentos, sendo portanto, o meio mais simples e digno de confiança, além de favorecer na recuperação de células estressadas pela temperatura e inibir o crescimento de células competitivas. No presente estudo, algumas vezes também cresceram colônias típicas em coloração (pretas) porém sem halo ou aparentemente com dois halos, cujo resultados dos testes bioquímicos levaram à identificação de *S. aureus*, concordando com as observações de BAIRD-PARKER (1990). O meio de diagnóstico característico é a produção do halo produzido devido a hidrólise do lipovitelino encontrado na gema de ovo no meio BP, todavia, BAIRD-PARKER (1990) afirma que algumas cepas bovinas de *S. aureus* são negativas para este teste e colônias características deveriam ser usadas em adição quando se analisa produtos lácteos. Diante das análises para isolamento de *Staphylococcus* spp. observou-se que no total, três amostras de queijos apresentaram contagem de colônias suspeitas para *Staphylococcus* spp. dentro do padrão permitido pela legislação (BRASIL, 1997), nove amostras deram crescimento zero e 45 amostras deram acima do padrão (GRÁFICO 6), e diante dessas contagens foram isoladas colônias de *S. aureus*, leveduras, *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp. coagulase negativa, *Staphylococcus* spp. coagulase positiva e *Streptococcus* spp.

Sete amostras (quatro com SIF e três sem SIF) apresentaram *S. aureus*, sendo que seis estavam com a contagem acima do permitido e somente uma foi positiva, mesmo dentro do

padrão (10^3) e inclusive esta não tinha SIF. Estes resultados poderiam ser justificados por fatores mencionados anteriormente (GILMOUR & HARVEY, 1990; PINTO et al., 1996), como falhas ocorridas durante a ordenha ou processamento e/ou pós-processamento e/ou problemas de armazenamento no transporte e/ou aliada as temperaturas inadequadas de conservação em nível de comércio varejista, que têm contribuído para a comercialização dos produtos lácteos com característica microbiológicas fora dos padrões regulamentares. Muito embora o *S. aureus* tenha sido isolado em maior quantidade de queijos com SIF, esse fato não é justificável, porque o número de amostras sem SIF examinadas estatisticamente foi bem inferior às amostras com SIF.

Vale à pena ressaltar que em 18 amostras foram isolados *Micrococcus* spp., muito embora essa bactéria não seja muito descrita como contaminante de queijos, talvez por ser considerada “insignificante”. Porém, PARDI et al. (1996) em uma de suas observações cita o *Micrococcus* sp. como gênero pertencente aos psicotróficos e deteriorante de alimentos. A grande ocorrência dessa bactéria no queijo Minas pode ser decorrente da contaminação pós-processamento e, consequentemente um dos principais contribuintes para a rápida deterioração do alimento. Segundo GENIGEORGIS (1989), BAIRD-PARKER (1990) e MURRAY et. al. (1998) os *Micrococcus* spp. podem colonizar principalmente a superfície das pele humana. Entretanto, podem ser encontrados em pacientes com infecções oportunista mas, o isolamento nos achados clínicos não são representativos, sendo assim, são considerados como contaminantes na flora da pele e, a partir daí, conclui-se que eles podem perfeitamente contaminar o queijo durante ou após o processamento.

Quanto aos *Staphylococcus* spp. coagulase negativa, foram isoladas 93 colônias em 28 amostras (49,12%). Estes resultados foram superiores aos encontrados por SENA (2000)

que isolou 96 (25,00%) colônias desta bactéria em 107 amostras de queijo coalho. Esta autora justifica que este valor está relacionado com aumento da incidência desta bactéria em casos de mastite bovina, o que pode ser também justificável para os resultados obtidos para o queijo Minas frescal.

As cinco amostras que tiveram contagem zero para mesófilos totais e *Staphylococcus* spp., podem ser classificadas assim, como alto padrão higiênico-sanitário, entretanto, tiveram a umidade calculada acima do padrão. Estes resultados mostram que apesar dos queijos possuirem umidade alta, não influenciou a qualidade microbiológica, sugerindo que a aplicação do "Hazard analysis of Critical Control Point" (HACCP ou APPCC) na indústria é mais importante que outros aspectos físico-químicos em relação a carga microbiana. Uma ressalva a ser feita é quanto ao valor encontrado na amostra 11AL para Contagem Total de mesófilos. Ao analisar-se três repetições desta marca, observou-se uma contagem relativamente alta em uma das amostra em relação às outras duas com 0,00 UFC/g, sendo justificável pela provável contaminação durante as análises laboratoriais. O mesmo pode ser justificável para os valores similares encontrados para contagem de *Staphylococcus* spp.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que, de maneira geral, os queijos analisados necessitam de uma maior atenção em relação às medidas de HACCP, para garantir ao consumidor um produto final com mais qualidade e segurança.

Ao analisar-se os resultados estatísticos, verificou-se uma relação significativa entre pH baixo e elevada contagem da UFC/g de *Staphylococcus* e/ou *Micrococcus*. Essa elevada contagem pode ser justificada por uma contaminação inicial acrescida pelo acondicionamento impróprio, possivelmente em temperatura inadequada e pH inicial

elevado, possibilitando que as bactérias crescessem, consequentemente acidificando o queijo. Desta forma, por ocasião da coleta para exame bacteriológico a fase logarítmica encontrava-se no platô ou início da fase de declínio e o pH baixo.

GRÁFICO 5. Distribuição gráfica da freqüência da contagem de mesófilos aeróbicos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por amostra de queijo Minas frescal.

