

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ISOLAMENTO DE *Listeria spp*
E ESTUDO DE SUA OCORRÊNCIA EM CARNE,
LEITE E DERIVADOS

Maria Teresa Destro

Orientador:

Prof. Dr. Antônio de Melo Serrano

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos

Campinas, SP

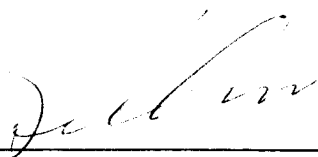
- 1990 -

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida por Maria Teresa Destro
e aprovada pela Comissão Julgadora em 10.04.90.
Campinas, 10 de abril de 1990.

[Assinatura]

BANCA EXAMINADORA



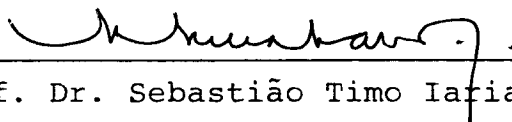
Prof. Dr. Antônio de Melo Serrano



Prof. Dr. Mauro Faber Freitas Leitão



Prof. Edir Nepomuceno da Silva



Prof. Dr. Sebastião Timo Iaria

Campinas, 10 de abril de 1990.

**Ao Álvaro,
companheiro certo
nas horas incertas.**

Gostaríamos também de agradecer à **Dirce Yorika Kabuki, Maria Raquel Manhani e Jacinta Rodrigues de Oliveira Franco**, funcionárias do Laboratório de Higiene dos Alimentos do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos (UNICAMP), sem o auxílio das quais este trabalho não teria sido realizado.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Antônio de Melo Serrano, orientador paciente e seguro;
- Ao Dr. Mauro F. Freitas Leitão, pela confiança e estímulo à nossa carreira;
- À Prefeitura Municipal de Campinas, na pessoa do Dr. Hidalvo Salioni, Coordenador do Serviço de Fiscalização da Alimentação Pública, pela coleta das amostras no varejo;
- Ao Sr. Rogério B. Campos, da Elanco, pelo fornecimento do antibiótico MOXALACTAM;
- Ao CNPq, pelo financiamento da pesquisa e pela bolsa de estudos;
- À Roseane B. Passos, pela amizade e espírito cooperativo sempre presentes;
- À Rosa Maria Tosello e Jaqueline Sonati, pela disposição constante em colaborar;
- À Cláudia Regina Rosa Denani, pelo auxílio na utilização do microcomputador;
- A todos os professores, amigos e funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos da FEA-Unicamp;
- Ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP;
- À Associação Brasileira de Indústrias de Alimentação (ABIA) pelo suporte financeiro das cópias xerográficas desta tese;
- A todas as pessoas que direta, ou indiretamente, cooperaram para a realização desta tese;

meu muito obrigada.

ÍNDICE

	Página
Resumo	iii
Summary	iv
1. Introdução	001
2. Revisão bibliográfica	002
2.1. Caracterização taxonômica, morfológica e bioquímica do gênero <i>Listeria</i>	002
2.2. Ecologia	004
2.3. Surtos de listeriose de origem alimentar	007
2.4. Manifestações clínicas e patogenicidade	009
2.4.1. <i>Listeria monocytogenes</i> em humanos	009
2.4.1.1. Susceptibilidade e resistência ao microrganismo	010
2.4.1.2. Dose infecciosa	010
2.4.1.3. Período de incubação	011
2.4.2. <i>Listeria monocytogenes</i> em mamíferos, aves, peixes e crustáceos	011
2.4.3. Mecanismo da doença	012
2.5. Ocorrência em alimentos	013
2.5.1. Leite e derivados	013
2.5.2. Carnes e derivados	016
2.5.3. Outros alimentos	020
2.6. Efeito de condições ambientais e de processamento na sobrevivência e crescimento de <i>Listeria</i>	022
2.6.1. Tratamento térmico	022
2.6.2. Outros efeitos	023
2.7. Comportamento de <i>Listeria monocytogenes</i> em alimentos	026
2.8. Métodos de detecção e identificação	027
3. Materiais e Métodos	029
3.1. Materiais	029
3.1.1. Meios de cultura	029
3.1.2. Soluções	030

3.1.3. Equipamentos.....	030
3.1.4. Alimentos	030
3.1.5. Outros	031
3.2. Métodos	031
3.2.1. Avaliação da capacidade seletiva de três meios de isolamento	031
3.2.1.1. Preparo do inóculo de <i>L. monocytogenes</i> Scott A	031
3.2.1.2. Testes com os meios de isolamento	031
3.2.2. Estudo da contaminação dos produtos lácteos e cárneos vendidos no comércio ...	033
3.2.2.1. Coleta das amostras	034
3.2.2.2. Pesquisa de listérias	034
4. Resultados e discussão	038
4.1. Avaliação da capacidade seletiva de três meios de isolamento	038
4.2. Estudo da contaminação de produtos lácteos e cárneos vendidos no comércio	043
5. Conclusões	056
6. Referências Bibliográficas	058

RESUMO

A presente pesquisa teve por objetivo verificar a eficiência de alguns meios para isolamento de *Listeria* a partir de alimentos, assim como avaliar a contaminação de alguns produtos alimentícios por este grupo de bactérias.

Numa primeira fase, avaliamos a capacidade seletiva dos meios ágar McBride modificado ("MLA"), ágar Vogel-Johnson modificado ("MVJ") e ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam ("LPM") para amostras de leite e de carne bovina moída artificialmente contaminadas. Para as amostras de leite, os 3 meios mostraram-se semelhantes, mas para as amostras de carne moída os meios "LPM" e "MVJ" foram mais seletivos, permitindo o isolamento de colônias típicas de *Listeria* de modo mais eficiente, após incubação por 48 horas.

Na segunda fase examinamos 140 amostras de alimentos colhidas no varejo em Campinas, SP. Bactérias do gênero *Listeria* estiveram presentes em 67 amostras (48%) sendo a maior incidência para carnes e derivados (95% de amostras positivas). Os leites e queijos apresentaram 12,5% de amostras positivas, sendo a totalidade dos leites pasteurizados, tipos B e C, negativa para o gênero. Os produtos cárneos examinados (carne bovina moída, salsicha e lingüiça, 20 amostras de cada produto) apresentaram 71,7% das amostras positivas para *Listeria monocytogenes*; 80,0% para *L. innocua*; 1,7% para *L. seeligeri*; 3,3% para *L. welshimeri* e 1,7% para *L. murrayi*. Já a partir dos produtos lácteos (leite cru tipo B e queijo minas frescal, 20 amostras de cada produto) foi possível observar a presença de *L. monocytogenes* em 5,0% das amostras, *L. innocua* em 20,0% e tanto *L. seeligeri* quanto *L. welshimeri* em 2,5%.

SUMMARY

The purpose of this research was to evaluate some plating media and a methodology to recover *Listeria* spp from food, as well as to evaluate the problem of food contamination by this genus of bacteria.

In the first step we evaluated the selectivity of 3 media: modified McBride *Listeria* agar (MLA), modified Vogel-Johnson agar (MVJ) and lithium chloride-phenylethanol-moxalactam (LPM). Pasteurized milk and raw minced meat artificially inoculated were used. All 3 media worked equally well for the milk samples but MVJ and LPM were the best for the meat samples. The best incubation time was 48 hours.

The second step was the evaluation of 140 samples obtained from retail stores in Campinas, SP. *Listeria* spp was detected in 67 (48%) samples. From 60 meat products samples 95% showed *Listeria* spp as well as 12,5% of the milk and milk products. *Listeria* spp was not detected in all pasteurized milk samples. In meat and meat products (20 samples per product) *Listeria monocytogenes* could be isolated from 71,7%; *Listeria innocua* from 80,0%; *L. welshimeri* from 3,3% and *L. seeligeri* and *L. murrayi* from 1,7% . In raw milk and cheese samples (20 samples per product) *Listeria monocytogenes* was detected in 5,0%; *L. innocua* in 20,0% and *L. seeligeri* & *L. welshimeri* in 2,5%.

1. INTRODUÇÃO

Desde 1926, quando foi descrita pela primeira vez por Murray e colaboradores, *Listeria monocytogenes* tem chamado a atenção principalmente de veterinários e imunologistas. Somente na última década é que o microrganismo vem merecendo atenção de microbiologistas de alimentos, devido a evidências de sua transmissão ao homem através dos alimentos.

Listeria monocytogenes é um microrganismo patogênico, capaz de causar doenças com altas taxas de mortalidade em indivíduos susceptíveis. Suas características, tais como estar amplamente distribuído na natureza, capacidade de sobreviver por longos períodos a condições adversas, capacidade de crescimento a temperaturas de refrigeração apontam-na como importante causadora de doenças de origem alimentar.

Os procedimentos para detecção e enumeração de *Listeria* spp a partir de alimentos estão sendo muito estudados. Os métodos de isolamento mais usados envolvem diversas técnicas de enriquecimento, que muitas vezes necessitam de vários dias de incubação, o que torna o trabalho longo e difícil para muitos laboratórios. A necessidade de resultados obtidos de forma mais rápida e simples tem levado ao desenvolvimento de novos meios de cultura, que necessitam ser testados.

Informações sobre a incidência de *Listeria* spp em alimentos no nosso país ainda são escassos. Estudos realizados em outros países mostram que os produtos de laticínios e os cárneos apresentam uma posição de destaque com relação à presença deste microrganismo.

Com base no acima exposto, achamos necessário uma seleção de meios de cultura e técnicas adequadas ao isolamento e identificação da bactéria, como também a avaliação da incidência deste microrganismo em produtos de origem animal consumidos em nosso país.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Caracterização taxonômica, morfológica e bioquímica do gênero *Listeria*

No passado, o gênero *Listeria* era descrito contendo 4 espécies: *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. denitrificans* e *L. murrayi* (SEELIGER & WELSHIMER, 1976). Posteriormente, com base na hibridização de ADN/ADN, o grupo de bactérias previamente chamado *L. monocytogenes* (*L. monocytogenes* "lato sensu") foi redefinido, passando a incluir 5 espécies, sendo somente uma delas chamada de *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes* "stricto sensu").

Atualmente, segundo SEELIGER & JONES (1986), o gênero *Listeria* inclui 5 espécies a saber: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*. A este grupo pertencem também 3 espécies "incertae sedis": *L. grayi*, *L. murrayi* e *L. denitrificans*.

L. monocytogenes é patogênica ao homem e a animais; *L. ivanovii* é patogênica principalmente a animais, sendo raramente isolada de fontes humanas. *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são patogênicas a camundongos, assim como *L. denitrificans*, sendo esta última aceita como não patogênica ao homem. As demais espécies não são patogênicas (SEELIGER & JONES, 1986; LOVETT, 1987a). MCLAUCHLIN (1987) relata serem as espécies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua* e *L. seeligeri* capazes de causar infecções ao homem e/ou animais.

Os microrganismos do gênero *Listeria* apresentam forma de pequenos bastonetes regulares, de diâmetro 0,4-0,5 μm e comprimento 0,5-2,0 μm , com extremidades arredondadas, podendo ocorrer isolados, em cadeias curtas ou as células podem estar arranjadas em ângulos formando V entre si ou ainda em grupos que se mantêm paralelos ao longo de um eixo (SEELIGER & JONES, 1986).

São Gram positivos, mas em culturas velhas perdem a habilidade em reter os corantes de Gram. São produtores lentos de ácidos, não formam cápsulas nem esporos; móveis por flagelos peritríquios quando cultivados a 20-25°C, com movimento de tombamento ou rotatório.

São aeróbios ou facultativamente anaeróbios. As colônias com 24 horas em ágar nutriente tem diâmetro de 0,5-1,5mm e apresentam-se de cor cinza-azulada através de

iluminação normal ou com brilho característico verde-azulado quando se utiliza luz oblíqua transmitida (SEELIGER & JONES, 1986).

Em meios semi-sólidos, incubados a 25°C, apresentam crescimento em forma de guarda-chuva, 3 a 5 mm abaixo da superfície. Algumas espécies são β -hemolíticas em ágar sangue (SEELIGER & JONES, 1986).

Desenvolvem-se em ampla faixa de temperatura (1 a 45°C) sendo o ótimo entre 30-37°C. O crescimento ocorre, preferencialmente, entre pH 6 e pH 9 (SEELIGER & JONES, 1986), podendo se desenvolver em pH 5 conforme relatado por CONNER et alii (1986). Podem crescer em caldo nutriente com até 10% de NaCl (SEELIGER & JONES, 1986). São catalase positivos, oxidase negativos. Fermentam glicose, produzindo principalmente ácido lático. Dão teste positivo para vermelho de metila e Voges-Proskauer. Não utilizam citrato exógeno e não produzem indol. Hidrolisam hipurato de sódio e esculina. Não hidrolisam uréia, gelatina, caseína e leite (SEELIGER & JONES, 1986).

O conteúdo G+C no ADN é de 36-38 mol %.

Dos testes bioquímicos, a fermentação da xilose e ramnose é essencial para a diferenciação das espécies de *Listeria* (LOVETT, 1987a). Apesar de *L. monocytogenes* e *L. innocua* não fermentarem xilose, elas podem ser separadas pela ausência de atividade hemolítica de *L. innocua*.

No Quadro 1 temos as espécies aceitas de *Listeria* e *Listeria grayi*, *L. murrayi* e *L. denitrificans* e algumas características destes microrganismos.

Quadro 1- Características diferenciais das espécies aceitas do gênero *Listeria* e *L. grayi*, *L. murrayi*, *L. denitrificans*. (SEELIGER & JONES, 1986).

Espécie	Beta Hemólise	NO ₃ /NO ₂	Fermentação			VM/ VP*	pat. camun- dongo	Camp teste	
			mani- tol	ram- nose	xi- lose			S. <i>aureus</i>	R. <i>equi</i>
<i>L.monocytogenes</i>	+	-	-	+	-	+ / +	+	+	-
<i>L. innocua</i>	-	-	-	v	-	+ / +	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	-	-	+	+ / +	+	-	+
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	v	+	+ / +	-	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	-	+	+ / +	-	+	-
<i>L. denitrificans</i>	-	+	-	-	+	+ / -	+	-	-
<i>L. grayi</i>	-	-	+	-	-	+ / +	-	-	-
<i>L. murrayi</i>	-	+	+	v	-	+ / +	-	-	-

* VM/VP = Vermelho de metila/ Voges Proskauer

v = variável, 11-89% das linhagens são positivas

2.2. Ecologia

Os microrganismos do gênero *Listeria* estão amplamente distribuídos na natureza estando presentes tanto em países de clima temperado quanto naqueles de clima tropical.

Segundo WEIS & SEELIGER (1975) *Listeria* é um gênero saprófita que vive no nicho planta-solo e que pode ser contraído por seres humanos e animais através de várias rotas e a partir de várias fontes.

Listeria tem sido isolada a partir de várias fontes, como mamíferos domésticos e silvestres (GRAY & KILLINGER, 1966; WEIS, 1975b; WEIS & SEELIGER, 1975; HOFER, 1983; DOMINGUEZ RODRIGUEZ et alii, 1984; COTTIN et alii, 1985; SKOVGAARD & MORGEN, 1988; SKOVGAARD & NORRUNG, 1989); aves domésticas e silvestres (GRAY & KILLINGER, 1966; GREGORIO & EVELAND, 1975; KWANTES & ISAAC, 1975; WEIS, 1975b; WEIS & SEELIGER, 1975; DIJKSTRA, 1978; FENLON, 1985; SKOVGAARD & MORGEN, 1988); peixes, crustáceos, mariscos e rãs (GRAY & KILLINGER, 1966); efluentes, tratados ou não, lodo de esgoto, água de rio (HOFER, 1975b; KAMPELMACHER & NOORLE JANSEN, 1975; WATKINS & SLEATH, 1981; GEVENICH et alii, 1985); solo cultivado ou não (WELSHIMER &

DONKER-VOET, 1971; WEIS, 1975a; WEIS & SEELIGER, 1975; HOFER & POVOA, 1984); vegetação, silagem e forragem (WELSHIMER, 1968; WELSHIMER & DONKER-VOET, 1971; WEIS, 1975a,b; WEIS & SEELIGER, 1975; FENLON, 1986; SKOVGAARD & MORGEN, 1988); hortaliças para consumo humano (HOFER, 1975a; STEINBRUEGGE et alii, 1988; HEISICK et alii, 1989a,b) e de fezes de portadores, humanos ou animais, aparentemente sadios (KAMPELMACHER & NOORLE JANSEN, 1972; HOFER, sd; DURST & BERENCSI, 1975; GREGORIO & EVELAND, 1975; MANEV et alii, 1975; KAMPELMACHER et alii, 1976; HOFER, 1983; SKOVGAARD & NORRUNG, 1989).

O microrganismo também tem sido isolado em usinas processadoras de leite e produtos lácteos (SURAK & BAREFOOT, 1987; COX et alii, 1989), em indústrias processadoras de carnes (WATKINS & SLEATH, 1981; FLOWERS, apud MEAT, 1987; SKOVGAARD & MORGEN, 1988) e em outras indústrias (COX et alii, 1989). A cozinha doméstica também abriga o microrganismo (COX et alii, 1989). Nos efluentes dos abatedouros e das usinas processadoras de aves, a população de listérias é comparável e em alguns casos superior à de *Salmonella* spp (WATKINS & SLEATH, 1981).

A forma de transmissão da doença aos seres humanos ainda não está bem estabelecida. Em animais, estudos têm confirmado que uma das principais fontes de contaminação é o alimento. Em humanos, surtos recentes sugerem que a transmissão da doença ocorra da mesma maneira (CANADA, 1981 a,b; SCHLECH et alii, 1983; DAVIES et alii, 1984; SCHLECH, 1984; CDC 1985; FDA 1985; FLEMING et alii, 1985; LISTERIOSIS, 1986; RECENT, 1986).

HIRD (1987) afirma que detalhes dos surtos ocorridos e os alimentos implicados sustentam o conceito de transmissão zoonótica da listeriose. Já para o grupo de trabalhos em listeriose de origem alimentar da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1988), a doença é transmitida por meios não zoonóticos. Isto porque, segundo o grupo, *L. monocytogenes* é um microrganismo ambiental cuja forma fundamental de transmissão ao homem é através de alimentos contaminados durante a produção e processamento.