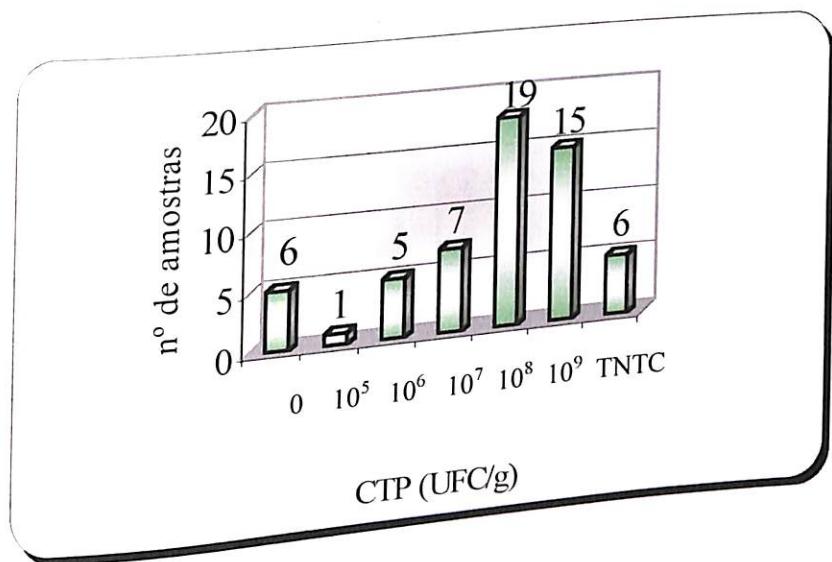
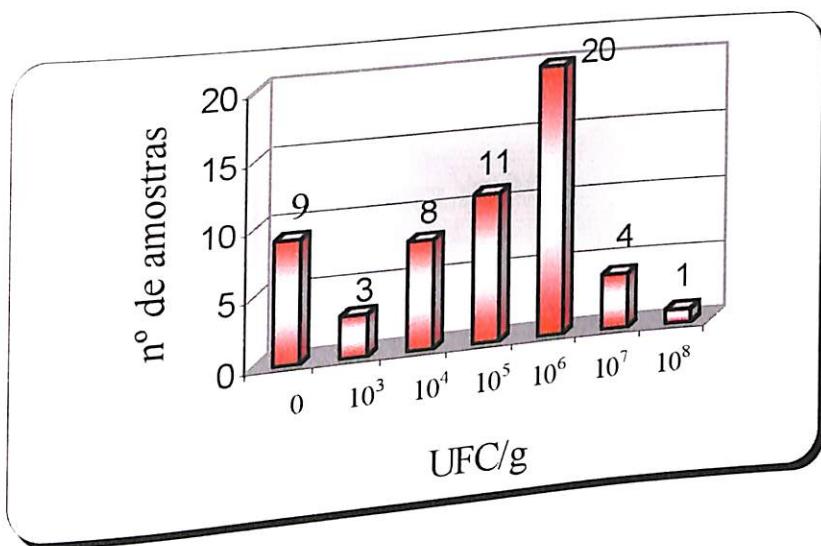


GRÁFICO 6. Distribuição da contagem total de *Staphylococcus* spp. isolados de 57 amostras de queijo Minas frescal consumidos no Estado do Rio de Janeiro.



VI. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram as seguintes conclusões:

1. Os queijos analisados não apresentavam risco à Saúde Pública, no que se refere a presença de *Listeria monocytogenes*, estando de acordo com a Legislação vigente, que não permite a presença dessa bactéria em 25g de alimento.
2. A presença de *Staphylococcus aureus* coagulase positivo e contagem para *Staphylococcus* spp. acima do permitido, em algumas amostras de queijos, demonstrou que as características higiênico-sanitárias destas amostras estavam deficientes, podendo assim, ter repercutido na saúde do consumidor, pelo processo chamado intoxicação alimentar.
3. A contaminação dos queijos se deu independentemente deles terem ou não o Serviço de Inspeção Federal (SIF). Sendo assim, os queijos com o carimbo do "SIF" não os garantiu que estivessem enquadrados nas normas vigentes de segurança alimentar.

4. Existe uma diversidade bastante grande nos diferentes queijos tipo Minas frescal comercializados, avaliadas pela marcante variação de pH e percentagem de água, além da variação das condições higiênicas durante a produção, refletida pela presença de número total de microorganismos/g desse alimento.

5. O pH baixo dos queijos Minas frescal teve uma influência significativa, visto que desfavoreceu o crescimento de *Staphylococcus* e/ou *Micrococcus*, enquanto a umidade, embora a maioria estivesse com valor acima do permitido, não influenciou no crescimento destes microorganismos, e o tempo de prateleira também pouco influenciou pois estavam todos dentro do prazo de validade.

6. Existem três marcas de queijos tipo Minas frescal, comercialmente disponíveis para consumo que se apresentaram completamente livres de microorganismos, pelo menos em uma de suas amostras, caracterizando e provando que é possível se obter o ideal em qualidade higiênico-sanitária, ausência total de microorganismo, embora não exigido pelas Normas Sanitárias.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 1976. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 14th ed. Springfield V.A. Byrd Pre, Press Inc., 416p.
- ANGELOTTI, R.; FOTER, M. J.; LEWIS, K. H. 1961. Time-temperature effects on *Salmonella* and staphylococci in foods. I. Behavior in refrigerated foods. *Am. J. Public Health*, 51:76-83.
- ANONYMOUS. 1987a. *Staphylococcus* isolation an identification. In: Laboratory Syllabus- Food Science and Tecnology. 104L. U.C. Davis, California. 104p.
- ANONYMOUS. 1987b. Coliform Enumeration. In: Laboratory Syllabus - Food Science and Technology 104L. U.C. Davis, Davis, California, 104p.
- ANONYMOUS. 1990. CDC links cajun pork sausage to listeriosis case: product recall. *Food Chemical NEWS*. January 1, 35.
- ARBUTHNOTT, J. P.; COLLEMAN, D. C.; AZAVEDO, J. S. 1990. Staphylococcal toxins in human disease. *J. of Appl. Bacteriol. Symposium Supplement*, 101S-107S.
- ARCHER, D. L. 1988. Review of the latest FDA information on the presence of *Listeria* in foods. WHO Working Group of Foodborne Listeriosis, Geneva, Switzerland, Feb.15-19.
- AZADIAN, B. S.; FINNERTY, G. T. & PEARSON, A. D. 1989. Cheese-borne *Listeria meningitis* in immunocompetente patient. *Lancet*, 1:322-323.
- BAER, E. F.; GRAW, R. J. M.; ORTH, D. S. 1976. Method for the enumeration of *Staphylococcus aureus*. In: SPECK, M. L. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 2 ed. Washington: APHA, p 374-386.

- BAIRD-PARKER, A. C. 1990. The Staphylococci: an introduction. *J. of Appl. Bacteriol. Symposium Supplement*, 1S-8S.
- BANSAL, B. K., SING, K. B., RANDHAWA, S. S., JOSHI, D. V. 1994. Evaluation of post milk test dipping and period therapy programme for mastitis control in cows. *Indian J. of Dairy Sci.*, 47(9):734-737.
- BANNISTER, B. 1987. *Listeria monocytogenes* meningitis associated with eatin soft cheese. *J. Infect.*, 15:165-168.
- BARBOSA, C. G.; ROBBS, P. G.; RAIMUNDO, S. M. C. 1993. Behaviour of *Staphylococcus aureus* and of *Escherichia coli* and injury formation during production and storage phases of "prato" cheese. *Rev. Microbiol.*, 24(2):118-124.
- BARBER, M. A. 1914. Milk poisoning due to a type of *Staphylococcus albus* occurring in the udder of a healthy cow. *Philippine J. of Sci. Section B (Tropical Medicine)*, 9:515-519.
- BAUER, A. W., KIRBY, W. M. M., SHERRIS, J. C., TURCK, M. 1966. Antibiotic susceptibility test by a standardized disc method. *Amer. J. Clin. Path.*, 45:493-496.
- BECKERS, H. J.; SOENTORO, P. S. S.; DELFGOU-VAN ASCH, E. H. M. 1987. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft cheese and raw milk and its resistance to heat. *Int. J. Food Microbiol.*, 4:249-256.
- BERGDOLL, M. S. 1979. Staphylococcal intoxications. In: H. RIEMANN & F. L. BRYAN. *Foodborne infections and intoxications*. Academic Press, ed. Inc. N. Y. p.443-494.
- BERGDOLL, M. S. 1989. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P. *Food-borne Bacterial Pathogens*. ed., New York: Marcel Dekker, p.464-523.
- BETLEY, M. J.; HARRIS, T. O. 1994. Staphylococcal enterotoxins: genetic characterization and relationship between structure and emetic activity. *Food Microbiol.*, 11:09-121.
- BIBERSTEIN, E. L. 1990. Staphylococci. In: E. L. BIBERSTEIN & Y. C. ZEE eds. *Review of Veterinary Microbiology*. p.150-156.
- BILLE, J. 1986. Listeriose - Données Épidémiologiques Récentes Relatives à La Listeriose Humaine en Suisse. *Bull. Santé Public.*, 50(12):413-415.

- BAIRD-PARKER, A. C. 1990. The Staphylococci: an introduction. *J. of Appl. Bacteriol. Symposium Supplement*, 1S-8S.
- BANSAL, B. K., SING, K. B., RANDHAWA, S. S., JOSHI, D. V. 1994. Evaluation of post milk test dipping and period therapy programme for mastitis control in cows. *Indian J. of Dairy Sci.*, 47(9):734-737.
- BANNISTER, B. 1987. *Listeria monocytogenes* meningitis associated with eatin soft cheese. *J. Infect.*, 15:165-168.
- BARBOSA, C. G.; ROBBS, P. G.; RAIMUNDO, S. M. C. 1993. Behaviour of *Staphylococcus aureus* and of *Escherichia coli* and injury formation during production and storage phases of "prato" cheese. *Rev. Microbiol.*, 24(2):118-124.
- BARBER, M. A. 1914. Milk poisoning due to a type of *Staphylococcus albus* occurring in the udder of a healthy cow. *Philippine J. of Sci. Section B (Tropical Medicine)*, 9:515-519.
- BAUER, A. W., KIRBY, W. M. M., SHERRIS, J. C., TURCK, M. 1966. Antibiotic susceptibility test by a standardized disc method. *Amer. J. Clin. Path.*, 45:493-496.
- BECKERS, H. J.; SOENTORO, P. S. S.; DELFGOU-VAN ASCH, E. H. M. 1987. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft cheese and raw milk and its resistance to heat. *Int. J. Food Microbiol.*, 4:249-256.
- BERGDOLL, M. S. 1979. Staphylococcal intoxications. In: H. RIEMANN & F. L. BRYAN. *Foodborne infections and intoxications*. Academic Press, ed. Inc. N. Y. p.443-494.
- BERGDOLL, M. S. 1989. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P. *Food-borne Bacterial Pathogens*. ed., New York: Marcel Dekker, p.464-523.
- BETLEY, M. J.; HARRIS, T. O. 1994. Staphylococcal enterotoxins: genetic characterization and relationship between structure and emetic activity. *Food Microbiol.*, 11:09-121.
- BIBERSTEIN, E. L. 1990. Staphylococci. In: E. L. BIBERSTEIN & Y. C. ZEE eds. *Review of Veterinary Microbiology*. p.150-156.
- BILLE, J. 1986. Listeriose - Donnés Épidémiologiques Récentes Relatives à La Listérose Humaine en Suisse. *Bull. Santé Public.*, 50(12):413-415.