SEELIGER et alii (apud GRAY & KILLINGER, 1966) sugerem um possível ciclo de infecção no homem: * fezes humanas infectadas -> contaminação do solo -> contaminação de legumes e verduras por solo ou fezes contaminadas -> infecção oral -> *. Para ruminantes os autores sugerem que o ciclo possa ser: * animal infectado -> excreção

de *L. monocytogenes* por fezes e urina -> contaminação do solo, sobrevivência em estrume, poeiras, sujidades -> propagação sob condições ambientais favoráveis, como silagem neutra ou alcalina (impropriamente fermentada) -> infecção oral -> *.

A figura 1 apresenta a concepção epidemiológica proposta por MAUPAS et alii (1975) para listeriose humana e animal. Para eles, listeriose é uma doença de origem hidro-telúrica capaz de contaminar o homem e os animais a partir de uma fonte comum, o meio ambiente.

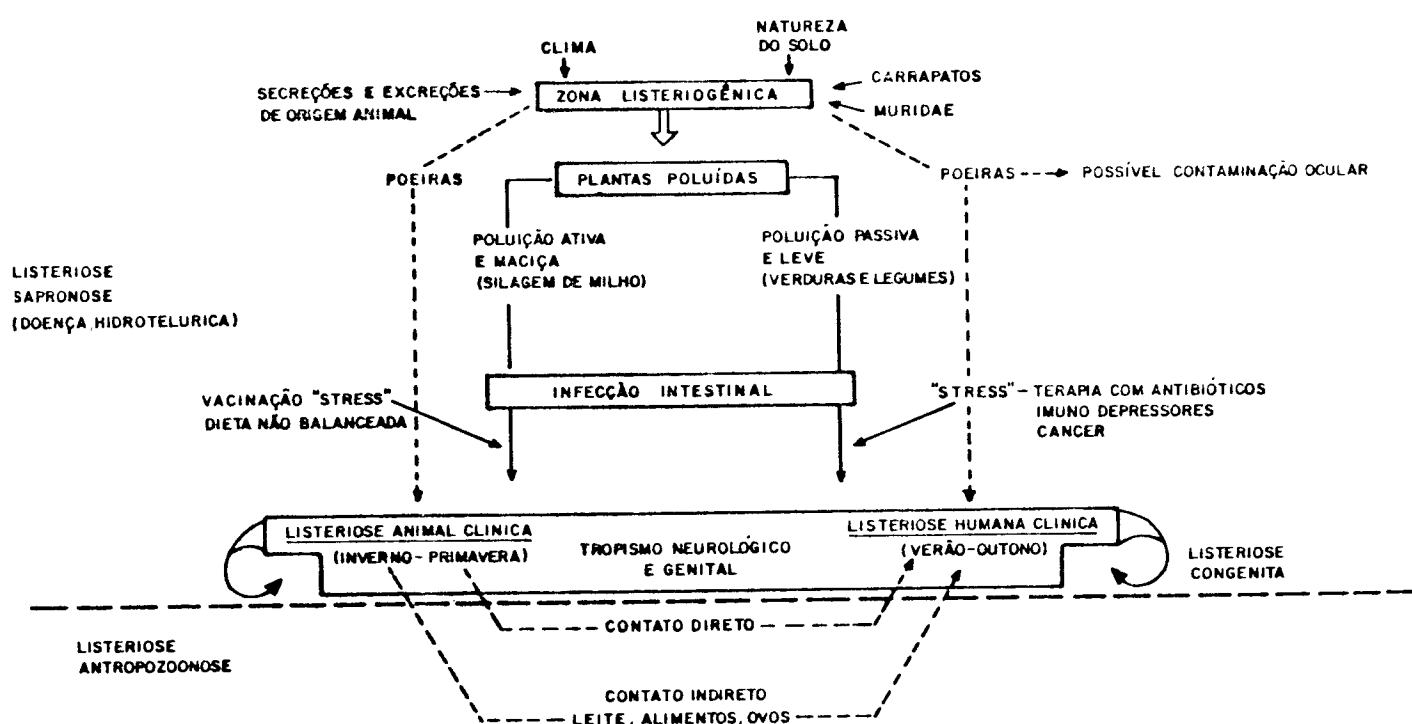


Figura 1 - Concepção epidemiológica de listeriose humana e animal, segundo MAUPAS et alii (1975).

A figura 2 representa rotas hipotéticas de infecção por *L. monocytogenes* propostas por BRACKETT (1988).

2.3. Surtos de listeriose de origem alimentar

Apesar da *Listeria* ter sido isolada a partir de alimentos já nos anos 1940-1950 (WRAMBY e POTEL apud BRYAN, 1979) e de se considerar os alimentos contaminados uma fonte potencial de infecção, isto permaneceu obscuro até 1979 quando 20 pacientes de 8 diferentes hospitais de Boston, EUA, desenvolveram listeriose, presumivelmente pela ingestão de alface, tomate e salsão crus (LISTERIOSIS, 1986; HO et alii, 1986; KVENBERG, 1988).

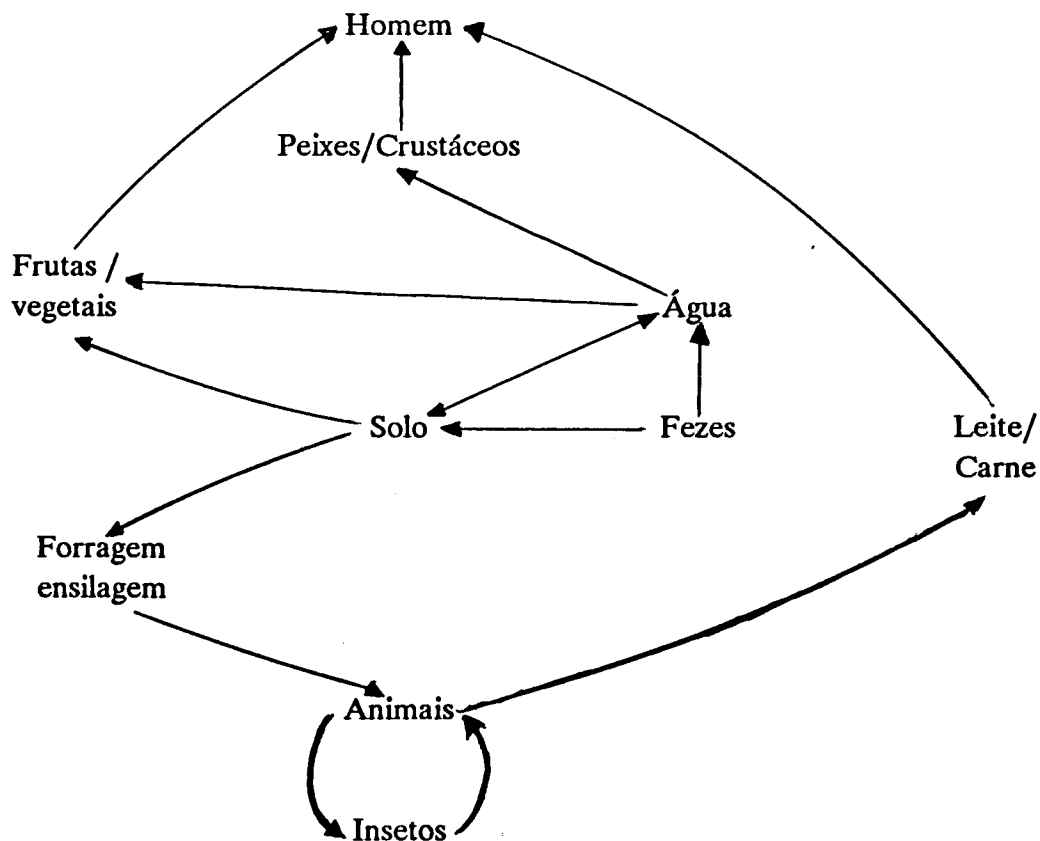


Figura 2. Ciclo hipotético de infecção por *Listeria monocytogenes*, segundo BRACKETT (1988).

Anteriormente a este surto, 2 outros haviam sido relatados (Halle, Alemanha, 1966, 279 pessoas envolvidas; Região de Anjou, França, 1978, 162 pessoas envolvidas) sendo que os possíveis agentes de transmissão não foram determinados (MCLAUCHLIN, 1987).

Em 1981, um surto nas províncias marítimas do Canadá resultou em 41 casos de listeriose com 18 mortes. Repolho cru, utilizado numa salada tipo "coleslaw" foi incriminado como veículo de transmissão (CANADA, 1981 a,b; SCHLECH et alii, 1983; SCHLECH, 1984). Segundo os estudos, o repolho havia sido cultivado em terreno adubado com estrume de ovelhas, sendo que algumas ovelhas da mesma fazenda haviam morrido de listeriose.

Também em 1981, em Auckland, Nova Zelândia, um surto envolveu 21 pessoas, estando ele ligado ao consumo de ostras e peixes crus (LENNON et alii, 1984).

Em 1983, um surto ocorrido em Massachusetts, EUA, resultou em 49 casos de listeriose com 14 mortes. Leite pasteurizado integral e leite pasteurizado com 3% de gordura foram implicados epidemiologicamente como veículos de transmissão, apesar de estarem aparentemente pasteurizados de maneira adequada (FLEMING et alii, 1985).

No ano de 1985, na Califórnia, EUA, um novo surto de listeriose foi relatado. Neste, queijos macios tipo "mexicano" produzidos por uma determinada indústria foram implicados como veículo de transmissão. O mesmo sorotipo do microrganismo foi isolado dos pacientes e das amostras de queijo. Com relação ao número de casos e de mortes ocorridas neste surto há algumas citações: 86 casos e 29 mortes (CDC, 1985); 100 casos e 39 mortes (SILLIKER, 1986); 150 casos e 84 mortes (RECENT, 1986); 314 casos e 105 mortes (LISTERIOSIS, 1986); 142 casos e 47 mortes (USA, 1987). Investigações realizadas na indústria sugeriram a mistura de leite cru com leite pasteurizado na produção de queijos (LISTERIOSIS, 1986) e/ou contaminação pós-pasteurização (SILLIKER, 1986).

No Cantão de Vaud, Suíça, no período entre 1983-1987, foram relatados 22 casos de listeriose ligados ao consumo de queijos macios "Vacherin" (WHO,1988;TWEDT, 1988).

Além destes surtos documentados, outros têm ocorrido em diversos países sem que se tenha conseguido estabelecer epidemiológica e/ou microbiologicamente as fontes comuns. Como exemplos destes surtos temos os ocorridos na Dinamarca em 1986 (WHO, 1988), e os de 1987 na Pennsylvania, EUA (EUA, 1987) e Philadelphia, EUA (WHO, 1988); e o de 1988 na Escócia (CAMPBELL, 1989).

SILLIKER (1986) cita ainda três surtos que teriam ocorrido nos EUA. O primeiro causado por queijo tipo "liederkranz" em 1985; o segundo ocorrido em 1986 e causado por

queijo tipo "brie" francês; o terceiro surto teria ocorrido no estado do Arizona, EUA, em 1986 e teria sido causado por queijo macio tipo "mexicano".

Casos isolados de listeriose de origem alimentar também têm sido relatados tanto em pacientes sadios quanto imunodeprimidos (BANNISTER, 1987; KVENBERG, 1988; PRENTICE & NEAVES, 1988; SCHWARTZ et alii, 1988; KERR et alii, 1988b; CDC, 1989; AZADIAN et alii, 1989; KACZMARSKI & JONES, 1989). Os alimentos envolvidos foram principalmente queijos macios e produtos derivados de aves.

Em todos estes surtos, nenhuma linhagem específica de *Listeria* tem sido repetidamente incriminada, podendo o microrganismo pertencer a uma variedade de "serovars" e "lisovars" (WHO, 1988).

2.4. Manifestações clínicas e patogenicidade

Listeriose é reconhecida como doença humana desde 1929 e em animais desde 1911 (GRAY & KILLINGER, 1966), entretanto somente na década de cinquenta é que seu papel como causador de doenças ficou razoavelmente entendido. Vários autores, entre eles GRAY & KILLINGER (1966), USA (1987) e PRENTICE & NEAVES (1988), revisaram listeriose em humanos, mamíferos, pássaros e peixes.

A multiplicidade de hospedeiros suscetíveis e a relativa uniformidade das lesões causadas por *L. monocytogenes* nos organismos invadidos, indicam não haver adaptação ao hospedeiro como conhecida para outras doenças, como por exemplo a brucelose (SEELIGER, 1988).

2.4.1. *Listeria monocytogenes* EM HUMANOS

Ao contrário da maioria dos microrganismos causadores de toxinfecção alimentar, que geralmente causam uma variedade de sintomas gastro-intestinais, a infecção por *Listeria* se manifesta usualmente como meningite ou meningo-encefalite podendo estar associada à septicemia (USA, 1987). Outras manifestações são septicemia de baixo grau em mulheres grávidas, semelhante à gripe; septicemia no período perinatal; síndrome infecciosa semelhante à mononucleose; pneumonia; endocardite; abscessos localizados, internos ou externos; lesões cutâneas pustulares ou papulares; conjuntivite; uretrite; retardamento

mental em crianças; psicose em adultos; septicemia em adultos, com otite, faringite, amigdalite e sinusite (GRAY & KILLINGER, 1966; MARTH, 1988).

A taxa de mortalidade em casos diagnosticados varia entre 20-30% (DAVIES et alii, 1984; USA, 1987; TWEDT, 1988; LOVETT & TWEDT, 1988), sendo a doença sub-relatada em todo o mundo.

A taxa de seres humanos portadores é de 5%, variando de 1-10% (USA, 1987; LOVETT & TWEDT, 1988). Parece provável que em indivíduos saudáveis (não de alto risco) ocorram infecções auto-curáveis e que não são diagnosticadas como listeriose.

2.4.1.1. Susceptibilidade e resistência ao microrganismo

A população susceptível é constituída principalmente por mulheres grávidas e seus fetos, crianças, idosos e indivíduos imuno-deficientes (USA, 1987; MARTH, 1988; WHO, 1988).

Condições identificadas como fatores que predispoem um adulto à listeriose são câncer, cirrose, colite ulcerativa, bronquite asmática e doenças pulmonares crônicas obstrutivas, pênfigos, diabetes melito, transplantes, hemodiálises, gravidez, vício em narcóticos, uso de anti-ácidos afetando a acidez estomacal (USA, 1987; MARTH, 1988; WHO, 1988).

Como listeriose não se desenvolve em todas as pessoas que entram em contato com *L. monocytogenes*, parece haver algum tipo de resistência do indivíduo à infecção. O fenômeno da resistência tem sido estudado em modelos animais, principalmente camundongos (MARTH, 1988) e, se for válido extrapolar os resultados destes estudos para os seres humanos, pode-se dizer que a variabilidade na resistência parece ter base genética (MARTH, 1988; SCHLECH, 1988).

2.4.1.2. Dose infecciosa

A dose infecciosa de *Listeria monocytogenes* para seres humanos ainda não foi determinada. Os relatos dos vários surtos não incluem dados que possam possibilitar a determinação da dose infecciosa mínima. Estes relatos sugerem apenas que a dose é "baixa" para a população suscetível (USA, 1987). Também não se têm informações precisas

com relação à quantidade de alimento contaminado ingerido e o risco em se adquirir a doença. Provavelmente a dose infecciosa está relacionada com a suscetibilidade do hospedeiro (WHO, 1988).

O Departamento de Agricultura dos EUA, no seu "Monitoring Policy" (USA, 1987) cita que, em modelos animais verificou-se que 10^2 organismos podem causar infecção e que a Dose Letal Média (LD_{50}) para camundongos injetados intraperitonealmente, é de 10^7 organismos. Este relato cita que em somente um surto de listeriose humana, em que a análise do veículo foi completada, encontrou-se 10^3 - 10^5 unidades formadoras de colônias por grama de alimento (UFC/g). Com base neste resultado, foi estimado que 10^3 - 10^5 UFC/g são necessárias para infectar indivíduos suscetíveis e doses mais altas para causar síndrome em indivíduos adultos saudáveis.

2.4.1.3. Período de incubação

Em surtos estudados na Suíça e nos EUA, os dados obtidos sobre o período ocorrido entre a ingestão do alimento contaminado e o início da doença, sugerem que o período de incubação para adultos seja de uma a algumas semanas (WHO, 1988).

2.4.2. *Listeria monocytogenes* EM MAMÍFEROS PEIXES E CRUSTÁCEOS

Para os ruminantes domésticos ou silvestres, a síndrome mais freqüentemente reconhecida é a encefalite, sendo afetados animais de todas as idades, com morbidade e letalidade variáveis (GRAY & KILLINGER, 1966; USA, 1987; PRENTICE & NEAVES, 1988). Outros sintomas são depressão, perturbação seguida da perda de coordenação, paralisia facial e dos músculos da garganta e da língua, salivação intensa e dificuldade de deglutição (USA, 1987). *Listeria* também pode causar mastites, abortos e mortes perinatais (GRAY & KILLINGER, 1966; USA, 1987; PRENTICE & NEAVES, 1988). Os animais mastíticos podem secretar o microrganismo no seu leite (SIPKA et alii, 1974).

Já para animais monogástricos, como também cordeiros e bezerros cujo rumem não está desenvolvido, a síndrome mais comum é a septicemia (GRAY & KILLINGER, 1966; PRENTICE & NEAVES, 1988). Cães selvagens ou domésticos, gatos e coelhos também podem ser infectados (USA, 1987). A doença é rara em suínos, mas o microrganismo tem sido isolado de porcos aparentemente sadios (USA, 1987; PRENTICE & NEAVES, 1988).

Aves domésticas e silvestres jovens são mais suscetíveis que os adultos sendo que podem apresentar encefalite semelhante à dos ruminantes (GRAY & KILLINGER, 1966; USA, 1987).

Os crustáceos provavelmente não são infectados por *L. monocytogenes*, mas podem ser portadores, podendo assim disseminar o microrganismo. Os peixes, por sua vez, parecem suscetíveis (GRAY & KILLINGER, 1966).

2.4.3. MECANISMO DA DOENÇA

Listeria, em humanos e nos animais, tem um comportamento diferente da maioria dos microrganismos causa-dores de toxi-infecção alimentar, devido a sua natureza intracelular facultativa. Isto propicia a infecção de tecidos normalmente não afetados como o cérebro e sistema nervoso central, a placenta, o útero grávido, etc.

Para explicar o mecanismo da doença em humanos, LOVETT & TWEDT (1988) sugerem que, após a ingestão das bactérias, elas invadam os macrófagos, passando as cepas virulentas a se multiplicar no interior dos mesmos até levar à ruptura destas células e à septicemia. Desta maneira o microrganismo teria acesso às diversas áreas do corpo.