BRASIL. Portaria nº 451 de 19 de setembro de 1997. Padrões microbiológicos de alimentos. Diário Oficial Brasília: Ministério da Saúde/ Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Anexo I. P. 8.

BRYAN, F. L. 1976. *Staphylococcus aureus*. In: DEFIGUEIREDO, M. P. & SPLITSTOESSER, D. F. (eds.). Food microbiology: public health and spoilage aspects. AVI Publishing Co., Inc., Westport, CT. p. 12-128.

CAMPOS, M. L. C. 1980. *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e bactérias do gênero. Dissertação de Doutorado em Ciências. São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

CANTONI, C.; BALZARETTI, C.; VALENTI, M. 1989. A case of *Listeria monocytogenes* humans infection associated with the consumption of "Testa in Cascetta" (cooked meat pork product). *Arch. Vet. Ital.*, 40:41-142.

CARMO, L. S.; BERGDOLL, M. S. 1990. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte, MG (Brazil). *Rev. Microb.*, 21(4):320-323.

CORBIA, A. C. G.; NASCIMENTO, M. G. F.; OLIVEIRA, C. Z. F.; NASCIMENTO, E. R.; LIGNON, G. B. 1998. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva em queijo Minas frescal. In: Congresso Latino Americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos, V, Simpósio Brasileiro de Microbiologia de Alimentos, VI, Águas de Lindóia, Anais. Águas de Lindóia, p.123.

COX, L. J., KLEISS, T., CORDIER, J. L., CORDELLANA, C., KONKEL, P., PEDRAZZIN, C., BEUMER, R., SIEBENGA, A. 1989. *Listeria* spp. in food processing, non food and domestic environments. *Food Microbiol.* 6:49-61.

DESTRO, M. T., SERRANO, A. M. 1990. *Listeria* spp. em alimetros. *Col. Soc. Ciência Tecnol. Alim.*, 24(1/2):13-37.

DI GIACOMO, R.F., KOEPSELL,T.D. 1986. Sampling for detection of infection or disease in animal populations. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 189:22-23.

DOYLE, M. P.; GLASS, K. A.; BEERY, T. J. 1987. Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high temperature short time pasteurization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53 (7):1433-1438.

EIROA, M. N. U. 1989. *Listeria monocytogenes* - Características, ocorrência e desenvolvimento em alimentos. *Col. ITAL*, jan./jun., 20(1):13-22.

FERNÁNDEZ-ESCARLÉTION et al. 1983. Destino de *Staphylococcus aureus* nativo y de *Salmonella* artificialmente inoculada en la leche durante la elaboración e almacenamiento de quesos frescos no pasteurizados. II. Influencia del pH, de la flora

- associada y del nivel original de contaminación del patógeno. *Rev. Latino Am. Microbiol.*, 25(2):79-86.
- FERNANDEZ-GARAYZABAL, J. F.; DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, L.; VASQUEZ BOLAND, J. A.; et al. 1987. Survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk treated in a pilot plant size pasteurizer. *J. Appl. Bacteriol.*, 63: 533-537, 1987.
- FLEMING, D. W., COCHI, S. L., MACDONALD, K. L., BRONNDUM, J., HAYS, P. S., PLIKAYTIS, B.D., HOLMES, M.B., ANDURIER, A. BROOME, C. V., REINGOLD, A. L. 1985. Pasteurized milk as a Vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N. Engl. J. Med. Boston*, 312 (7):404-407.
- FRANCO, R. M.; ALMEIDA, L. E. F. 1992. Avaliação Microbiológica de Queijo Ralado, Tipo "Parmesão", comercializado em Niterói, RJ. *Rev. Hig. Alim.*, 6(21):33-36.
- FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M. 1996. Microbiologia dos alimentos. Rio de Janeiro. Atheneu ed. 182p.
- FURLANETTO, S. M. P., NADER FILHO, A., WILSON, D. 1987. *Staphylococcus aureus* enterotoxigenicos a partir de leite de vacas mastísticas. *Rev. Microb.*, 18(2):138-143.
- FURLANETTO, S. M. P.; SANTOS, M. A. A.; HARA, C. 1996. *Listeria spp* - Avaliação da eficiência de quatro meios de plaqueamento no seu isolamento. *Rev. Hig. Alim.*, 10(46): 30-34.
- GELLI, D. S., MARTINS, M. C. 1986. *Staphylococcus aureus* produtos de termonuclease em alimentos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.*, 46(1/2):103-109.
- GENIGEORGIS, C. A. 1989. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *International J. of Food Microbiol.*, (9):327-360.
- GENIGEORGIS, C. A.; RIEMANN, H.; SADLER, W. W. 1969. Production of enterotoxin B in cured meats. *J. Food Sci.*, 34:62-68.
- GILMOUR, A., HARVEY, J. 1990. Staphylococci in milk and products. *J. of Appl. Bacteriol. Symposium Supplement*, 147S-166S.
- GONÇALVES, P. M. R. Toxinfecções alimentares: uma revisão. 1998. *Rev. Hig. Alim.*, 12(53): 38-43.
- HALF-DOHNALEK, M. I., MARSH, E. H. 1989. *Staphylococcus aureus*: production of extracellular compounds and behaviour in foods-A review. *J. of Food Protect.*, 52:267-282.

- HARBRECHT, D. F.; BERGDOLL, M. S. 1980. Suphylococcal enterotoxin B production in hard-boiled eggs. *J. Food Sci.*, 45: 307-309.
- HO, J. L.; SHANDS, K. N.; FRIEDLAND, G.; ECKIND,P.; FRASER, D. W. 1986. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. *Arch. Intern. Med.*, 146: 520-524.
- HOLT, J. G., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H. A. STANLEY, J. T., WILLIANS, S. T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, 9^o ed. 787p.
- HUMPHREYS, H.; KEANE, C. T.; HONE, R.; POMEROY, H.; RUSSEL, R. J.; ARBUTHNOTT, J. P.; COLEMAN, D. C. 1989. Enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of septicaemia and from healthy carriers. *J. Medical Microbiol.*, 28:163-172.
- JENSEN, A.; FREDERIKSEN, W.; GERNER-SMITH, P. 1994. Risk factors for listeriosis in Denmark, 1989-1990. *Scand. J. Infect. Dis.*, 26:171-178.
- KERR, K. G.; DEALLER, S. F.; LACEY, R. W. 1988. Materno-fetal listeriosis from cook-chill and refrigerated food. *Lancet ii*, 1133.
- KOKAN, N. P.; BERGDOLL, M. S. 1987. Detection of low-enterotoxin producing *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 2675-2676.
- LENNON, D.; LEWIS, B.; MANTELL, C.; BECROFT, D.; DOVE, B.; FARMER, K.; TONKIN, S.; YEATS, N.; STAMP, R.; MICKLESON, K. 1984. Epidemic perinatal listeriosis. *Pediat. Infect. Dis.*, 3: 30-34.
- LINNAN, M. J.; MASCOLA, L.; LOU, X. D.; GOULET, V.; MAY, S.; SALMINEN, R. N.; HIRD, D. W.; YONEKURA, M. L.; HAYES, P.; WEAVER, R.; AUDURIER, A.; PLIKAYTIS, B. D.; FANNIN, S. L.; KLEKS, A.; BROOME, C. V. 1988. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *New Engl. J. Med.*, 319:823-828.
- LOVETT, J. 1987. *Listeria* isolation. In: United States Department of Health, Education and Welfare. Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 6ed. Washington. DC. 1984. Supl. 9.
- LOVETT, J. 1988. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes*. *Food Technol.*, 4: 172-175.
- LOW, J. C., DONACHE, W. 1997. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *The Veterinary J.*, 153:9-29.

- McLAUCHILIN, J. 1996. The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control*, 7(4/5):187-193.
- McLAUCHILIN, J.; HALL, S. M.; VELANI, S. K.; GILBERT, R. J. 1991. Human listeriosis and paté: a possible association. *Brit. Med. J.*, 303:773-775.
- MASSA, S.; CESARONI, D.; PODA, G.; TROVATELLI, L. D. 1990. The incidence of *Listeria* spp. in soft cheeses, butter and raw milk in the province of Bologna. *J. Appl. Bacteriol.*, 68: 153-156.
- MENARD, J. L., MENS, P., LEMENS, P. 1993. The battle against *Listeria monocytogenes* in milk. *Chevre*, 195:38-40.
- MERRIL, G. A.; WERNER, S. B.; BRYANT, R. G.; FREDSON, D; KELLY, K. 1984. Staphylococcal food poisoning associated with an Easter egg hunt. *J. Am. Med. Assoc.*, 252:1019-1022.
- MINOR, T. E., MARTH, E. H. 1972. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal food intoxications. A review. III. Staphylococci in dairy foods. *Food Technol.*, 35:77-82.
- MINOR, T. E.; MARTH, E. H. 1976. Staphylococci and their Significance in Foods. Elsevier. New York, NY (USA).
- MURRAY, E. G. D., WEBB, R. A., SWAN, M. R. R. 1926. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a Litherto underscribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. Sp.) *J. Pathol. Bacteriol.*, 29:407-439.
- MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S., KOBAYASHI, G. S., PFALLER, M. A. 1998. Medical Microbiology. 3th ed. Mosby-Year Book. p. 175-188.
- NASCIMENTO, M. G. F. 1991. Bactericidal properties of naturally occurring peptides against *Listeria monocytogenes*. Dissertation, PhD. University of California, Davis, USA, 227p.
- NASCIMENTO, M. G. F., CULLOR, J. S. 1994. Listerose humana - epidemiologia e fontes de contaminação. *Rev. Hig. Alim.*, 8(32):13-17.
- OLIVEIRA, A. N. 1993. Bactérias do gênero *Listeria* em leite e derivados no comércio varejista de Goiânia. Dissertação de Mestrado na área de Inspeção de Carne, leite e derivados. Belo Horizonte. Instituto de Veterinária da UFMG.
- OTERO, A., GARCIA, M. C.; GARCIA, M. L.; PRIETO, M.; MORENO, B. 1988. Behaviour of *S. aureus* strains, producers of enterotoxins C1 or C2, during the manufacture and storage of burgos cheese. Oxford, England. *J. of Appl. Bacteriol.*, 64(2):117-122.