O mecanismo (ou mecanismos) pelo qual *L. monocytogenes* causa listeriose ainda não está bem definido. Sabe-se, entretanto, que a bactéria produz algumas toxinas que podem estar envolvidas no desencadeamento da doença. Dentre estas toxinas, temos toxinas hemolíticas (hemolisinas) e lipolíticas, sendo as últimas responsáveis pelo aumento na produção de monócitos e pela depressão na atividade dos linfócitos (MARTH, 1988).

Outras toxinas já isoladas incluem uma toxina hemorrágica extracelular, uma fração pirogênica, uma toxina capaz de causar alterações eletrocardiográficas (MARTH, 1988). Componentes da parede celular parecem também estar envolvidos no mecanismo de patogenicidade (MARTH, 1988; SCHLECH, 1988).

2.5. Ocorrência em alimentos

2.5.1. LEITE E DERIVADOS

DOMINGUEZ RODRIGUEZ et alii (1985) investigaram a presença de *Listeria* em misturas refrigeradas de leite cru, provenientes da região Oeste e Central da Espanha. Um total de 95 amostras foram tomadas num período de 16 meses. *L. grayi*, foi isolada de 89,5% das amostras; *L. monocytogenes* de 45,3%; *L. innocua* de 15,8%; *L. welshimeri* de 3,1% e *L. seeligeri* de 1,05%. *L. ivanovii*, *L. murrayi* e *L. denitrificans* não foram isoladas.

FERNANDEZ GARAYZABAL et alii (1986), isolaram em 6 das 28 amostras de leite pasteurizado (3,2% de gordura, tratado a 78°C por 15 s) vendido por uma usina de Madrid, uma linhagem hemolítica de *L. monocytogenes*, patogênica a camundongos. *L. grayi* foi isolada de 89,2% das amostras e *L. innocua* de 10,7% das amostras.

Amostras de leite (121) e de filtros de leite (14) foram examinadas por HAYES et alii (1986) quanto à presença de *Listeria monocytogenes*. O microrganismo foi recuperado de 15 amostras de leite (12%) e de 2 filtros (14%).

TERPLAN et alii (1986) estudaram a ocorrência de *Listeria* em 706 amostras de queijos de diferentes países, tendo encontrado 58 positivas para *Listeria*. Destas amostras, 11 de queijos macios, 6 de queijos semi-duros e 1 de queijo tipo "filata" estavam contaminadas com *L. monocytogenes*. Os queijos maturados por crescimento superficial de fungos foram mais afetados por *L. monocytogenes* que aqueles que apresentavam fungos em toda a massa. *L. innocua* e *L. seeligeri* também foram isoladas. Os autores não verificaram diferença significativa entre a incidência do microrganismo em queijos elaborados com leite pasteurizado e aqueles elaborados com leite cru. *Listeria* não foi detectada em queijos duros, semi-duros ou processados, assim como de amostras de leite cru ou pasteurizado.

L. monocytogenes foi detectada em 7 das 69 amostras de queijo macio importado analisadas por BECKERS et alii (1987). O microrganismo pôde ainda ser isolado de outras 3 amostras após o processo de enriquecimento. As amostras positivas para *L. monocytogenes* haviam sido preparadas com leite cru. O microrganismo também foi isolado em 6 de 137 amostras de leite cru obtidas na Holanda.

COMI et alii (1987) pesquisaram a presença de *Listeria monocytogenes* em 140 amostras de queijos de diversos tipos e isolaram o microrganismo de somente uma das amostras. O queijo contaminado havia sido produzido artesanalmente com leite de cabra.

FARBER et alii (1987) examinaram um total de 374 amostras de queijos macios e semi-duros quanto à presença de *Listeria* spp, sendo 61 amostras provenientes de indústrias do Canadá e 98 de outros países. Duas amostras foram positivas para *L. monocytogenes* e uma para *L. innocua*. Estas 3 amostras eram provenientes de uma mesma indústria da França.

LOVETT et alii (1987b) estudaram a incidência de *Listeria* spp em 650 amostras de leite cru provenientes de 3 estados dos EUA no período compreendido entre outubro de 1984 e agosto de 1985. A incidência total de *L. monocytogenes* foi de 4,2%, de *L. innocua* 7,7% e *L. ivanovii*, *L. welshimeri* e *L. seeligeri* < 1%.

O "Florida Department of Agriculture and Consumer Services" (apud FLORIDA, 1987) isolou *Listeria* a partir de sorvetes (15 amostras positivas em 36 examinadas) e queijos (11 amostras positivas em 17 examinadas).

STONE (1987) pesquisou a ocorrência de *Listeria monocytogenes* e de outros microrganismos em 71 amostras de leite cru provenientes de uma usina na Nova Zelândia. Dentre as espécies de *Listeria*, *L. innocua* foi isolada com maior frequência (14%), seguida de *L. welshimeri* (1,4%). *L. monocytogenes* não foi isolada de nenhuma das amostras.

Amostras de leite cru obtidas em fazendas do estado de Nebraska, EUA, foram examinadas por LIEWEN & PLAUTZ (1988) quanto à presença de *L. monocytogenes*. Os autores verificaram a ocorrência de 4% de amostras positivas para *L. monocytogenes* e 5% para *L. innocua*.

Na Suíça, BREER & SCHOPFER (1988) investigaram a presença de *L. monocytogenes* em queijos e em queijos maturados por bolores superficiais. Do total de 1004 amostras de queijo, 50 (5%) foram positivas para *L. monocytogenes* e de 343 amostras do segundo grupo, 33 (9,6%) estavam contaminadas. Os autores verificaram ainda não haver diferenças nas taxas de contaminação entre as amostras produzidas com leite pasteurizado ou não e que a bactéria estava presente na superfície mas não no interior do queijo, sugerindo uma contaminação pós-processamento.

CANTONI et alii (1988 a) estudaram, na Itália, a presença de *L. monocytogenes* em 777 amostras de queijos e verificaram a presença do microrganismo em apenas 2,3% das amostras. As maiores incidências foram em queijos tipo "itálico" (12,5% em 24 amostras) e queijos tipos "taleggio" (8,3% em 96 amostras). Num teste semelhante feito em queijos importados verificaram a incidência em 4,5% do total de amostras examinadas, sendo que 15,3% das 13 amostras de queijo tipo "tilsit", 16% das 6 amostras de queijo tipo "cheddar" e 33% das 6 amostras de queijo tipo "edam" foram positivas para *L. monocytogenes*. Os autores também encontraram o microrganismo em mesas de madeira e em depósitos de plantas processadoras de queijos.

Os mesmos autores, num outro trabalho (CANTONI et alii, 1988b) avaliaram durante 1 ano a presença de *Listeria* em diversos tipos de queijos consumidos na Itália, obtendo resultados positivos em 14 dos 375 queijos tipo "gorgonzola"; 14 dos 216 queijos tipo "taleggio" e 5 dos 89 tipo "itálico". Eles também verificaram a presença do microrganismo em 9 das 72 zaragatoas de superfícies ou equipamentos das fábricas.

L. monocytogenes foi detectada em 2% das 400 amostras de queijos macios examinados por COMI & CANTONI (1988). Estes isolados só foram obtidos a partir de queijos com pH > 5,6.

FARBER et alii (1988a) examinaram 445 amostras de leite cru provenientes de tanques de armazenamento de Ontário, Canadá, buscando *Listeria* spp. A incidência total deste gênero foi de 12,4%, sendo *L. innocua* a mais freqüentemente isolada (9,7%). Tanto *L. monocytogenes* quanto *L. welshimeri* foram isoladas a partir de 1,3% das amostras, sendo que as demais espécies do microrganismo não foram encontradas.

Queijos macios de diversas origens adquiridos no varejo, no Reino Unido, foram avaliados quanto à presença de *L. monocytogenes* por GILBERT & PINI (1988a). A incidência de *L. monocytogenes* foi maior em queijos procedentes da França (14%), a seguir vieram os queijos produzidos na Inglaterra e País de Gales (4%). As amostras provenientes da República Federativa da Alemanha, Dinamarca e Chipre foram negativas para o microrganismo.

PINI & GILBERT (1988b) examinaram 222 amostras de queijos macios produzidos no Reino Unido e em outros países, com vistas ao isolamento de *Listeria* spp. Das

amostras, 10% continham *L. monocytogenes* distribuídos da seguinte maneira: queijos italianos, 16%; franceses, 14%; cipriota, 10% e Reino Unido, 4%. Também foram isoladas cepas de *L. innocua*.

A avaliação mensal do leite cru produzido em Ontário, Canadá, durante 1 ano foi feita por SLADE et alii (1988). Das 315 amostras examinadas 11,4% foram positivas para *Listeria* spp, sendo que 5,4% foram positivas para *L. monocytogenes*, 8,2% para *L. innocua* e 0,3% para *L. welshimeri*. Os autores não verificaram sazonalidade na prevalência das diferentes espécies de *Listeria*.

FENLON & WILSON (1989) avaliaram a presença de *L. monocytogenes* em 180 amostras de leite cru provenientes de tanques de fazendas do nordeste da Escócia. A incidência do microrganismo variou de 3,8% no verão a 1,0% no outono. Os autores não verificaram correlação entre a presença de *L. monocytogenes* e os padrões higiênicos do local ou a silagem utilizada.

Como se pode notar, *Listeria* está presente em leite e diversos tipos de produtos lácteos com incidências variáveis independentemente do país de origem do produto.

2.5.2. CARNES E DERIVADOS

DURST & BERENCSI (1975) investigaram, na Hungria, a presença de *L. monocytogenes* em vários tipos de amostras. Dos produtos cárneos, 6 em 48 amostras foram positivas para *L. monocytogenes* (2 linhagens patogênicas e 4 não patogênicas). O microrganismo foi isolado de produtos cárneos que haviam sido armazenados a -20°C e de 32,9% das amostras de frango. Os autores concluíram que produtos cárneos de origem bovina ou avícola podem ser envolvidos na transmissão de listeriose.

HOHNE et alii (1975) examinaram nódulos linfáticos intestinais de 342 animais aparentemente sadios (104 porcos, 118 bois e 120 pequenos ruminantes) abatidos num abatedouro municipal de Togo, África Ocidental, para verificar a presença de *L. monocytogenes*. Destas, 8 amostras apresentaram resultados positivos, sendo 2 de porcos, 5 de pequenos ruminantes e 1 de boi.

A incidência de *L. monocytogenes* em aves cruas consumidas em residências na região de West Glamorgan, GB, foi estudada por KWANTES & ISSAC (1975). Em 64 frangos

congelados examinados, 41 apresentaram resultados positivos para o microrganismo; dos 38 frangos frescos, 19 foram positivos; dos 4 perus examinados, 1 foi positivo; todos os três patos analisados apresentaram *L. monocytogenes*, assim como 1 faisão dos 2 examinados.

GITTER (1976) isolou *L. monocytogenes* de 14,7% das 68 amostras de frango pronto para assar ("oven ready poultry") adquiridos em 26 diferentes locais de New Haw, Weybridge.

COMI & CANTONI (1985) examinaram cerca de 200 intestinos, pele e carcaças de frangos provenientes da Lombardia, Itália. O percentual de isolamento de *Listeria* foi de 2,5% para os intestinos, não tendo o microrganismo sido isolado de pele ou carcaça.

COTTIN et alii (1985) examinaram tecido muscular e pulmões de 514 bovinos sendo 487 deles aparentemente sadios. Tanto *L. monocytogenes* quanto *L. innocua* foram isoladas de 15 animais sadios (3,1%). Dentre os animais doentes, *L. monocytogenes* foi isolada de 12 amostras (44%).

Diversos produtos cárneos da região de Haute-Vienne, França, foram examinados por NICOLAS (1985). O número de amostras estudadas e o número de amostras positivas para linhagens patogênica e não patogênicas de *Listeria* foram respectivamente para produtos cárneos consumidos crus (embutidos secos), 18, 4, 2; para produtos cárneos a serem cozidos (embutidos frescos), 98, 4, 12; "frozen comminuted patties", 52, 5, 2; para cordeiro fresco, 7, 1, 0; para superfícies de carcaças de suínos, 20, 1, 0; de bovinos, 20, 0, 0; e de cordeiros, 20, 0, 0.

FLOWERS (apud MEAT, 1987) relatou a ocorrência de *Listeria* em 58% das 53 amostras de produtos cárneos crus examinados, em 5% dos 691 produtos cárneos termoprocessados prontos para consumo ("heat-processed ready-to-eat meat products"), e em 12% das 230 amostras de embutidos secos. Ele relata também que 14 áreas da indústria de produtos cárneos foram identificadas como possíveis locais de contaminação por *Listeria* e que a incidência deste microrganismo aumenta na superfície de trabalho, durante o período de processamento.

O "Florida Department of Agriculture and Consumer Service" (apud FLORIDA, 1987) isolou *Listeria* a partir de carnes prontas para consumo (1 amostra positiva em 12 examinadas) e carnes cruas (8 amostras positivas em 10 examinadas).

BREER & SCHOPFER (1988) verificaram a presença de *L. monocytogenes* em 33 (11,3%) das 292 amostras de carne crua examinadas, estando incluídas neste total os resultados referentes às amostras de frango (56 examinados, 10 positivas) e às amostras de carne moída mista (85 examinadas, 13 positivas). Dos 204 produtos cárneos crus examinados (incluindo salame, "mettwurst" e carne seca) 7,4% foram positivos para o microorganismo.

CANTONI et alii (1988b) examinaram 225 amostras de embutidos crus, encontrando 20 deles positivos para *Listeria*, sendo 6 amostras positivas para *L. monocytogenes*, 7 para *L. innocua* e 7 para *L. welshimeri*. A contaminação das amostras foi restrita à superfície das mesmas.

Amostras de 96 lotes de embutidos crus fermentados (cura-seca), produzidos em estabelecimentos registrados no Canadá, foram analisados quanto à presença de *Listeria* spp (FARBER et alii, 1988d). Deste total, 15 amostras foram positivas para *L. monocytogenes* após fermentação e 5 permaneceram positivas após o período de secagem.

KARCHES & TEUFEL (1988) examinaram amostras de carne bovina e suína moídas e "zwiebelmettwurst" (embutido maturado consumido relativamente fresco). Das 59 amostras de carne bovina moída, 51 foram positivas para *Listeria* spp e 27 para *L. monocytogenes*; das 58 amostras de carne suína moída, 44 foram positivas para *Listeria* spp e 23 para *L. monocytogenes* e de 11 amostras de "zwiebelmettwurst", 6 foram positivas para *Listeria* spp e 1 para *L. monocytogenes*.

Nos EUA, MCCLAIN & LEE (1988) verificaram a presença de *L. monocytogenes* em amostras congeladas de carne moída, embutidos de porco e em carne de frangos, obtendo os seguintes resultados: para carne moída, 20 amostras positivas em 41 analisadas; para embutidos de porco, 12 amostras positivas em 23 examinadas e para carne de frangos, 7 amostras positivas em 22 analisadas.

PINI & GILBERT (1988a) avaliaram a incidência de *Listeria* spp em 100 amostras de frango cru comercializadas no Reino Unido, sendo que 60% das amostras (frescas ou congeladas) estavam contaminadas com *L. monocytogenes* e 28% com outras espécies de *Listeria*, como *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. innocua*. Num outro trabalho, os autores estudando procedimentos para o isolamento de *L. monocytogenes* a partir de frangos crus e

queijos, isolaram 70 amostras positivas para *L. monocytogenes* em 160 frangos examinados (PINI & GILBERT, 1988b).

SCHMIDT et alii (1988) testaram 30 amostras de carne de porco moída e 30 de embutidos tipo "mettwurst", para a presença de *Listeria* spp. Todas as amostras do primeiro grupo e 29 do segundo foram positivas para *Listeria* spp. *L. monocytogenes* esteve presente em 24 e 17 amostras respectivamente. Outras espécies como *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. seeligeri* também foram isoladas.

SKOVGAARD & MORGEN (1988) verificaram a presença de *Listeria* spp em alimentos crus de origem animal. De 67 amostras de carne bovina moída, 67% foram positivas para *Listeria* spp e 28% para *L. monocytogenes*; de 17 amostras de pele de pescoço de frangos, *Listeria* spp foi detectada em 94%, e *L. monocytogenes* em 47%.

TRUSCOTT & MCNAB (1988) num estudo para avaliação de meios de cultura, isolaram *L. monocytogenes* em 29 (58%) das 50 amostras de carne magra moída, adquiridas no varejo em Ontário, Canadá.

A presença de *Listeria monocytogenes* em 90 carcaças de frangos, obtidas no comércio do sudeste do EUA, foi avaliada por BAILEY et alii (1989). *Listeria* foi recuperada em 38% das amostras, e *L. monocytogenes* em 23%.

BUCHANAN et alii (1989) examinaram vários produtos, tanto de origem animal quanto vegetal, quanto à presença de *Listeria*. Em carne e produtos cárneos frescos, *Listeria* spp foi isolada em 52% das amostras, sendo *L. monocytogenes* isolada em 45% delas. Em produtos cárneos curados, somente *L. innocua* foi isolada de 1 amostra de salame (8%). Em aves e seus derivados *Listeria* spp não foi isolada de nenhuma das amostras examinadas.

Na Dinamarca, SKOVGAARD & NØRRUNG (1989) examinaram 51 amostras de carne de suíno moídas, estando *Listeria* spp presente em 32 amostras (62,8%), *L. monocytogenes* em 6 amostras (11,8%), *L. innocua* em 26 amostras (51,0%) e *L. seeligeri* em 1 amostra (2,0%).

LEISTNER et alii (1989) num estudo feito em Kulmbach, Alemanha, isolaram *Listeria monocytogenes* a partir de carne suína moída (80%); carne bovina moída (63%); embutidos

tipo "mettwurst" fresco (59%); embutido tipo "mettwurst" de grosso calibre (20%); salame (17%); embutido defumado tipo "bruhwurstaufschnitt" (17%).

SCHMIDT (1989) numa avaliação de metodologia qualitativa e quantitativa para a detecção de *Listeria* em produtos cárneos, verificou a presença de *L. monocytogenes* em bacon (12%) mas não em presunto cozido. Para os outros produtos examinados, as percentagens de *L. monocytogenes* encontradas foram semelhantes às descritas por LEISTNER et alii (1989).

Considerando-se o exposto verifica-se que a positividade para *Listeria* spp tanto em carnes cruas quanto em produtos cárneos crus ou curados, é relativamente alta, o que pode indicar a importância destes alimentos como veículo de transmissão de listeriose.

2.5.3. OUTROS ALIMENTOS

Além dos grandes grupos de alimentos vistos acima, *Listeria* spp também têm sido pesquisada em outros alimentos como frutos do mar, verduras e saladas prontas para consumo, legumes, etc...

WEAGANT et alii (1988) avaliaram 57 produtos de origem marinha, provenientes de 12 países, com relação à presença de *Listeria* spp. *L. innocua* foi isolada em 26 amostras e *L. monocytogenes* em 2 de 7 amostras de camarões crus; 2 de 8 amostras de camarões cozidos e descascados; 7 de 24 amostras de carne cozida de caranguejo; 1 de 2 caudas de lagosta; 1 de 4 "finfish" e 2 de 7 "surimis" à base de frutos do mar.

BUCHANAN et alii (1989) verificaram a presença de *Listeria* spp em 28% das amostras de frutos do mar por eles analisadas. *L. monocytogenes* foi isolada de 11% das amostras, assim como *L. welshimeri*; *L. innocua* foi isolada em 5,5% das amostras. Os autores não isolaram *Listeria* spp das amostras de salada de batatas examinadas.

HOFER (1975a) estudou a presença de *Listeria* spp em amostras de alfaces provenientes de S. Paulo, Brasil. Em 3 das 56 amostras examinadas isolou-se *L. monocytogenes*.

STEINBRUEGGE et alii (1988) durante um estudo sobre capacidade de sobrevivência e crescimento de *L. monocytogenes* em alface pronta para consumo, verificaram a presença de *L. monocytogenes* em alfaces não inoculados.

Saladas preparadas e embaladas ("prepacked salads") comercializadas em supermercados do Reino Unido foram examinadas por SIZMUR & WALKER (1988). De 60 amostras examinadas, 4 foram positivas para *L. monocytogenes* e 13 para *L. innocua*.

HEISICK et alii (1989a) observaram a presença de *Listeria* spp em 19 amostras de batatas (em 70 analisadas) e em 25 amostras de rabanetes (em 68 testadas). Os demais produtos examinados (cogumelo, cenoura, repolho, brócoli, couve-flor, alface, tomate e pepinos) não apresentaram o microrganismo.

HEISICK et alii (1989b) isolaram *L. monocytogenes* a partir de repolhos, pepinos, batatas, e rabanetes adquiridos em 2 supermercados de Minneapolis, EUA. Também foram isoladas cepas de *L. innocua* de pepinos, alface, cogumelos, batatas e rabanetes. *L. seeligeri* e *L. welshimeri* também foram isoladas.

No Reino Unido, KERR et alii (1988a) examinaram 21 amostras de alimentos cozidos resfriados ("cook-chillfoods") adquiridos no comércio. *L. monocytogenes* foi isolada de 5 amostras (24%), sendo todas elas à base de frango. Os autores sugerem que ou o microrganismo pode sobreviver ao cozimento ou pode ocorrer contaminação pós-cozimento.

GILBERT et alii (1989) também testaram alimentos resfriados adquiridos do comércio e de instalações de "catering" de comidas resfriadas ("cook-chillcatering facilities"), quanto à presença de *L. monocytogenes*. Nas 527 amostras de frango pronto para consumo, pré assado ("precooked ready to eat") do varejo, 63 (12%) foram positivas para *L. monocytogenes*; nas 74 amostras de refeições resfriadas do varejo, 13 (18%) foram positivas. Nas 627 amostras de itens de pratos principais do "catering", 10 (2%) foram positivas, e das 73 amostras de sobremesa do "catering" nenhuma acusou a presença do microrganismo.

2.6. Efeito de condições ambientais e de processamento na sobrevivência e crescimento de *Listeria*.

2.6.1. TRATAMENTO TÉRMICO

Vários estudos sobre a resistência térmica de *Listeria* têm sido executados principalmente em leite, mas os dados obtidos são muito controversos. Enquanto alguns autores afirmam ser *Listeria* resistente à pasteurização (BEARNS & GIRARD, 1958; BRYAN, 1979; FERNANDEZ GARAYZABAL et alii, 1986; DOYLE et alii, 1987; FERNANDEZ GARAYZABAL et alii, 1987) e a outros tratamentos térmicos (KARAOANNOGLOU & XENOS, 1980), outros dizem o contrário (OBIGER, 1976; BRADSHAW et alii, 1985; BUNNING et alii, 1986; DONNELLY & BRIGGS, 1986; DONNELLY et alii, 1987; BRADSHAW et alii, 1987; BECKERS et alii, 1987; BUNNING et alii, 1988; FARBER et alii, 1988c).

A comparação entre os diversos trabalhos torna-se difícil pois o meio de suspensão, o tamanho do inóculo, a linhagem e os métodos utilizados, tanto no teste de aquecimento quanto na recuperação do microrganismo, variam de autor para autor.

Os primeiros estudos feitos com *L. monocytogenes* em leite (BEARNS & GIRARD, 1958) foram conduzidos em tubos abertos que só podiam ser parcialmente submersos em banho-maria durante o tratamento térmico, o que os levou a afirmar que o microrganismo poderia sobreviver à pasteurização (61,7°C por 35min). DONNELLY et alii (1987) e BECKERS et alii (1987), repetindo os testes executados por BEARNS & GIRARD, verificaram que este método, ou testes similares, podem levar a valores de resistência térmica imprecisos.

Para os pesquisadores que acreditam ser *Listeria* resistente à pasteurização, duas seriam as explicações: a alta contaminação inicial do produto (DOMINGUEZ RODRIGUEZ et alii, 1985) e a natureza intracelular facultativa do organismo, que o protegeria da inativação térmica durante a pasteurização (FLEMING et alii, 1985). Para testar a segunda hipótese, BUNNING et alii (1986) e DOYLE et alii (1987) estudaram a resistência térmica de *L. monocytogenes* localizada intracelularmente. Os primeiros pesquisadores utilizaram bactérias localizadas no interior de fagócitos de camundongos e suspensas em leite cru, obtendo um valor D a 71,7°C de 1,9s, concluindo que a posição intracelular não as protegeria da inativação térmica. O segundo grupo de pesquisadores

utilizou o leite proveniente de vacas infectadas artificialmente com culturas do microrganismo e verificou que *L. monocytogenes* pode sobreviver, quando em posição intracelular, ao tratamento térmico mínimo (71,7°C por 15s) recomendado pelo "Food and Drug Administration".

BUNNING et alii (1988) avaliaram posteriormente a resistência térmica tanto de *Listeria* livres no leite, quanto intracelularmente em fagócitos de bovinos. Eles constataram que a posição intra-celular não protege *L. monocytogenes* da pasteurização, mas que a resistência térmica do microrganismo sugere que se houver inóculo grande pode haver sobrevivência às condições de pasteurização a alta temperatura por período curto (HTST).

Porém o grupo de trabalho em listeriose de origem alimentar, da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1988) considerou a pasteurização um processo seguro para diminuir o nível de listérias no leite e sugeriu que estudos sobre pasteurização do leite não são mais necessários.

Outra fonte de calor que tem sido examinada é o forno de microondas. A eficiência dele na destruição de *L. monocytogenes* foi avaliada no Reino Unido por LUND et alii (1989), que trabalharam com frangos recheados contaminados artificialmente. Os autores verificaram que mesmo em números tão altos quanto 10^7 UFC/g, no recheio ou na superfície, as bactérias são destruídas se forem seguidas as instruções de preparação do alimento recomendadas pelo fabricante do forno.

2.6.2. OUTROS EFEITOS

O efeito bactericida de altas concentrações de cloreto de sódio (10,5% e 30,5%) sobre diversas linhagens de *L. monocytogenes*, em meio de cultura, diminui sensivelmente com a redução da temperatura, tornando a perda da viabilidade mais lenta (SHAHAMAT et alii, 1980a). A 4°C, em meio contendo 25,5% de NaCl, o microrganismo pode sobreviver por mais de 132 dias. A temperaturas mais altas, por exemplo 22°C, e com a mesma concentração salina, o microrganismo torna-se inviável após 28 dias (SHAHAMAT et alii, 1980a).

Os mesmos autores (SHAHAMAT et alii, 1980b) verificaram que o nitrito de sódio isoladamente não apresenta efeito inibidor sobre *L. monocytogenes*, mesmo em concentrações tão altas quanto 25.000 mg/kg. Para que ele atue como tal, dentro dos

limites permitidos pelas recomendações, é necessária a combinação de diferentes fatores tais como concentração salina (3% NaCl), pH ($\leq 5,5$) e temperatura (armazenamento sob refrigeração).

JUNTILLA e colaboradores (1989), trabalhando com embutidos fermentados, verificaram que *L. monocytogenes* foi capaz de sobreviver durante os 21 dias de fermentação quando se usam os níveis de nitrato de sódio e de cloreto de sódio recomendados para as indústrias de carne (120 mg/kg NaNO₃ e 3% NaCl).

O efeito inibidor de outros agentes conservadores como benzoato de sódio, ácido sórbico e propionato de sódio têm sido estudados por EL-SHENAWY & MARTH (1988a,b; 1989). O benzoato de sódio tem sua efetividade contra *L. monocytogenes* aumentada quando usado em pH ácido e em temperaturas de 21°C e 35°C, já os demais parecem ser mais efetivos principalmente em alimentos ácidos ou acidificados (pH 5,0) e preferencialmente combinados a baixas temperaturas (4°C).

Um produto que demonstrou ter efeito bactericida sobre *Listeria monocytogenes* é a fumaça líquida. MESSINA et alii (1988) estudaram o efeito de 5 tipos de fumaças líquidas sobre o microrganismo e verificaram que um deles (CharSol-10) propiciava a redução de 99,9% da população de bactérias inoculadas superficialmente, após 72h de armazenamento sob refrigeração.

Para produtos lácteos, verificou-se que a adição de ingredientes como cacau em pó, açúcar e carragenina contribui para o crescimento de *L. monocytogenes* (ROSENOW & MARTH, 1987b).

CONNER et alii (1986) estudaram o efeito da temperatura, NaCl e pH no crescimento de 2 linhagens de *L. monocytogenes* em suco de repolho. Os autores observaram que o microrganismo sobrevive por 70 dias em suco de repolho a 5°C, mesmo em presença de 5% de NaCl, e que pode tolerar e crescer a pH inicial de 5,0 a 6,1 sendo capaz de reduzir o pH do suco a 4,14 antes de sua completa inativação. Outro fato verificado foi que à temperatura de refrigeração (5°C) a taxa de mortalidade em baixos valores de pH foi menor que a 30°C.

GEORGE et alii (1988) avaliaram o efeito do pH e da temperatura no crescimento de diversas linhagens de *L. monocytogenes*, em meio de cultura. A temperaturas mais altas

(20-30°C) o microrganismo pode iniciar o crescimento em pH de até 4,39; já em temperaturas de refrigeração (4°C), o pH necessário para haver crescimento é de 5,23.

Listeria monocytogenes pode sobreviver à fermentação produzida por diferentes bactérias lácticas usadas na produção de iogurtes e de leites desnatados fermentados (SCHAACK & MARTH, 1988a;b). Já outras bactérias lácticas produzem bacteriocinas que irão inibir o crescimento de *Listeria* (HOOVER et alii, 1988; HARRIS et alii, 1989; RACCACH et alii, 1989).

O desenvolvimento de *L. monocytogenes* em alimentos, principalmente de origem vegetal, pode ser controlado por lisozima da clara de ovos de galinha, conforme relatado por HUGHEY et alii (1989).

MARSHALL & SCHMIDT (1988) estudando o comportamento de *L. monocytogenes* em leite, quando em presença de *Pseudomonas* spp, verificaram que a presença da segunda promove um maior crescimento da primeira. O Departamento de Agricultura norte-americano (USA, 1987) descreve que, em carne moída, a presença de *P. fluorescens* tem efeito sinérgico no crescimento de *L. monocytogenes*, provavelmente devido ao aumento no pH da carne decorrente da atividade proteolítica de *Pseudomonas*.

Uma variedade de produtos lácteos fluidos (leite desnatado e integral, leite achocolatado e creme de leite) inoculada com *L. monocytogenes* foi armazenada a diversas temperaturas por ROSENOW & MARTH (1987a). O tempo de geração do microrganismo foi de 41 min a 35°C; 4h27min-6h55min a 13°C; 8h40min-14h33min a 8°C e 1,2d-1,9d a 4°C.

SIZMUR & WALKER (1988) verificaram que em saladas preparadas e embaladas a população de *Listeria monocytogenes* dobra durante o armazenamento por 4 dias a 4°C.

A utilização de nisina tem sido estudada por alguns pesquisadores. DOYLE (1988) relata que, após a redução inicial no número de células de *L. monocytogenes* Scott A e uma fase lag de alguns dias, pode ocorrer o crescimento do microrganismo mesmo em presença de 500 UI/ml de nisina.

2.7. Comportamento de *L. monocytogenes* em alimentos

Como já foi referido anteriormente, as listérias possuem uma grande capacidade de sobrevivência em condições adversas. Isso tem levado diversos pesquisadores a estudar seu comportamento durante a produção e o armazenamento de alguns produtos, principalmente produtos lácteos.

Um dos trabalhos pioneiros sobre o assunto foi realizado na Iugoslávia (SIPKA et alii, 1974) e indicou a sobrevivência de *L. monocytogenes* em queijo branco salgado, após 28 dias de produção quando este estava totalmente maturado.

A sobrevivência de *L. monocytogenes* foi também verificada durante o processamento de queijo tipo "cottage" (RYSER et alii, 1985); processamento e maturação de queijo tipo "cheddar" (RYSER & MARTH, 1987a); queijo tipo "camembert" (RYSER & MARTH, 1987b); queijo semi-duro (DOMINGUEZ RODRIGUEZ, 1987); queijo tipo "colby" (YOUSEF & MARTH, 1988); queijo semi-duro de leite de cabra (THAM, 1988); processamento e maturação de queijo tipo "brick" (RYSER & MARTH, 1989). O microrganismo também pode sobreviver ao processo de produção e armazenamento de leite em pó (DOYLE et alii, 1985) por até 12 semanas; ao processamento e armazenamento de manteiga (OLSEN et alii, 1988); em leite fermentado refrigerado e em iogurte desnatado (SCHAACK & MARTH, 1988c); em leiteiro ("buttermilk") e iogurte integral aromatizado ou não (CHOI et alii, 1988).

Listeria também pode sobreviver em carne de cordeiro e carne bovina moída (mantidas a 0°C por 24 e 20 dias respectivamente); em proteínas sarcoplasmáticas isoladas de carne de bovinos, suínos e ovinos mantidas a 4°C; em ovos líquidos, desidratados e ovos desidratados e reidratados com água estéril, conforme verificado por KHAN et alii (1975). Em estudos sobre a capacidade de sobrevivência e crescimento de *Listeria* em carne moída armazenada sob refrigeração (4°C) verificou-se que o microrganismo permanecia viável por 2 semanas (JONHSON et alii 1988b) ou por até 30 dias (SHELEF, 1989) sem no entanto haver alterações na população. GOUET e colaboradores (1978) verificaram que em carne moída estéril, inoculada com o microrganismo e armazenada a 8°C, ocorria uma queda inicial na população (na ordem de $1\log_{10}$) ficando a seguir estável. Já quando eram inoculadas também outras espécies de bactérias, por exemplo *Pseudomonas fluorescens*, havia um crescimento da população de *Listeria*, talvez devido a atividade proteolítica de *Pseudomonas*. Estes resultados não puderam ser comprovados por SHELEF (1989), que

mesmo deixando a carne deteriorar-se não verificou um incremento na população de *Listeria*.

Outros produtos que podem permitir a sobrevivência e/ou crescimento de *L. monocytogenes* são salames (quando em número superior a 10^3 UFC/g, segundo JONHSON et alii, 1988a); embutidos tipo "zwiebelmettwurst" (KARCHES & TEUFEL, 1988); músculo bovino íntegro, embalado a vácuo (GRAU & VANDERLINDE, 1988); peito de frango processado em calor seco e embalado a vácuo ou em filme permeável a oxigênio (CARPENTER & HARRISON, 1989); embutidos tipo "beaker" e "pepperoni" (GLASS & DOYLE, 1989); peito de frango processado em calor úmido e embalado a vácuo ou em filme permeável a O_2 (HARRISON & CARPENTER, 1989) e carne bovina ou fígado bovino moídos (SHELEF, 1989).

2.8. Métodos de detecção e identificação

Face à inexistência de uma metodologia padronizada para detecção da presença de *L. monocytogenes* em alimentos, uma grande variedade de métodos de recuperação e de isolamento tem sido utilizada.

O plaqueamento direto de diluições adequadas da amostra (BUCHANAN et alii, 1987; YOUSEF et alii, 1988; GOLDEN et alii, 1988a; SCHMIDT, 1989) ou o enriquecimento anterior ao plaqueamento em ágar seletivo (DOMINGUEZ RODRIGUEZ et alii, 1984; DOYLE & SCHOENI, 1986; LOVETT, 1987a; SLADE & COLLINS-THOMPSON, 1987; MCCLAIN & LEE, 1988; SCHMIDT, 1989) são alternativas utilizadas.

A utilização do enriquecimento tem sido de grande valia por facilitar a recuperação dos microrganismos injuriados ou a detecção quando estes estão em baixos números. Os procedimentos de enriquecimento seriado, utilizando um meio de enriquecimento primário pouco seletivo, seguido por um meio de enriquecimento secundário seletivo e isolamento em um ágar diferencial, parece ser a metodologia mais adequada para o isolamento de *L. monocytogenes* de origem alimentar (WHO, 1988; RALOVICH, 1989).

O enriquecimento pode ser feito à temperatura de refrigeração ($4^{\circ}C$) para explorar a capacidade do microrganismo em crescer a baixas temperaturas (RALOVICH, 1975; DOMINGUEZ RODRIGUEZ et alii, 1984; DOYLE & SCHOENI, 1986; SLADE &

COLLINS-THOMPSON, 1987; YOUSEF et alii, 1988). Este procedimento, apesar de muito eficiente, é muito lento (pois as amostras chegam a ficar incubadas até 3 meses) o que fez com que os pesquisadores buscassem temperaturas mais altas, por exemplo 30°C (LOVETT, 1987a; MCCLAIN & LEE, 1988; SCHMIDT, 1989), a fim de propiciar um tempo de análise menor, porém sem perda de sensibilidade para recuperar populações reduzidas do microrganismo.

A incubação, tanto do caldo de enriquecimento quanto das placas de isolamento, pode ser feita em aerobiose ou em microaerofilia (DOYLE & SCHOENI, 1986).