- PAPAGEORGIOU, D. K.; MARTH, E. H. 1989. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture, repacking and storage of Feta cheese. *J. Food Protect.*, 52:82-87.
- PARDI, M. C., SANTOS, I. F., SOUZA, E. R., PARDI, M. S. 1995. Aspectos higiênico-sanitários da carne. In: Ciência, Higiene e Tecnologia de Carne. 1ºed. ed. UFG. 586p. p.265-440.
- PEREIRA, M. L. & ROCOURT, J. 1993. *Listeria monocytogenes* – Uma revisão sobre aspectos taxonômicos, importância médica e em alimentos. *Rev. Hig. Alim.* 7:(26): 5-12.
- PEREIRA, M. L., ROCOURT, J. 1994. Métodos de detecção de *Listeria monocytogenes* em alimentos – uma revisão. *Rev. Hig. Alim.*, 8(30):12-16.
- PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; SANTOS, E. J.; PEREIRA, J. L.; BERGDOLL, M. S. 1996. Enterotoxin H in Staphylococcal Food Poisoning. *J. of Food Protect.*, 59(5): 559-561.
- PEREIRA, M. L.; LARA, M. A.; DIAS, R. S.; CARMO, L. S. 1991. Intoxicação por *Staphylococcus aureus* provocada por queijo tipo "Minas". *Rev. Microbiol.*, 22(4): 349-350.
- PEREIRA, M. L., PEREIRA, J. L., SERRANO, A. M., BERGDOLL, M. S. 2000. Estafilococos: Até onde sua importância em alimentos? *Rev. Hig. Alim.*, 44(68/69):32-40.
- PINTO, P. S. A.; GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P.M.L. 1996. Queijo Minas: Problema emergente da vigilância sanitária. *Rev. Hig. Alim.*, 10(44):22-35.
- PIRIE, J. H. H. 1927. A new disease of Veld rodents "Tiger River Disease". *Publ. S. African Inst. Med. Res.*, 20 (3): 163-186.
- REED, G. H. 1994. Food Illness (Part 10) – *Listeria monocytogenes*. *Dairy, Food and Environ. Sanit.*, 14(8):482-483.
- REMINGTON, R. D., SCHORK, M. A. 1970. Statistics with applications to the biological and health science. New Jersey: Prentice-Hall, Inc.; ed., 418p.
- ROBERTS, D. 1990. Sources of infection: food. *Lancet Bristish edition*, 336(8719):859-861.
- ROCOURT, J. 1996. Risk factors for Listeriosis. *Food Control*, 7(45):195-202.

- ROCOURT, J.; BOERLIN, P.; GRIMONT, F.; JACQUET, C.; PIFFARETTI, J. C. 1992. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi* with a revised description of *Listeria grayi*. *Intern. J. of Systematic Bacteriol.*, 42 (1): 171-174.
- ROCOURT, J.; GOULET, V.; LEPOUTRE-TOULEMON, A.; JACQUET, Ch.; CATIMEL, B.; REBIERE, L.; MIEGEVILLE, A. F.; COURTEAU, A. L.; PIERRE, O.; DEHAUMONT, P.; VEIT. 1993. Epidémie de listériose en France en 1992. *Méd. Mal. Infect.*, 235: 481-484.
- ROCOURT, J.; WEHMEYER, U.; STACKBRANDT, E. 1987. Transfer of *Listeria denitrificans* to a new genus, *Jonesia* gen. Nov. as *Jonesia denitrificans* comb. no. *Int. System Bacteriol.*, 37: 266-270.
- RODRIGUES, F. T.; VIEIRA, M. D.; SANTOS, J. L.; PIENE, S. J.; ARAUJO, W. C.; ANDRADE, N. J.; BRANDÃO, S. C. C. 1995. Características microbiológicas de queijo tipo "Minas Frescal" comercializados em Viçosa, MG. In: Congresso Nacional de Laticínios, 13º, Juiz de Fora, MG. Anais. Juiz de Fora, p.233-235.
- ROSKEY, C. T., HAMDY, M. K. 1972. Bruised poultry tissue as a possible source of staphylococcal infection. *Appl. Microbiol.*, 23:683-687.
- RYSER, E. T.; MARTH, E. H. 1987. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Camembert Cheese. *J. Food Prot.*, 50 (5): 372-378.
- RYSER, E. T.; MARTH, E. H. 1989. Behavior of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of Camembert cheese. *J. Food Protect.*, 50: 372-378.
- SABIONI, J. G. et al. 1988. Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. *Rev. Saude Publ.*, 22(5):458-461.
- SABIONI, J. G.; NASCIMENTO, D.; PEREIRA, J. L. 1994. Intoxicação Estafilocócica causada por queijo tipo "Minas" em Ouro Preto, Minas Gerais, 1992. *Rev. Hig. Alim.*, 8(33): 22-23.
- SANTOS, E. C., GENIGEORGIS, C. 1989. Survival and growth of *Staphylococcus aureus* in commercially manufactured Brazilian Minas cheese. *J. of Food Protect.*, 44(3):177-184.
- SCHLECH, W. F.; LAVIGNE, P. M.; BORTOLUSSI, R. A.; ALLEN, A. C.; HALDANE, E. V.; WORT, A. J.; HIGHTOWER, A. W.; JOHNSON, S. E.; KING, S. H.; NICHOLLS, E. S.; BROOME, C. V. 1983. Epidemic listeriosis: evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.*, 308: 203-206.