Os meios de enriquecimento e de isolamento possuem formulações que variam segundo os diferentes autores. RALOVICH (1989) revisou, extensivamente, os procedimentos de isolamento publicados desde 1948. BRACKETT & BEUCHAT (1989) também revisaram alguns métodos e meios para o isolamento e cultivo de *L. monocytogenes* a partir de vários alimentos. Completando estas duas revisões surgiu a nova metodologia proposta por MCCLAIN & LEE (1989) que utiliza para o enriquecimento secundário uma modificação do meio proposto por FRASER & SPERBER (1988) e para o isolamento, o ágar proposto por CURTIS et alii (1989).

Muitos autores (HAO et alii, 1987; FLORIDA, 1987; PINI & GILBERT, 1988b; GOLDEN et alii, 1988b; HARTMANN et alii, 1988; TRUSCOTT & MCNAB, 1988; LOESSNER et alii, 1988; HEISICK et alii, 1989; BUCHANAN et alii, 1989; CASSIDAY et alii, 1989; RALOVICH, 1989) têm comparado a efetividade das diversas metodologias propostas para o isolamento de *Listeria* a partir de alimentos.

Dentre todas as metodologias já descritas, duas parecem ter maior aceitação entre os pesquisadores: uma é a desenvolvida por LOVETT (1987a) e conhecida como "método do FDA" e a outra é a desenvolvida por MCCLAIN & LEE e conhecida como "método do USDA-FSIS". O primeiro método foi desenvolvido basicamente para leite e produtos lácteos, enquanto o segundo é oficialmente recomendado nos EUA para carnes e produtos cárneos. Segundo BRACKETT & BEUCHAT (1989) o procedimento recomendado pelo USDA-FSIS é mais sensível, principalmente quando se tem uma grande microbiota acompanhante. Outra vantagem deste método é o menor período de incubação requerido para o caldo de enriquecimento, o que permite o estabelecimento de um diagnóstico final mais rapidamente. O "Florida Department of Agriculture and Consumer Services" (apud

FLORIDA, 1987) também constatou ser o "método USDA-FSIS" tão eficiente, ou até mais eficiente, que o "método FDA" tanto para produtos lácteos quanto carnes.

A identificação inicial das novas cepas é geralmente feita através do exame da morfologia colonial e celular, pela reação hemolítica em ágar sangue, pela coloração verde azulada típica das colônias, quando examinadas através de iluminação transmitida. Os testes de identificação e de confirmação são normalmente baseados nas características clássicas descritas por SEELIGER & JONES (1986) e citadas por nós em 2.1. A Organização Mundial da Saúde (WHO, 1988) recomenda que a confirmação dos isolados seja feita de maneira rápida, utilizando-se um número mínimo de testes que realmente identifiquem as espécies de *Listeria*.

Métodos mais modernos têm sido usados por alguns autores para a identificação de *Listeria*. Dentre estes métodos existe o Ensaio Imunoenzimático ("ELISA") usando anticorpos monoclonais para antígenos flagelares e a hibridização de ADN.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. MEIOS DE CULTURA

- Ágar soja tripticase, da Difco, adicionado de 0,6% de extrato de levedura da Lab M ("TSA-YE");
- Caldo soja tripticase, da Difco, adicionado de 0,6% de extrato de levedura ("TSB-YE");
- Ágar McBride modificado ("MLA") formulado no laboratório, segundo LOVETT (1988);
- Ágar Vogel-Johnson modificado ("MVJ") formulado no laboratório, segundo BUCHANAN et alii (1987);
- Ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam ("LPM") formulado no laboratório segundo LEE & MCCLAIN (1986);
- Meio SIM, da Biobras, adicionado de 0,2% de ágar da Difco;
- Ágar tríplice açúcar ferro ("TSI"), da Difco;
- Ágar colúmbia adicionado de 5% de sangue desfibrinado de cavalo;
- Caldo nitrato, da Difco;

- Caldo "MR-VP" da Difco;
- Caldo básico de bromocresol púrpura, da Difco;
- Ágar sangue de ovelha, segundo MCCLAIN & LEE (1988);
- Ágar soja tripticase ("TSA"), da Difco, adicionado de 5% de sangue desfibrinado de ovelha;
- Caldo de enriquecimento primário ("LEB 1") e secundário ("LEB 2"), segundo MCCLAIN & LEE (1988).

3.1.2. SOLUÇÕES

- Solução a 10% de cicloheximida, Sigma;
- Solução a 5% e a 2% de ácido nalidíxico, Winthrop;
- Solução a 2% de bacitracina, Sigma;
- Solução a 1% de telurito de potássio, Carlo Erba;
- Solução a 0,27% e a 0,25% de acriflavina, Inlab;
- Solução a 1% e a 0,5% de moxalactam, Lilly;
- Solução de hidróxido de potássio (KOH) a 0,2% em salina 2%;

3.1.3. EQUIPAMENTOS

- Incubadora orbital com agitação e controle de temperatura, "Orbit Environ Shaker-Labline";
- Homogeneizador de pistões, "Stomacher Lab Blendor - Seward Medical";
- Estufa incubadora para BOD, modelo 347, Fanem;
- Microscópio estereoscópico "Karl Zeiss", 4752;
- Espelho côncavo "Nikon" SMZ-2;
- Iluminador "Schott", modelo KL 1500.

3.1.4. ALIMENTOS

- Carne bovina moída no açougue;
- Lingüiça frescal, vendida a granel;
- Salsicha, vendida a granel;
- Queijo minas frescal;
- Leite pasteurizado, tipos B e C;
- Leite cru, tipo B.

3.1.5. OUTROS

- Cultura de *L. monocytogenes* Scott A, fornecida pelo "Food and Drug Administration, USA";
- Materiais e equipamentos de uso corrente em um laboratório de microbiologia.

3.2. Métodos

Numa etapa inicial da pesquisa, face à inexistência de uma metodologia padronizada, avaliou-se a capacidade seletiva de alguns meios de isolamento para listérias. A seguir procedeu-se à avaliação da contaminação em produtos alimentícios existentes no comércio.

3.2.1. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE SELETIVA DE TRÊS MEIOS DE ISOLAMENTO

O estudo foi desenvolvido visando avaliar o comportamento de 3 meios de isolamento ("MVJ", "MLA" e "LPM") com relação à seletividade para *L. monocytogenes* artificialmente inoculada em amostras de carne moída e de leite pasteurizado tipo B. Estes estudos foram conduzidos com 3 repetições, sendo os plaqueamentos em duplicata.

3.2.1.1. Preparo do inóculo de *Listeria monocytogenes* Scott A

Listeria monocytogenes Scott A foi semeada em tubos contendo "TSA-YE" e incubada a 30°C por 24h. A seguir semeou-se a cultura em um frasco Erlenmeyer contendo 50 ml de "TSB-YE" e incubou-se a 30-35°C em incubadora orbital com agitação de 120 rpm (rotações por minuto). Diluiu-se, decimalmente em solução salina peptonada até atingir aproximadamente 10^4 microrganismos/ml, o que foi acompanhado pela contagem de colônias em placas de "TSA-YE", incubadas em estufa incubadora para BOD a 35°C por 24h.

3.2.1.2. Testes com os meios de isolamento

Porções de 25 g das amostras foram inoculadas com 1ml do inóculo preparado como descrito em 3.2.1.1., de modo a conter aproximadamente $3,0 \times 10^3$ UFC/g, sendo a seguir diluídas em 225 ml de solução salina peptonada e homogeneizadas em homogeneizador de pistões por 1 minuto (no caso da carne) ou apenas agitadas manualmente (no caso do leite). Diluições decimais foram preparadas e alíquotas de 0,1 ml espalhadas superficialmente nos meios de isolamento a serem testados ("MLA", "MVJ" e "LPM").

Os dois primeiros meios foram incubados a 35°C (LOVETT, 1987a; BUCHANAN et alii, 1987) e o último a 30°C (MCCLAIN & LEE, 1988), sendo as placas examinadas após 24, 48 e 72 h de incubação. As placas de "MLA" e de "LPM" foram observadas com auxílio de iluminação transmitida conforme descrito por MCCLAIN & LEE (1988) (Fig.3) e as de "MVJ" por exame direto.

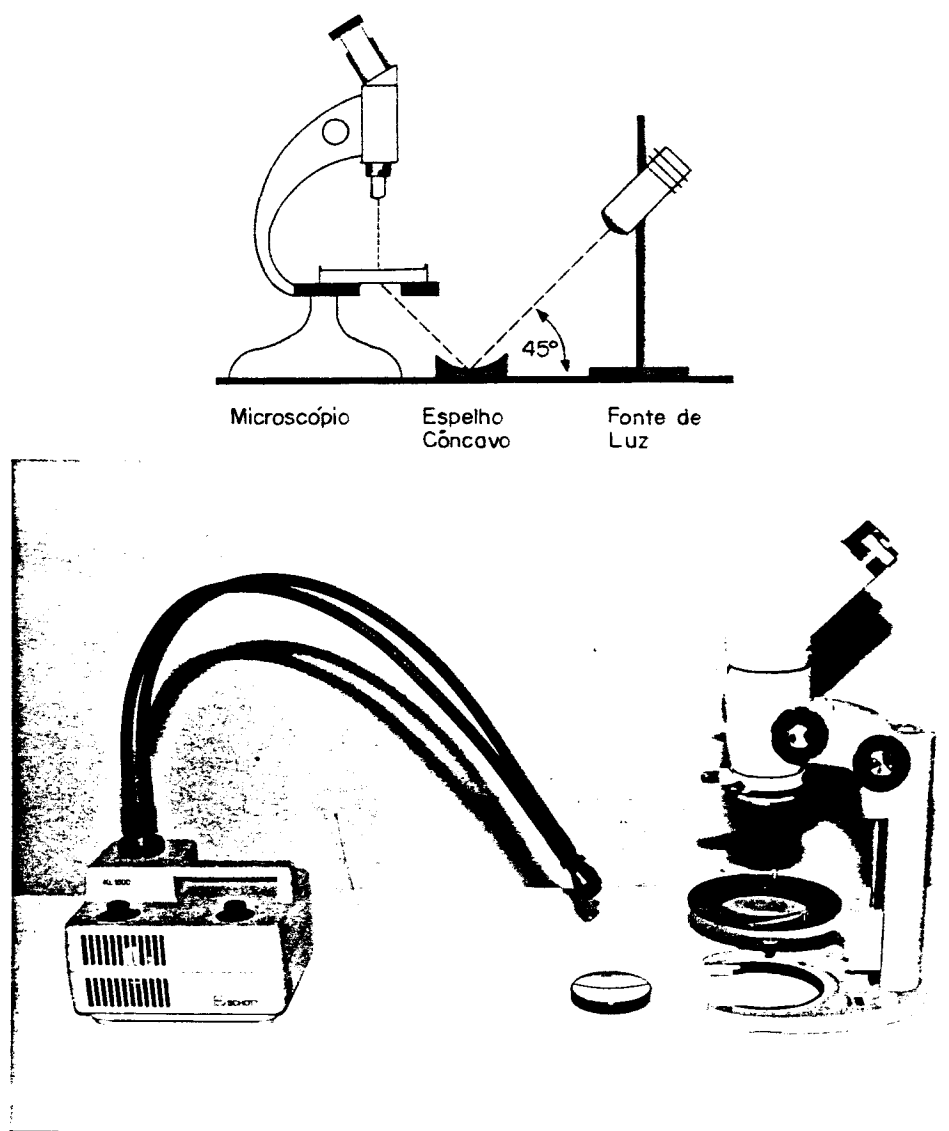


Figura 3. Aparelhagem para obtenção de iluminação transmitida, segundo MCCLAIN & LEE (1988).

As colônias de *Listeria* spp em "MVJ" são de cor negra, brilhantes e o meio de cultura permanece com cor inalterada; em "LPM" e "MLA" são de coloração verde azulada quando examinadas com luz transmitida.

Três colônias suspeitas de serem do gênero *Listeria*, retiradas de cada uma das placas, foram purificadas em "TSA-YE" e incubadas a 35°C por 24 horas sendo a seguir examinadas sob luz transmitida (LOVETT, 1987a & 1988). As colônias com coloração característica verde-azulada foram semeadas em tubos de "TSA-YE" e, a seguir, submetidas a testes preliminares de identificação: motilidade em microscópio de contraste de fase, morfologia e coloração de Gram, produção de indol, H₂S e motilidade característica em ágar semi-sólido (fig. 4), catalase, oxidase, produção de ácidos a partir de glicose, lactose e sacarose em "TSI" (SEELIGER & JONES, 1986; LOVETT, 1987a).



Figura 4. Crescimento em forma de "guarda-chuva", característico de *Listeria* em ágar semi-sólido.

3.2.2. ESTUDO DA CONTAMINAÇÃO DOS PRODUTOS LÁCTEOS E CÁRNEOS VENDIDOS NO COMÉRCIO

O estudo foi conduzido em um total de 120 amostras de produtos lácteos e cárneos coletados em estabelecimentos comerciais de Campinas, SP, no período de 17.01.89 a 28.02.89 e em 20 amostras de leite cru tipo B, colhidas em uma usina de beneficiamento da mesma localidade, nos dias 09 e 16.05.89.

3.2.2.1. Coleta das amostras

Para um mesmo tipo de produto, foram coletadas um total de 20 amostras de diferentes marcas industriais, em diferentes locais de comercialização.

As amostras de queijo minas frescal e de leite pasteurizado tipos B e C foram coletadas em suas embalagens originais. A coleta das amostras de carne e de seus derivados (aproximadamente 300g) foi deixada a cargo do próprio funcionário do estabelecimento, a fim de se obterem amostras semelhantes às condições de revenda. Quanto ao leite cru, as amostras (aproximadamente 500 ml de cada produtor colocados em frascos de vidro esterilizados) foram coletadas na plataforma de desembarque, na usina, imediatamente após a homogeneização dos latões.

Todas as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo e transportadas ao laboratório, sendo usualmente examinadas num prazo não superior a 2 horas.

3.2.2.2. Pesquisa de listérias

A metodologia empregada foi uma modificação, por nós realizada, daquela proposta por MCCLAIN & LEE (1988) a qual preconiza o plaqueamento das amostras em ágar "LPM" e a purificação dos isolados em ágar sangue de cavalo. Nós utilizamos simultaneamente ao "LPM" o ágar "MVJ", proposto por BUCHANANN et alii (1987), e purificamos as colônias suspeitas em "TSA-YE" fazendo uso do ágar sangue de cavalo no teste de hemólise.

Porções de 25g de amostra eram removidas assepticamente e diluídas com 225 ml do caldo de enriquecimento primário ("LEB 1"), seguindo-se a homogeneização (Figura 5) em homogeneizador de pistões por 1 minuto para produtos sólidos ou por agitação manual para as amostras de leite. Os caldos resultantes eram transferidos para frascos Erlenmeyer e eram incubados por 3-4 horas a 30°C após as quais uma alíquota de 0,1 ml era espalhada superficialmente nos meios "LPM" e "MVJ" ; os frascos de "LEB 1" eram novamente incubados por aproximadamente mais 21 horas (Caldo A). A partir do caldo A usaram-se três procedimentos:

a) tratamento de 1,0 ml de Caldo A com 4,5 ml de solução de hidróxido de potássio, seguida de agitação por 1 minuto e semeadura imediata com auxílio de zaragatoa nas placas de "LPM" e "MVJ", (figura 6);

b) plaqueamento direto, com auxílio de alça de níquel cromo, em placas de "LPM" e "MVJ";

c) transferência de 0,1 ml de Caldo A para 10 ml de "LEB 2", incubando-se a 30oC por 24 horas (Caldo B) e sendo este caldo tratado de maneira similar ao descrito para o Caldo A nas alíneas a) e b).

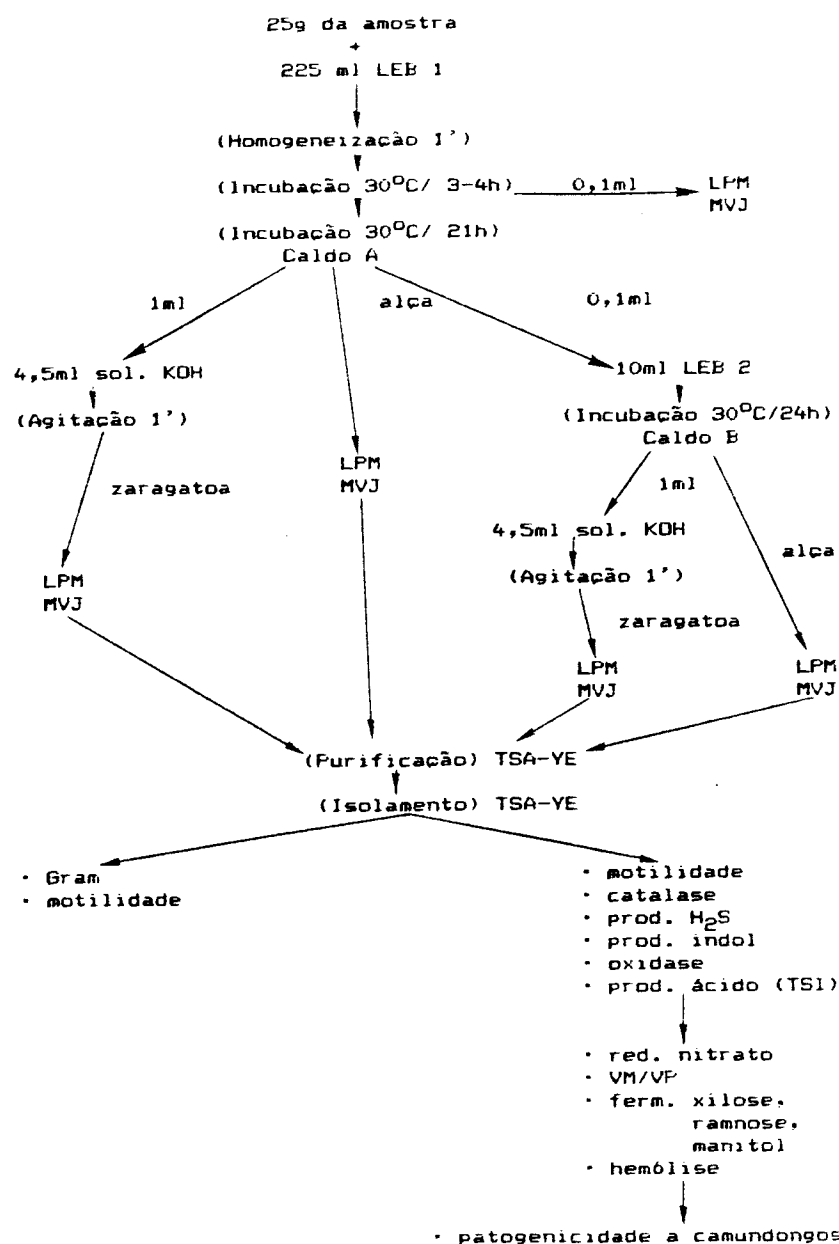


Figura 5. Representação esquemática da metodologia utilizada no trabalho, para avaliação da contaminação dos alimentos por *Listeria* spp (modificada da proposta por MCCLAIN & LEE, 1988).

LEB 1 e LEB 2 = caldo de enriquecimento 1^{ário} e 2^{ário}; LPM = ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam; MVJ = ágar Vogel-Johnson modificado; TSA-YE = ágar soja tripticase com extrato de levedura.

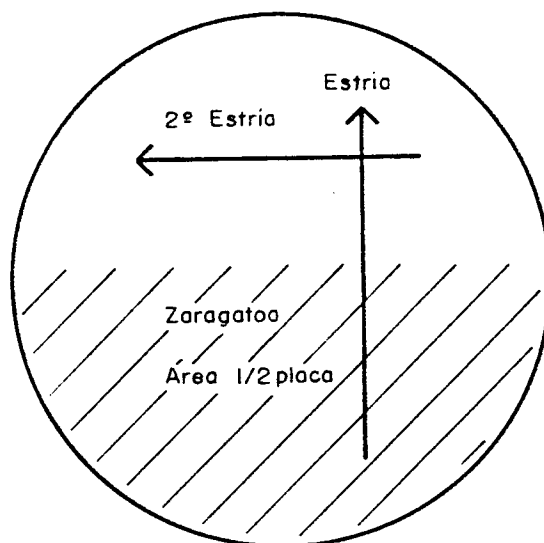


Figura 6. Representação esquemática da semeadura com zaragatoa, para isolamento de bactérias (segundo MCCLAIN & LEE, 1988).

Em todas as etapas, as placas de "LPM" foram incubadas a 30°C e as de "MVJ" a 35°C, sendo observadas após 48 horas de incubação.

De todas as placas de "LPM" e "MVJ" foi retirada uma colônia com coloração característica perfazendo um total de 10 colônias por amostra, sendo que estas colônias suspeitas de serem do gênero *Listeria* foram submetidas à purificação e à identificação para gênero *Listeria*, conforme descrito em 3.2.1.2.

A seguir, as culturas evidenciando reações típicas foram submetidas a testes bioquímicos complementares a fim de se proceder a identificação das diferentes espécies: produção de hemolisina, redução de nitrato, reação de Voges-Proskauer, reação de vermelho de metila, fermentação de xilose, ramnose e manitol e teste de hemólise sinérgica do fator Camp (SEELIGER & JONES, 1986; LOVETT, 1987a; MCCLAIN & LEE, 1988).

Quando não foi possível a determinação de um isolado como hemolítico e as demais reações eram características para *L. monocytogenes*, utilizou-se o teste de patogenicidade em camundongos recomendado por LOVETT (1987a).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da capacidade seletiva de três meios de isolamento

Nos Quadros 2 e 3 encontra-se a distribuição dos resultados obtidos nos testes realizados com *L. monocytogenes* Scott A, os quais tiveram por finalidade avaliar a eficiência de 3 meios seletivos empregados para o isolamento de listérias a partir de alimentos. Consideraram-se como suspeitas de serem *Listeria* todas as colônias com coloração características nos três meios; como gênero *Listeria* consideraram-se as colônias com perfil bioquímico e morfológico típicos, segundo os testes realizados em 3.2.1.2.

Quadro 2 - Contagem média de bactérias em amostras inoculadas artificialmente com *Listeria monocytogenes* Scott A, quando usados os meios ágar Vogel-Johnson modificado ("MVJ"), ágar McBride modificado ("MLA") e ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam ("LPM").

Teste	Inóculo (UFC/ml)	Meio	Leite past. tipo B		Carne moída	
			Contagem total (UFC/ml)	Contagem col. suspei- tas* de gêne- ro <i>Listeria</i> (UFC/ml)	Contagem total (UFC/g)	Contagem col.suspei- tas* de gêne- ro <i>Listeria</i> (UFC/g)
1	$3,6 \times 10^3$	MVJ	$2,6 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$1,9 \times 10^4$	$7,3 \times 10^3$
		MLA	$7,1 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	$8,5 \times 10^5$	... (a)
		LPM	$3,1 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	$5,9 \times 10^3$	$4,4 \times 10^3$
2	$3,8 \times 10^3$	MVJ	$1,9 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$	$1,8 \times 10^4$	$4,9 \times 10^3$
		MLA	$2,7 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$	$7,4 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$
		LPM	$2,8 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$
3	$1,5 \times 10^3$	MVJ	$1,3 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	$1,1 \times 10^4$	$4,8 \times 10^3$
		MLA	$1,7 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$	$2,7 \times 10^5$	$3,1 \times 10^4$
		LPM	$5,5 \times 10^2$	$5,5 \times 10^2$	$1,6 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$

* - Colônias com coloração característica

(UFC/ml ou g) = Unidades formadoras de colônias por ml ou grama;

(a) = contagem inviável devido ao intenso crescimento da microbiota acompanhante.

Quadro 3 - Percentagem de colônias confirmadas como gênero *Listeria* dentre as colônias suspeitas isoladas a partir de amostras de leite pasteurizado tipo B e carne moída artificialmente contaminadas.

Teste	Meio	Leite past. tipo B		Carne moída	
		col. confir- nadas*/col. testadas**	% de colô- nias confir- madas*	col. confir- madas*/col. testadas**	% de colô- nias confir- madas*
1	MVJ	6/6	100	4/6	70
	MLA	6/6	100	-	-
	LPM	6/6	100	6/6	100
2	MVJ	6/6	100	6/6	100
	MLA	6/6	100	2/6	33
	LPM	6/6	100	4/6	70
3	MVJ	6/6	100	2/6	33
	MLA	6/6	100	0/6	0
	LPM	6/6	100	6/6	100

* Colônias confirmadas como gênero *Listeria* pelos testes: motilidade em lâmina, morfologia e coloração de Gram, produção de indol, H₂S e motilidade característica em ágar semi-sólido, catalase, oxidase, produção de ácidos em meio "TSI".

** Colônias com coloração característica

Observa-se que, para a carne moída, o meio "MLA" permitiu o desenvolvimento de colônias suspeitas de gênero *Listeria* em valores superiores ao do inóculo inicial (Quadro 2) e quando estas foram testadas para confirmação do gênero (Quadro 3) verificou-se baixo índice de correlação, o que indica a pouca seletividade e poder de diferenciação deste meio.

Os resultados demonstraram que para as amostras de leite, os três meios se equivalem, seja com relação à proporção "colônias suspeitas/total de colônias presentes" calculada a partir das informações do quadro 2 (Figura 7), quanto com relação à percentagem de colônias confirmadas do gênero *Listeria* (Figura 8).

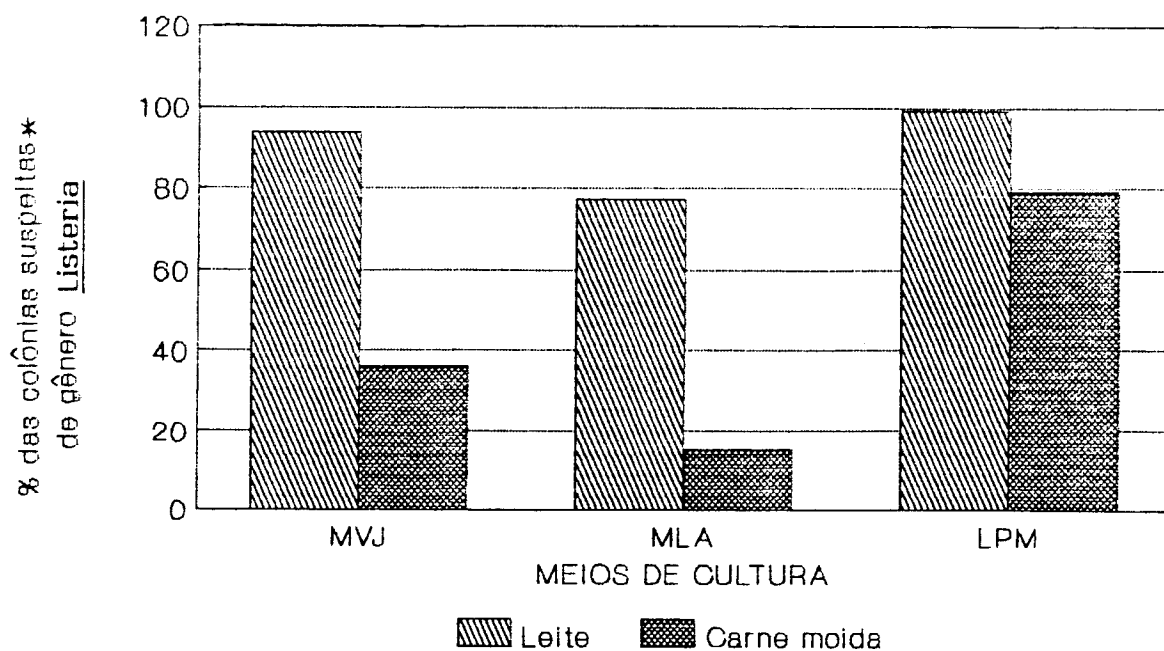


Figura 7. Percentagem (média de 3 repetições) de recuperação de colônias suspeitas^(*) de gênero *Listeria*, relativa à contagem total de colônias que se desenvolveram nas placas, quando usados os meios ágar Vogel-Johnson modificado ("MVJ"), ágar McBride modificado ("MLA") e ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam ("LPM").

(*) = colônias com coloração característica

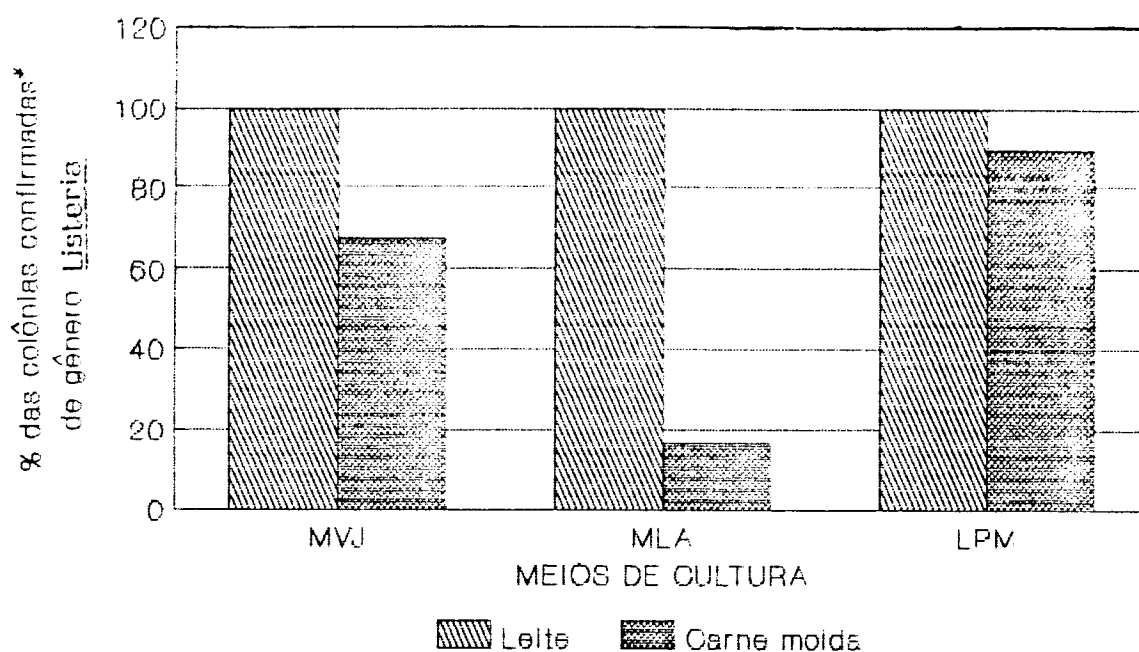


Figura 8. Percentagem (média de 3 repetições) de colônias confirmadas^(*) de *Listeria*, relativa às diagnosticadas como suspeitas^(**), quando usados os meios ágar Vogel-Jonhson modificado ("MVJ"), ágar McBride modificado ("MLA") e ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam ("LPM").

(*)= Colônias confirmadas como gênero *Listeria* pelos testes: motilidade em lâmina, morfologia e coloração de Gram, produção de indol, H₂S e motilidade característica em ágar semi-sólido, catalase, oxidase e produção de ácidos em meio "TSI".

(**)= colônias com coloração característica.

Já para a carne, a eficiência dos 3 meios diminuiu sensivelmente, sendo o meio "MLA" o menos eficiente, por permitir o crescimento da microbiota acompanhante o que dificulta sobremaneira a contagem e o isolamento das colônias suspeitas (Figura 7). Nota-se ainda que o meio "LPM" é mais seletivo, permitindo a identificação de *Listeria* spp em 90% das colônias suspeitas testadas (Figura 8).

O meio "MVJ" pareceu ser menos eficiente que o "LPM", para a cepa testada, permitindo o isolamento de um número ligeiramente inferior de colônias do gênero

Listeria (Figura 8). O meio "MVJ" apresenta a vantagem de não necessitar da iluminação transmitida para identificação de colônias suspeitas, o que o torna importante para laboratórios que não possuam o recurso da iluminação artificial recomendada.

Com relação ao tempo de incubação das placas, observou-se que 48 horas é o tempo ideal, pois em 24 horas as colônias são de difícil visualização e em 72 horas não há uma melhora na resolução.

As conclusões obtidas na presente pesquisa são semelhantes às aquelas obtidas por SHELEF (1989) que comparou a seletividade dos meios "MLA", "LPM", "LPM" adicionado de telurito de potássio ("LPMT") e ágar feniletanol ácido nalidíxico ciclohexanediona ("CNPA"), para carne e fígado bovino moídos e artificialmente contaminados com *Listeria monocytogenes* (Scott A, Brie 1, ATCC 35152), e verificou que o "LPM" foi o meio mais seletivo.

CASSIDAY et alii (1989) avaliaram 10 meios seletivos (dentre eles o "MLA", "LPM" e "MVJ") com relação à facilidade de isolamento e enumeração de 4 linhagens de *L. monocytogenes* (Scott A, Brie 1, LCDC 81-86 e DA-3), inoculadas em ostras, em presunto curado ("cured ham") e em "country ham". Estes pesquisadores verificaram serem os meios "LPM" e "MVJ" adequados para os alimentos, e que o "MVJ" propiciou o isolamento de menor número de células de *L. monocytogenes* Scott A que os demais meios.

LOESSNER et alii (1988) inocularam diversas bactérias inclusive várias linhagens de *Listeria monocytogenes* em alimentos tais como legumes e verduras, saladas preparadas, carne bovina moída, leite e iogurte, a fim de comparar a capacidade seletiva de diversos meios de isolamento ("MLA", "LPM", "MVJ", ágar McBride, ágar acriflavina cefatazidima, ágar Rodriguez, ágar feniletanol ácido nalidíxico ciclohexanediona). Estes pesquisadores verificaram ser o "LPM" um meio mais eficiente para o isolamento de *Listeria* a partir de diversos alimentos e que apesar do "MVJ" ter algumas restrições (como inibir algumas linhagens de *Listeria*, inclusive de *L. monocytogenes* Scott A) é muito útil, devido à sua facilidade de diferenciar as colônias. Estes autores verificaram também que *L. monocytogenes* Scott A quando em presença de outras bactérias apresentava morfologia celular e colonial atípica nos meios seletivos testados.

Também BUCHANAN e colaboradores (1989) compararam a efetividade do "LPM" e do "MVJ" para a detecção de *Listeria* spp a partir de leite, carnes bovina e de aves e de

frutos do mar e concluíram que os meios "LPM" e "MVJ" são equivalentes para a recuperação do microrganismo a partir destes alimentos.

Outros autores como HARTMANN et alii (1988), BAILEY (1989) e RALOVICH (1989), analisando alimentos adquiridos no comércio, chegaram a conclusões semelhantes, ou seja, que "LPM" e "MVJ" são meios adequados para a pesquisa de *Listeria* a partir de alimentos.

4.2. Estudo da contaminação de produtos lácteos e cárneos vendidos no comércio

A metodologia empregada foi bastante eficiente para o isolamento de listérias a partir de alimentos recolhidos no comércio.

O plaqueamento superficial de uma alíquota da amostra após 3-4 horas de incubação a 30°C (Caldo A), com a finalidade de se avaliar o número de listérias presentes (MCCLAIN & LEE, 1988), mostrou-se pouco eficiente, tanto para o meio "LPM" quanto para o "MVJ". Isto porque, o crescimento intenso da microbiota acompanhante impede a contagem de colônias características, em ambos os meios.

O tratamento com KOH foi muito efetivo levando a uma melhor visualização das colônias suspeitas, através da redução do número de microrganismos acompanhantes. Este fato é extremamente importante, principalmente quando se trabalha com amostras que possuam elevada carga microbiana. Observou-se também que mesmo após 1 hora em contato com a solução de KOH, as células de *Listeria* permaneciam viáveis, sendo passíveis de isolamento mesmo em meios seletivos.

Com relação aos testes bioquímicos diferenciais utilizados na identificação das espécies do gênero *Listeria*, e relacionados em 3.2.2.2, observamos que para o Teste Camp, tanto a inoculação das culturas quanto a leitura das placas, são extremamente difíceis. Para a inoculação há necessidade de estrias perfeitamente retas e finas só conseguidas com agulha, o que muitas vezes provoca o rompimento do ágar. A leitura é difícil pois, apesar de ocorrer a intensificação da zona de hemólise, ainda assim a zona hemolítica de *Listeria monocytogenes* é pequena e de difícil visualização. As distâncias entre as culturas, seja nas estrias horizontais (15mm) ou nas verticais (3mm), são fatores preponderantes para a

obtenção de bons resultados. A frequência de resultados duvidosos foi grande o que obrigou repetições sucessivas do teste, e a utilização do teste "in vivo" em camundongos.

O aperfeiçoamento deste teste, ou a utilização de outros simples e com menor possibilidade de erros, deve ser pesquisado e difundido.