- SCHUCHAT, A., DEAVWER, K. A., WENGER, J. D., PLIKAYTIS, B. D., MASCOLA, L., PINNER, R. W., REINGOLD, A. L., BROOME, C. V. 1992. Role of foods in sporadic listeriosis. 1. Case-control study of dietary risk factors. *J. Amer. Med. Assoc.*, 267:2041-2045.
- SEELIGER, H. P. R., JONES, D. 1986. Genus *Listeria*. In: SNEATH, P. H. A., MAIR, N. S., SHARPE, M. E. eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9a. ed. V.2, Baltimore, Willians, p. 1235-1245.
- SENA, M. J. 2000. Perfil epidemiológico, resistência de antibióticos e aos conservantes nisina lactoperoxidase de *Staphylococcus* spp. isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE. Dissertação de Doutorado em Tecnologia de Carne, leite e derivados. Belo Horizonte. Instituto de Veterinária da UFMG.
- SILVA, M. C. D., LIMA, A. W. O. STAMFORD, T. L. 1981. Condições higiênicas sanitárias de carne de sol comercializada no município do Recife-PE, II, *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos. Encontro Nacional de Analistas de Alimentos – VII.
- SILVA, M. C. D.; HOFER, E.; TIBANA, A. 1998. Incidence of *Listeria monocytogenes* in Cheese Produced in Rio de Janeiro, Brazil. *J. of Food Protect.*, 61(3): 354-356.
- SILVA, M. C. D. 1997. *Listeria monocytogenes* em alimentos: ocorrência, avaliação de métodos para detecção e caracterização das cepas isoladas. Dissertação de Doutorado em Ciências (Microbiologia). Rio de Janeiro. Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da UFRJ.
- SILVA, M. C. D.; TIBANA, A. 1995. *Listeria monocytogenes* em alimentos: Seu significado nos dias atuais. *Rev. Hig. Alim.*, 9(38):7-10.
- SMITH, J. L., BUCHANAN, R. L., PALUMBO, S. A. 1983. Effect of food environment on Staphylococcal enterotoxin syntheses: a review. *J. Food Protect.*, 46(6):545-555.
- SPAHR, U.; URL, B. 1994. Behaviour of Pathogenic Bacteria in Cheese – A Synopsis of Experimental Data. *Bulletin of the IDF*, 298: 2-16.
- SU, Y. C.; WONG, A. C. L. 1995. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin H. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:1438-1443.
- TATINI, S. R.; WESALA, W. S.; JEZESKI, J. I.; MORRIS, M. A. 1973. Production of Staphylococcal enterotoxin A in Blue, Black, Mozzarella and Swiss cheeses. *J. of Dairy Sci.*, 56:429-435.
- THATCHER, F. S.; CLARCK, D. S. 1973. Análisis Microbiológico de los Alimentos. Zaragoza, Acribia. 217p.

- TODD, E. C. D. 1989. Preliminary estimates of costs of foodborne disease in the USA. *J. Food Protect.*, 52: 595-601.
- WALKER, S. J.; ARCHER, P.; BANKS, J. J. 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J. Appl. Bacteriol.*, 68(2):157-162.
- WENDPAP, L. L., ROSA, O. O. 1993. Presença de *Staphylococcus aureus* em queijos Minas consumido no município de Cuiabá, MT. *Rev. Hig. Alim.*, 7(27):23-29.
- WIENEKE, A. A.; ROBERTS, D.; GILBERT, B. J. 1993. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-90. *Epidemiol. Infect.* 110: 519-531.
- WHO 1988. – Listerioses d'origine alimentaire. Rapport d'un groupe informel de travail de l'OMS. Org. Mond. Santé, Geneva, 1-19. WHO/EHE/FOS/88.5.

APÊNDICE

1. Ágar Baird Parker:

Suspender 58g do meio desidratado (Merck) em 950mL de água destilada. Esperar 15 minutos para enxarcar “o pó” e aquecer em banho-maria até dissolver completamente. Esterilizar em autoclave (121°C , por 15 min). O pH deve estar à $6,8 \pm 0,2$. Após esfriar até $45\text{-}50^{\circ}\text{C}$, adicionar 50 mL de emulsão estéril de gema de ovo, 3 mL de solução aquosa de telurito de potássio a 3,5% (esterilizado por filtração) misturar e verter em placa.

2. Emulsão de ovo:

Lavar os ovos com sabão e água morna. Secar, emergir em solução aquosa de cloreto de mercúrio a 1%, por 10 min. Secar em toalha estéril. Quebrar a casca e separar a gema, colocando-a numa proveta estéril. Adicionar o mesmo volume de soro fisiológico, misturar bem. Se estocar no freezer, quando usar, retirar com antecedência e esperar descongelar em temperatura ambiente pois a gema cozinha a temperatura de 65°C .

3. Solução de telurito de potássio a 3,5% :

Telurito de potássio	3,5 g
Água destilada estéril	100mL

Estocar em temperatura ambiente.

4. "Standard Method Agar":

Dissolver 22,5g do meio em pó (Difco) em 1000mL de água destilada. Levar ao fogo para dissolver por completo. Esfriar a 45–50°C e aferir o pH $7,0 \pm 0,1$. Esterilizar a 121°C, por 15 min.

5. Ágar Vogel–Johnson:

Dissolver 60g do meio desidratado (Difco) em 1000mL de água destilada. Levar ao fogo para dissolver por completo. Esfriar a 45–50°C e aferir o pH $7,2 \pm 0,1$. Esterilizar a 121°C, por 15 min. Adicionar solução de telurito de potassio a 1% assim que for verter em placa.

6. Solução de telurito de potássio a 1 % :

Telurito de potássio	1 g
Água destilada estéril	100mL

Estocar em temperatura ambiente.

7. "Lithium Phenylethanol Modified Agar":

Misturar 2,5g de extrato de levedura (Difco), 5,0g de triptona (Difco), 1,0g de glicose (Sigma), 4,5g de cloreto de lítio (Sigma), 1,0g anidrido de glicina (Sigma) e 20g de ágar-ágar (Difco) e em seguida, adicionar 1000mL de água destilada. Misturar e esterilizar a 121°C, por 15 min e, após esfriar, adicionar 1mL de moxalactam e depois verter em placas.