No decorrer do trabalho, foi analisado um total de 140 amostras de produtos lácteos e cárneos. Deste total, 67 amostras (47,9%) apresentaram-se contaminadas por gênero *Listeria* (Quadro 4). Conforme evidencia o quadro, os índices de contaminação foram extremamente variáveis entre os diversos alimentos, com intervalos de zero a 100% das amostras revelando a presença de listérias. Foi particularmente acentuada a contaminação dos produtos cárneos (95% das amostras).

QUADRO 4- Frequência de amostras positivas para o gênero *Listeria* em 20 amostras de cada produto examinado, e frequência de *Listeria monocytogenes* em relação a estas amostras positivas.

Tipo da amostra	Amostras positivas para gênero <i>Listeria</i>		Amostras positivas para <i>L. monocytogenes</i>	
	Nº	%	Nº	%
Carne bovina moída	20	100,0	13	65,0
Salsicha	17	85,0	14	82,4
Lingüiça frescal	20	100,0	16	80,0
Leite cru, tipo B	2	10,0	0	-
Leite past. tipo B	0	-	0	-
Leite past. tipo C	0	-	0	-
Queijo minas frescal	8	40,0	2	25,0
Total	67	47,9	45	67,2

Queijo minas frescal e o leite cru tipo B apresentaram contaminações apreciáveis sendo que 25% do total de amostras destes dois tipos de alimentos foram positivos para o gênero. Já as amostras de leite pasteurizado, tanto tipo B quanto tipo C, foram negativas para o microrganismo.

Listeria monocytogenes esteve presente em 45 (67,2%) das 67 amostras positivas para o gênero *Listeria*. Estas amostras positivas para *L. monocytogenes* estavam assim distribuídas:

13 (65%) das 20 amostras de carne bovina moída; em 14 (82,4%) das 17 amostras de salsicha, em 16 (80%) das 20 amostras de lingüiça frescal e em 2 (25%) das 8 amostras de queijo minas frescal (Quadro 4).

A partir das amostras citadas isolou-se um total de 507 cepas com coloração característica, das quais (Quadro 5 e Figura 9) 218 (43%) foram confirmadas como gênero *Listeria*, com predomínio das espécies *L. innocua* (66,0%) e *L. monocytogenes* (30,7%); os 3,3 % restantes distribuíram-se entre *L. seeligeri* (1,4%), *L. welshimeri* (1,4%) e *L. murrayi* (0,5%), sendo esta última isolada de apenas 1 das amostras.

QUADRO 5- Prevalência das espécies identificadas entre 218 cepas do gênero *Listeria* isoladas de 67 amostras de alimentos cárneos e lácteos.

Espécie	Cepas	
	Nº	%
<i>L. monocytogenes</i>	67	30,7
<i>L. innocua</i>	144	66,0
<i>L. seeligeri</i>	3	1,4
<i>L. welshimeri</i>	3	1,4
<i>L. murrayi</i>	1	0,5
Total	218	100,0

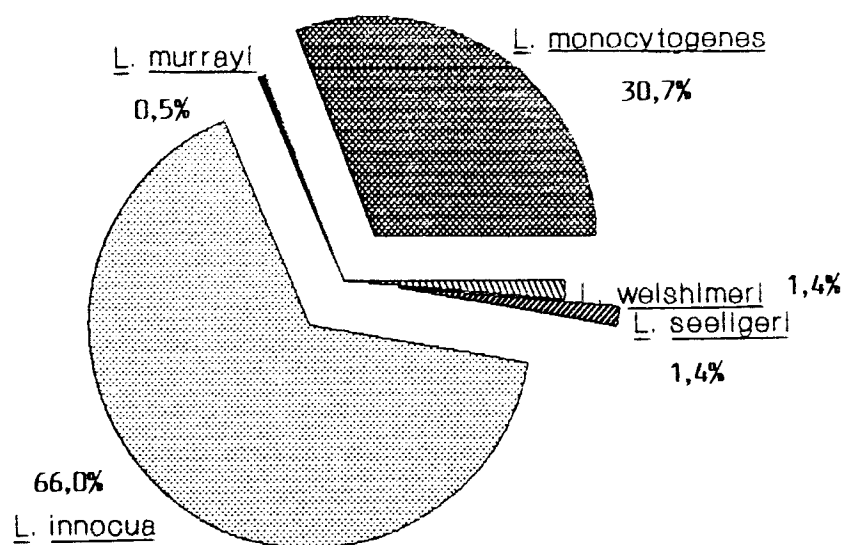


Figura 9. Prevalência das espécies identificadas entre 218 cepas do gênero *Listeria* isoladas de 67 amostras de alimentos cárneos e lácteos.

Dentre as amostras de alimentos positivas para *Listeria*, 29 (43,3%) estavam contaminadas com somente 1 espécie, enquanto 38 (56,7%) apresentavam 2 ou mais espécies, conforme o quadro 6. Para os produtos cárneos, houve predomínio da contaminação por mais de uma espécie, enquanto que para o leite cru tipo B e o queijo minas frescal predominaram as amostras com uma única espécie.

QUADRO 6- Número e percentagem de amostras de alimentos com somente uma espécie de *Listeria* e com duas ou mais espécies.

Produto	Amostras com somente 1 espécie		Amostras com 2 ou mais espécies	
	Nº	%	Nº	%
Carne bovina moída(20)*	7	35,0	13	65,0
Salsicha (17)	6	35,3	11	64,7
Lingüiça frescal (20)	8	40,0	12	60,0
Queijo minas frescal (8)	6	75,0	2	25,0
Leite cru tipo B (2)	2	100,0	0	-
Total (67)	29	43,3	38	56,7

* = número de amostras positivas para gênero *Listeria*

Estas 67 amostras positivas para o gênero *Listeria* puderam ser detectadas em sua maioria simultaneamente a partir dos meios "MVJ" e "LPM" (59 amostras), 3 amostras foram positivas somente no meio "LPM" e 5 somente no "MVJ" (Quadro 7).

Quadro 7 - Número de amostras de alimentos positivas para o gênero *Listeria* e para a espécie *Listeria monocytogenes* nos meios ágar Vogel-Johnson modificado ("MVJ"), ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam ("LPM") e simultaneamente em ambos os meios (número total de amostras contaminadas = 67).

Tipos de Alimentos	Só Meio "MVJ"		Só Meio "LPM"		Ambos os meios	
	<i>Listeria</i>	<i>L.monocytogenes</i>	<i>Listeria</i>	<i>L.monocytogenes</i>	<i>Listeria</i>	<i>L.monocytogenes</i>
Carne Moída	0	9	0	3	20	1
Salsicha	1	9	0	0	16	5
Lingüiça	4	13	0	1	16	2
Queijo Minas Frescal	0	1	2	0	6	1
Leite cru, Tipo B	0	0	1	0	1	0
Total	5	32	3	4	59	9

Com relação à espécie *L. monocytogenes* pode-se notar, pelo mesmo quadro, uma modificação no comportamento dos meios de cultura. A partir dos dois meios, simultaneamente, obteve-se 9 amostras positivas para a espécie, do ágar "LPM" foram 4 amostras positivas e do ágar "MVJ" foram 32 amostras positivas.

Nota-se assim a superioridade do ágar "MVJ" sobre o ágar "LPM", mas cabe ressaltar que mesmo possibilitando a detecção de um menor número de amostras positivas, o ágar "LPM" propiciou o isolamento de *Listeria monocytogenes* a partir de amostras que haviam sido negativas com o outro meio.

Assim, sugerimos que não seja usado somente um meio de isolamento na pesquisa de *L. monocytogenes*, a fim de se evitar a ocorrência de falsos negativos.

Analisando a predominância das várias espécies em cada um dos grupos de alimentos verificou-se, que para a carne e seus derivados, houve um predomínio de *Listeria monocytogenes* (75,4%) e *Listeria innocua* (84,2%) sobre as demais espécies presentes (Quadro 8).

QUADRO 8 - Prevalência das espécies de *Listeria* isoladas entre as amostras de produtos cárneos positivos para o gênero *Listeria*.

Espécie	Carne moída (20)*		Salsicha (17)		Lingüiça (20)		Total (57)	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>L. monocytogenes</i>	13	65,0	14	82,4	16	80,0	43	75,4
<i>L. innocua</i>	19	95,0	12	70,6	17	85,0	48	84,2
<i>L. seeligeri</i>	0	-	1	5,9	0	-	1	1,8
<i>L. welshimeri</i>	0	-	2	11,8	0	-	2	3,5
<i>L. murrayi</i>	1	5,0	0	-	0	-	1	1,8

* = número de amostras positivas para o gênero *Listeria*

L. monocytogenes foi ligeiramente mais freqüente em salsichas e lingüiças que em carne moída (Quadro 8 e Figura 10). Já *L. innocua* foi menos freqüente em salsichas que nos demais produtos. *L. seeligeri* e *L. welshimeri* só foram isoladas a partir de salsichas, enquanto *L. murrayi* foi isolada de somente 1 amostra de carne bovina moída.

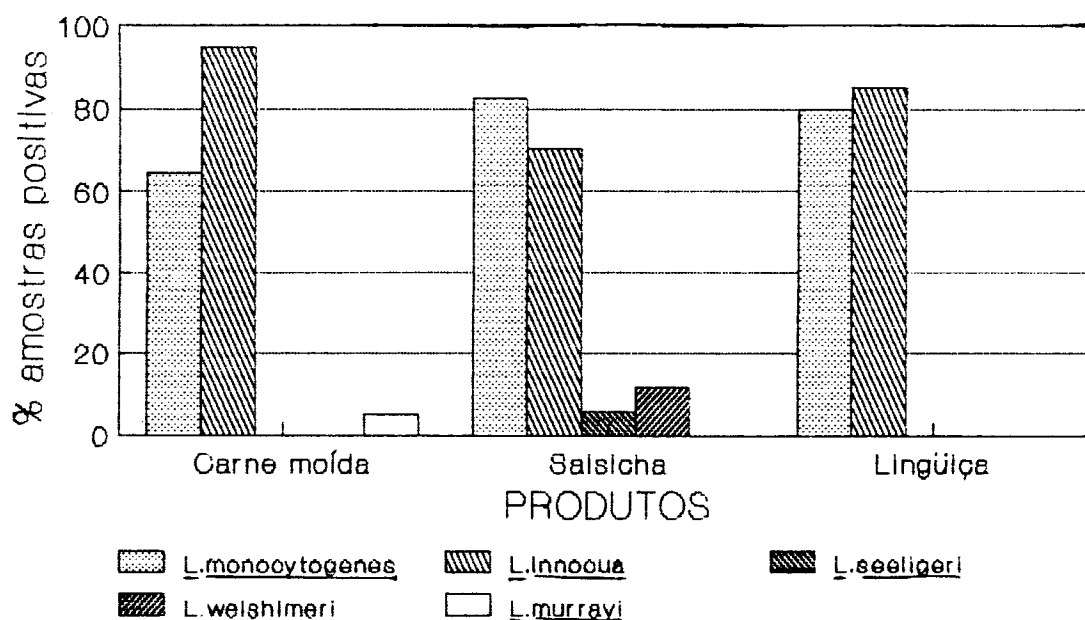


Figura 10. Prevalência das espécies de *Listeria* isoladas a partir das amostras de cada produto cárneo positivo para o gênero *Listeria* (20 amostras de carne moída, 17 de salsicha, 20 de lingüiça).

As salsichas, apesar de apresentarem uma menor frequência do gênero *Listeria* que os demais produtos cárneos (Quadro 4), apresentaram uma alta incidência de *L. monocytogenes* (82,4%) e uma maior variedade de espécies presentes (Figura 10).

Comparando-se os resultados por nós obtidos com os verificados em estudos realizados por outros pesquisadores, verifica-se similaridade. FARBER et alii (1988b) verificaram a presença de *L. monocytogenes* em 93% das amostras de carne moída mista (bovina + suína) e *Listeria* spp em 46,2% dos embutidos fermentados. KARCHES & TEUFEL (1988) estudando carne bovina e carne suína moídas e embutidos tipo "zwiebelmettwurst" encontraram *Listeria* spp em 86,4%; 75,9% e 54,6% e *L. monocytogenes* em 45,8%; 39,7% e 10% respectivamente.

MCCLAIN & LEE (1988) obtiveram 2,4% de amostras de carne bovina moída positivas para *Listeria seeligeri* e 48,8% para *Listeria monocytogenes*; 52,2% das amostras de embutidos de carne de suínos foram positivas para *L. monocytogenes*. SCHMIDT et alii (1988) examinaram carne suína moída e embutidos tipo "mettwurst" encontrando 100% e 96,7% das amostras positivas para *Listeria*. *L. monocytogenes* foi isolada respectivamente de 80 % e 59% das amostras. Outras espécies de *Listeria* (*L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*) também foram isoladas. O número de bactérias presentes foi geralmente inferior a 10 UFC/g.

TRUSCOTT & MCNAB (1988), trabalhando com carne bovina moída, obtiveram 90% das amostras positivas para *Listeria* sendo que 58% delas confirmaram como *L. monocytogenes*.

LEISTNER et alii (1989) relatam a incidência de 100% de *Listeria* e de 80% de *Listeria monocytogenes* em carne suína moída , 93% e 63% em carne bovina moída , 97% e 59% em embutidos frescos e 57% e 17% em salame, respectivamente. O número de bactérias presentes variou entre < 10 e 100 UFC/g.

Outros autores como NICOLAS (1985), BREER & SCHOPFER (1988), CANTONI et alii (1988b), SKOVGAARD & MORGEN (1988) e SKOVGAARD & NØRRUNG (1989) também isolaram *L. monocytogenes* de carnes moídas e produtos cárneos, obtendo valores ligeiramente inferiores aos por nós obtidos.

Desde o abate dos animais até a comercialização dos produtos cárneos já elaborados, diversas são as etapas que podem contribuir para a contaminação destes produtos, como por exemplo a retirada das vísceras, a estocagem das carcaças em câmaras frias, a moagem da carne, a venda a granel dos produtos.

Apesar de serem os produtos cárneos, por nós avaliados, consumidos após cocção, devem-se ainda destacar 3 pontos a serem ponderados: 1- muitas pessoas, principalmente de baixa renda e portanto com o organismo mais debilitado, costumam ingerir salsichas sem cocção prévia; 2 - a penetração de calor no interior do produto (salsicha e lingüiça) é lenta, o que pode levar à não destruição dos microrganismos presentes na região central desses alimentos, mesmo após a cocção ou fritura das camadas mais externas; 3 - existe a

possibilidade de contaminação cruzada através de equipamentos ou utensílios, a nível de revenda ou consumidor.

As carnes, bovina e suína, são assim importante fonte de *Listeria*, apesar de ainda não haverem sido incriminadas em surtos de listeriose.

Quanto aos produtos de laticínios, pode-se verificar no quadro 4 que, somente o leite cru tipo B e o queijo minas frescal possuíam amostras positivas para gênero *Listeria* (respectivamente 10 e 40 %).

O quadro 9 mostra a distribuição das diferentes espécies de *Listeria* isoladas a partir do leite cru tipo B e queijo examinados. Nota-se, para o conjunto deste dois produtos, o predomínio de *L. innocua* (80,0%), sendo que as demais espécies apresentam-se com frequência bem inferior (*L. monocytogenes*, 20,0%; *L. seeligeri* e *L. welshimeri*, 10,0%).

QUADRO 9- Prevalência das espécies de *Listeria* isoladas entre as amostras de leite cru tipo B e de queijo minas frescal positivas para gênero *Listeria*.

Espécie	Leite cru(2)*		Queijo minas(8)		Total(10)	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>L. monocytogenes</i>	0	-	2	25,0	2	20,0
<i>L. innocua</i>	2	100,0	6	75,0	8	80,0
<i>L. seeligeri</i>	0	-	1	12,5	1	10,0
<i>L. welshimeri</i>	0	-	1	12,5	1	10,0

* = número de amostras positivas para gênero *Listeria*

A partir das 2 amostras de leite cru, positivas para *Listeria*, só foi possível constatar a presença de *L. innocua*; já para as 8 amostras de queijo minas frescal, apesar do predomínio de *L. innocua* (75% das amostras) isolou-se também *L. monocytogenes* (25% das amostras), *L. seeligeri* (12,5% das amostras) e *L. welshimeri* (12,5% das amostras) (Quadro 9 e Figura 11).

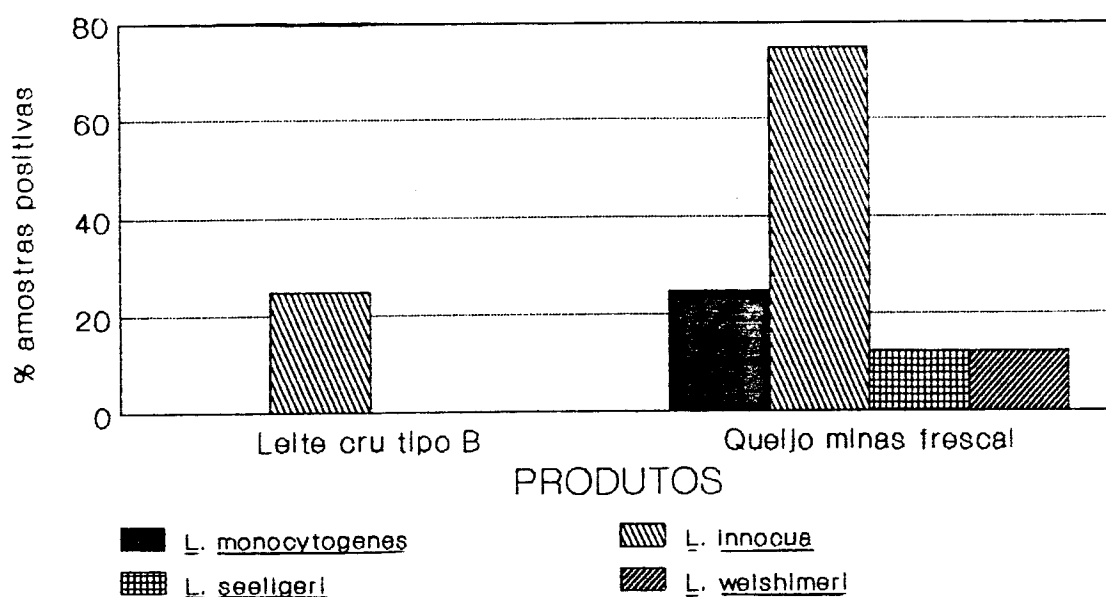


Figura 11. Prevalência das espécies de *Listeria* isoladas a parti das amostras de leite cru tipo B e queijo minas frescal positivas para o gênero *Listeria* (2 amostras de leite e 8 de queijo minas frescal).