8. "MacBride Modified Agar":

Dissolver 46g do meio desidratado (Difco) em 1000mL de água destilada. Misturar bem e aferir o pH em $7,3 \pm 0,2$. Esterilizar a 121°C, por 15 min. Depois de esfriar, acrescentar 4mL de ciclohexamida (Sigma) (50mg/mL) e verter em placa.

9. Solução de ciclohexamida:

Para fazer 5ml na diluição a 50mg/mL:

Cycloheximida	0,25 g
Água destilada	2,5 mL
Álcool a 75 %	2,5 mL

Colocar em frasco estéril e congelar.

10. Ágar Sangue:

Dissolver 40g do meio desidratado (Difco) em 1000mL de água destilada. Aquecer para dissolver completamente. Esterilizar a 121°C, por 15 min. Esfriar a 50°C e adicionar, assepticamente, 5% de sangue de bovino desfibrinado estéril. Homogeneizar e distribuir em placas.

11. Água peptonada a 0,1 %:

Dissolver 1g de peptona (Difco) em 1000mL de água destilada. Levar ao fogo para dissolver por completo. Esfriar à 45–50°C e aferir o pH em $7,0 \pm 0,2$. Esterilizar a 121°C, por 15 min.

12. "Enrichment Broth" (EB):

Misturar 6,0g de extrato de levedura com 30g de "trypticase soy broth" (Difco) e diluir em 1000mL de água destilada para obter uma completa homogeneização. Esterilizar a 121°C, por 15min. Em seguida, acrescentar 0,01g de acriflavina (Sigma), 0,04g de ácido nalidíxico (Sigma) e 1,0mL de ciclohexamida de forma asséptica e fazer a distribuição em tubos e balão.

13. Infuso Cérebro Coração (BHI):

Pesar 15,6g do meio desidratado (Difco) e adicionar 1000mL de água destilada. Misturar, aferir o pH em $7,4 \pm 0,2$ e distribuir em tubos e esterilizar a 121°C, por 15 min.

14. Ágar Mueller Hinton:

Dissolver 38g do meio desidratado (Difco) em 1000mL de água destilada até obter uma completa homogeneização. Aferir o pH em $7,4 \pm 0,2$ e esterilizar 121°C, por 15 min. Verter em placas.

15. Meio de Clark e Lubs (V. M.):

Fosfato de dipotássio (Vetec).....	5,0 g
Peptona tamponada	7,0 g
Glicose	5,0 g
Água destilada	1000 mL

Misturar todos os componentes e homogeneizar bem. Esterilizar à 121°C, por 15 min.

16. Solução de α -naftol:

α -naftol (Sigma).....	5,0 g
Álcool etílico P.A.	100 mL

Misturar e homogeneizar bem. Estocar na geladeira.

17. Hidróxido de potássio a 40 %:

Hidróxido de potássio (Vetec).....	40 g
Água destilada esterilizada.....	100 mL

Misturar todos os componentes, homogeneizar bem e estocar à temperatura ambiente.

18. Caldo uréia:

Dissolver 38,5g do meio desidratado (Difco) em 1000mL de água destilada. Aferir o pH em $6,8 \pm 0,1$ e esterilizar por filtração. Distribuir em tubos de hemólise.

19. Meio para motilidade:

Pesar 25g do meio de triptose (Difco) e adicionar 1000mL de água destilada. Em seguida, adicionar 0,3% de ágar-ágar. Aferir o pH em 7,2. Distribuir em tubos e autoclavar a 121°C, por 15 min.

20. Meio para fermentação:

Peptona 15 g
 NaCl (Sigma) 5,0 g
 Púrpura de bromocresol a 1 % 0,5 mL
 Água destilada 1000 mL

Agua destilada Misturar os componentes e aquecer para dissolver. Juntar o indicador púrpura de bromocresol. Deixar esfriar e ajustar o pH em 7,0. Filtrar em papel, distribuir em tubos e esterilizar.

21. Solução de açúcares para testes de fermentação:

Açúcar desidratado (Sigma)..... 10 g
Água destilada 100 mL

Acúcar: manitol, xilose, rhamnose, glicose, maltose.

Açúcar: manitol, xilose, rhamnose, glicose, maltose.

Após diluir, distribuir em tubos de hemossed

22. Solução de púrpura de bromocresol a 1 %:

22. Solução de purpura 1,0 g
Púrpura de bromocresol 100 mL
Álcool etílico P. A. 100 mL

pol etílico P.A.

Misturar e aferir o pH entre 5,2-6,8 e conservar.

23. Ágar esculina:

Esculina (Sigma).....	0,5 g
Citrato férrico.....	40g
Ágar de Infusão de Coração (Difco).....	1000 mL
Água destilada	

Misturar os componentes e aquecer para dissolver. Esfriar e aferir o pH em 7,0. Esterilizar a 121°C, por 15min e colocar em tubos inclinados.

24. Álcool a 75 %:

Álcool etílico P.A. (Vetec).....	75 %
Água destilada	25 %

25. Reagente de Oxidase a 1%:

Cloridrato de tetrametil parafenilenodomina (Sigma).....	1,0 g
Água destilada.....	100 mL

Misturar e homogeneizar bem para completa diluição. Estocar em frasco âmbar em freezer.

26. Solução de água oxigenada a 3% :

Peróxido de hidrogênio (Vetec).....	3,0 mL
Água destilada	100 mL

Misturar e homogeneizar bem para completa diluição. Colocar em frasco âmbar e estocar na geladeira.

28. Plasma de coelho:

Coletar assepticamente sangue de coelho acrescido de citrato a 1%. Esperar decantar e centrifugar para total separação do plasma. Estocar em freezer em pequenas porções (aliquotas) para não descongelar todo o plasma obtido toda vez que for usá-lo.