Apesar da menor incidência de *Listeria* nos produtos de laticínios que nos produtos cárneos, não podemos menosprezar a importância daquele grupo de alimentos como veículos de listeriose de origem alimentar, principalmente por ser frequentemente associado a surtos da doença (LISTERIOSIS,1986; BANNISTER,1987; WHO,1988; AZADIAN, 1989).

O leite cru tem sido estudado em diversas partes do mundo, sendo as bactérias do gênero *Listeria* isoladas com frequência variável. Na Espanha, DOMINGUEZ RODRIGUEZ e colaboradores (1985) encontraram *L. monocytogenes* em 45% das 95 amostras examinadas; outras espécies encontradas foram *L. innocua* (15,8%), *L. welshimeri* (3,1%) e *L. seeligeri* (1%).

Em pesquisas desenvolvidas nos EUA, a incidência de *L. monocytogenes* varia entre os diversos estados. Durante o surto ocorrido em Massachusetts, HAYES et alii (1986) examinaram 121 amostras de leite cru provenientes das fazendas que o forneciam à usina

suspeita e encontraram *L. monocytogenes* em 12% das amostras. LOVETT et alii (1987b) pesquisaram a presença de *Listeria* em 650 amostras de leite cru provenientes de 3 regiões americanas (Califórnia, Massachusetts e da região de Cincinnati, Ohio) e verificaram que a incidência de *L. monocytogenes* variava de 0 a 7%, com uma ocorrência média de 4,2%; *L. innocua* apresentou incidência média superior (7,7%) e as demais espécies (*L. ivanovii*, *L. welshimeri* e *L. seeligeri*) tiveram incidência inferior a 1%. Estes pesquisadores verificaram também a ocorrência de sazonalidade na distribuição das espécies. No estado de Nebraska, LIEWEN & PLAUTZ (1988) isolaram cepas de *Listeria* a partir de 9% das 200 amostras examinadas, sendo que 4% continham *L. monocytogenes* e 5% *L. innocua*. Já no estado de Vermont, DONNELLY e colaboradores (1988) obtiveram apenas 1,6% de amostras positivas para *L. monocytogenes*, dentre as 939 analisadas.

Numa mesma província canadense, Ontario, 2 grupos de pesquisadores (SLADE et alii, 1988 e FARBER et alii, 1988a) avaliaram a presença de *Listeria* em amostras de leite cru. O primeiro grupo de pesquisadores encontrou 11,4% de amostras positivas para *Listeria* spp, das quais 5,4% continham *L. monocytogenes*, 8,2% *L. innocua* e 0,3% *L. welshimeri*, não sendo observada sazonalidade na distribuição. Já o segundo grupo obteve 12,4% de amostras positivas para *Listeria* spp, estando *L. monocytogenes* presente em 1,3%, *L. innocua* em 9,7% e *L. welshimeri* em 1,3%, e verificou uma diminuição significativa na incidência do microrganismo no inverno.

FENLON & WILSON (1989) estudaram a ocorrência de *L. monocytogenes* em leite cru, proveniente da região nordeste da Escócia, verificando uma baixa incidência do microrganismo (3,8% amostras positivas no verão e 1% no outono) e que, quando presente, o microrganismo encontrava-se em número inferior a 1/ml.

Na Holanda, BECKERS et alii (1987) detectaram *L. monocytogenes* em 6 das 173 amostras de leite cru examinadas (4,4%) e, na Nova Zelândia, STONE (1987) não isolou *L. monocytogenes* a partir de nenhuma das 71 amostras examinadas, mas obteve 14% de amostras positivas para *L. innocua* e 1,4% para *L. welshimeri*.

Com leite pasteurizado, poucos são os trabalhos realizados, cabendo destacar o de FERNANDEZ GARAYZABAL e colaboradores (1986) que isolaram *L. monocytogenes* em 21,4% das 28 amostras de leite pasteurizado examinadas, *L. innocua* em 10,7% e *L. welshimeri* de apenas 1 amostra.

Em nossa pesquisa, verificamos a presença em leite cru somente de *L. innocua* (Quadro 9 e Figura 11), microrganismo este de pouco significado em saúde pública, e a ausência do gênero em leite pasteurizado. Devemos, entretanto, ressaltar que o presente trabalho foi realizado num período curto de tempo, tendo todas as amostras de leite sido colhidas durante o período das águas, quando o animal é mantido nos pastos, não recebendo alimento ensilado. Como é sabido, a silagem de baixa qualidade é um importante veículo de transmissão de *L. monocytogenes* aos animais (GRAY, 1960; FENLON, 1986). Assim sendo, em meados de maio, com o início da seca em nosso país, os animais começam a receber percentagens cada vez maiores de alimento ensilado, o que pode levar a um aumento na incidência de listérias no leite. LOVETT et alii (1987b) verificaram ocorrer durante o inverno nos EUA, um aumento na incidência de *Listeria monocytogenes* em leite cru. Esta sazonalidade parece estar relacionada a modificações na alimentação, no manejo do gado ou a outros fatores desconhecidos que afetariam as relações animal-bactéria e/ou bactéria-ambiente.

A ausência do gênero *Listeria* no leite pasteurizado pode ser atribuída à eficiência da pasteurização, capaz de reduzir o número de células viáveis presentes a níveis não detectáveis.

Os queijos, principalmente do tipo macio como é o caso do nosso minas frescal, são mais susceptíveis a contaminação e crescimento de *L. monocytogenes* que os demais tipos (SIPKA et alii, 1974; RYSER et alii, 1985; TERPLAN et alii, 1986; RYSER & MARTH, 1987b; WHO, 1988).

Muitos autores têm trabalhado com a pesquisa de *Listeria* em queijos macios e em queijos em geral (COMI et alii, 1987; BECKERS et alii, 1987; FARBER et alii, 1987; CANTONI et alii, 1988a,b; PINI & GILBERT, 1988a) tendo verificado que a incidência do gênero *Listeria* variou entre 0 e 33%. Diversas vezes os tipos de queijo examinados pelos pesquisadores, não são identificados, sendo apenas referidos como "queijos macios". Outras vezes, quando o são, nota-se serem queijos com características bem diferentes do nosso queijo minas frescal. Assim, achamos difícil e de pouca utilidade a comparação entre as espécies do gênero *Listeria* por nós encontradas com os trabalhos de outros autores.

Pesquisas realizadas na Alemanha (TERPLAN, 1986), Suíça e França (WHO, 1988) demonstram não haver diferença significativa entre a incidência de *Listeria* em queijos feitos com leite cru ou pasteurizado, pois com a acidificação do coalho, o microrganismo

tende a desaparecer. SHAACK & MARTH (1988a) verificaram que o crescimento de *Listeria monocytogenes*, em presença de *Streptococcus lactis* e *S. cremoris*, cessa quando o pH é inferior a 4,75.

As principais fontes de contaminação seriam então as etapas de manufatura e manuseio e a própria planta processadora. CANTONI et alii (1988a) verificaram que 9% das mesas de madeira dos locais de preparo dos queijos apresentaram *L. monocytogenes*. Os mesmos autores, numa outra avaliação (CANTONI et alii, 1988b), encontraram o microrganismo em 12,5% das superfícies e dos equipamentos de plantas processadoras. A higienização adequada do local, dos equipamentos e utensílios é de fundamental importância para a diminuição da incidência do microrganismo (COLEMAN, 1986; SURAK & BAREFOOT, 1987).

Um levantamento dos pontos críticos das usinas processadoras e o controle periódico destes pontos pode ser de grande valia na proteção do leite e de seus derivados por estes patógenos.

5. CONCLUSÕES

De acordo com as condições experimentais empregadas em nosso trabalho e baseados na discussão desenvolvida podemos concluir que:

- Para identificação presuntiva do gênero *Listeria* em carne moída e leite, artificialmente contaminados, o ágar McBride modificado ("MLA") foi menos eficiente que o ágar Vogel-Johnson modificado ("MVJ") e que o ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam ("LPM"). O tempo ótimo de incubação das placas, de todos os meios estudados, foi de 48 horas.

- A metodologia usada em nosso trabalho, foi bastante eficiente para o estudo da contaminação, por listérias, de alguns alimentos recolhidos no comércio; mas o plaqueamento da amostra após 3-4 horas de incubação em meio de enriquecimento LEB 1 (caldo A) foi ineficiente.

- O tratamento da amostra com KOH é bastante efetivo, levando á redução da microbiota acompanhante.

- A utilização do Teste Camp como critério de identificação final de *Listeria monocytogenes* precisa ser reavaliada, por ser ele um teste trabalhoso e com resultados imprecisos.

- Das 140 amostras de alimentos examinadas, 67 (47,9%) revelaram-se positivas para as espécies de *Listeria*, e destas, 45 (67,2%) apresentaram *Listeria monocytogenes*. Todas as amostras de leite pasteurizado tipos B e C foram negativas para o gênero.

- Dentre as 218 cepas do gênero *Listeria* isoladas, 144 (66%) eram de *Listeria innocua*; 67 (30,7%) de *Listeria monocytogenes*; 3 (1,4%) de *Listeria seeligeri*; 3 (1,4%) de *Listeria welshimeri* e 1 (0,5%) de *Listeria murrayi*.

- Das amostras de alimentos positivas para gênero *Listeria*, 29 (43,3%) estavam contaminadas com somente 1 espécie, enquanto 38 (56,7%) apresentavam 2 ou mais espécies.

- A modificação da metodologia, por nós proposta, com a utilização do meio "MVJ" simultaneamente ao "LPM", mostrou-se muito útil, pois o uso concomitante de dois meios permitiu o isolamento de maior número de cepas de *Listeria monocytogenes*, já que houve cepas que somente se desenvolveram num dos meios.

- O meio "MVJ" propiciou o isolamento de maior número de cepas de *Listeria monocytogenes*.

- Os produtos cárneos apresentaram maiores índices de contaminação por *Listeria* spp (95% das amostras), havendo predomínio de amostras possuidoras de mais de uma espécie.

- *L. monocytogenes* foi isolada a partir de 75,4% das amostras de produtos cárneos positivas para o gênero e *L. innocua* a partir de 84,2%.

- As amostras de leites e queijo apresentaram um menor índice de contaminação por *Listeria* spp (12,5% do total de amostras examinadas), havendo predomínio de uma só espécie por amostra.

- *L. monocytogenes* foi isolada a partir de 20% das amostras de produtos lácteos positivas para o gênero e *L. innocua* a partir de 80%.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

001. AZADIAN, B.S.; FINNERTY, G.T.; PEARSON, A.D. Cheese-borne *Listeria* meningitis in immunocompetent patient. **Lancet** 1(8633):322-323, 1989.
002. BAILEY, J.S.; FLETCHER, D.L.; COX, N.A. Recovery and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* from broiler chickens in the southeastern United States. **J. Food Prot.** 52(3):148-150, 1989.
003. BANNISTER, B.A. *Listeria monocytogenes* meningitis associated with eating soft cheese. **J. Infect.** 15:165-168, 1987.
004. BEARNS, R.E. & GIRARD, K.F. The effect of pasteurization on *Listeria monocytogenes*. **Can. J. Microbiol.** 4:55-61, 1958.
005. BECKERS, H.J.; SOENTORO, P.S.S.; DELFGOU-van ASCH, E.H.M. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses and raw milk and its resistance to heat. **Int. J. Food Microbiol.** 4:249-256, 1987.
006. BRACKETT, R.E. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. **Food Technol.** 42(4):162-164,178, 1988.
007. BRACKETT, R.E. & BEUCHAT, L.R. Methods and media for the isolation and cultivation of *Listeria monocytogenes* from various foods. **Int. J. Food Microbiol.** 8(3):219-223, 1989.
008. BRADSHAW, J.G.; PEELER, J.T.; CORWIN, J.J.; HUNT, J.M.; TIERNEY, J.T.; LARKIN, E.P.; TWEDT, R.M. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in milk. **J. Food Prot.** 48(9):743-745, 1985.
009. BRADSHAW, J.G.; PEELER, J.T.; CORWIN, J.J.; HUNT, J.M.; TWEDT, R.M. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in dairy products. **J. Food Prot.** 50(7):543-544,546, 1987.
010. BREER, C. & SCHOPFER, K. *Listeria* and food. **Lancet** 2(8618):1022, 1988.
011. BRYAN, F.L. Infections and intoxications caused by other bacteria. In: RIEMANN, H.R. & BRYAN, F.L. eds. **Food-borne infections and intoxications**. 2.ed. New York, Academic Press, 1979. p.266-267.
012. BUCHANAN, R.L.; STAHL, H.G.; ARCHER, D.L. Improved plating media for simplified, quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in foods. **Food Microbiol.** 4:269-275, 1987.

013. BUCHANAN, R.L.; STAHL, H.G.; BENCIVENGO, M.M.; CORRAL, F.
Comparison of lithium-chloride-phenylethanol-moxalactam and modified
Vogel-Johnson agars for detection of *Listeria* spp in retail level meats, poultry
and seafood. **Appl. Environ. Microbiol.** 55(3):599-603, 1989.
014. BUNNING, V.K.; CRAWFORD, R.G.; BRADSHAW, J.G.; PEELER, J.T.;
TIERNEY, J.T.; TWEDT, R.M. Thermal resistance of intracellular *Listeria*
monocytogenes cells suspended in raw bovine milk. **Appl. Environ.**
Microbiol. 52(6):1398-1402, 1986.
015. BUNNING, V.K.; DONNELLY, C.W.; PEELER, J.T.; BRIGGS, E.H.;
BRADSHAW, J.G.; CRAWFORD, R.G.; BELIVEAU, C.M.; TIERNEY, J.T.
Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* within bovine milk
phagocytes. **Appl. Environ. Microbiol.** 54(2):364-370, 1988.
016. CAMPBELL, D.M. Listeriosis in Scotland, 1988. **Lancet** 1(8636):492, 1989.
017. CANADA. Health and Welfare. Listeriosis in Nova Scotia, 1981. **Can. Dis. Wkly.**
Rep. 7(35):173-175, 1981a.
018. CANADA. Health and Welfare. Listeriosis - Atlantic Provinces. **Can. Dis. Wkly.**
Rep. 7(52):257-263, 1981b.
019. CANTONI, C.; COMI, G.; VALENTI, M. Attualità su *Listeria monocytogenes* nei
formaggi. **Ind. Aliment.** 27(258):266-268, 1988a.
020. CANTONI, C.; VALENTI, M.; COMI, G. *Listeria* in formaggi e in salumi. **Ind.**
Aliment. 27(264):859-861, 1988b.
021. CARPENTER, S.L. & HARRISON, M.A. Survival of *Listeria monocytogenes* on
processed poultry. **J. Food Sci.** 54(3):556-557, 1989.
022. CASSIDAY, P.K.; BRAKETT, R.E.; BEUCHAT, L.R. Evaluation of ten selective
direct plating media for enumeration of *Listeria monocytogenes* in hams and
oysters. **Food Microbiol.** 6:113-125, 1989.
023. CENTERS FOR DISEASE CONTROL (USA). Listeriosis outbreak associated with
mexican-style cheese - California. **Morbid. Mortal. Wkly. Rep.** 34(24):357-
359, 1985.
024. CENTERS FOR DISEASE CONTROL (USA). Listeriosis associated with
consumption of turkey franks. **Morbid. Mortal. Wkly. Rep.** 38(15):267-
268, 1989.

025. CHOI, H.K.; SCHAACK, M.M.; MARTH, E.W. Survival of *Listeria monocytogenes* in cultured buttermilk and yogurt. *Milchwissenschaft* 43(12):790-792, 1988.
026. COLEMAN, W.W. Controlling listeria hysteria in your plant. *Dairy Food Sanitat.* 6(12):555-557, 1986.
027. COMI, G. & CANTONI, C. *Listeria* in polli macellati. *Ind. Aliment.* 24(227):521-525, 1985.
028. COMI, G. ; CANTONI, C.; d'AUBERT, S. Indagine sulla presenza di *Listeria monocytogenes* nei formaggi. *Ind. Aliment.* 26(247):216-218, 1987.
029. COMI, G. & CANTONI, C. Alcuni aspetti della presenza di *Listeria monocytogenes* nei formaggi. *Ind. Aliment.* 27(257):104-106, 1988.
030. CONNER, D.E.; BRACKETT, R.E.; BEUCHAT, L.R. Effect of temperature, sodium chloride, and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. *Appl. Environ. Microbiol.* 52(1):59-63, 1986.
031. COTTIN, J.; GENTHON, H.; BIZON, C.; CARBONELLI, B. *Listeria monocytogenes* in meat from 514 cattle. *Sci. Aliments* 5(Hors series IV):145-149, 1985.
032. COX, L.J.; KLEISS, T.; CORDIER, J.L.; CORDELLANA, C.; KONKEL, P.; PEDRAZZINI, C.; BEUMER, R.; SIEBENGA, A. *Listeria* spp in food processing, non food and domestic environments. *Food Microbiol.* 6:49-61, 1989.
033. CURTIS, G.D.W.; MITCHELL, R.G.; KING, A.F.; GRIFFIN, E.J. A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 8:95-98, 1989.
034. DAVIES, J.W.; EWAN, E.P.; VARUGHESE, P.; ACRES, S.E. *Listeria monocytogenes* infections in Canada. *Clin. Invest. Med.* 7(4):315--320, 1984.
035. DIJKSTRA, R.G. Het voorkomen van *Listeria monocytogenes* in darminhoud van mestkuikens. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 103(4): 229-231, 1978.
036. DOMINGUEZ RODRIGUEZ, L.; SUAREZ FERNANDEZ, G.; GARAYZABAL, J.F.F.; RODRIGUEZ FERRI, E. New methodology for the isolation of *Listeria* microorganisms from heavily contaminated environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 47(5):1188-1190, 1984.

037. DOMINGUEZ RODRIGUEZ, L.; FERNANDEZ GARAYZABAL, J.F.;
VASQUEZ BOLAND, J.A.; RODRIGUEZ FERRI, E.; SUAREZ
FERNANDEZ, G. Isolation de micro-organismes du genre *Listeria* à partir de
la lait cru destiné à la consommation humaine. **Can. J. Microbiol.** 31(10):938-
941, 1985.
038. DOMINGUEZ RODRIGUEZ, L.; FERNANDEZ GARAYZABAL, J.F.;
VASQUEZ BOLAND, J.A.; BLANCO, J.L.; SUAREZ, G. Fate of *Listeria*
monocytogenes during manufacture and ripening and semi-hard cheese. **Lett.**
Appl. Microbiol. 4(6):125-127, 1987.
039. DONNELLY, C.W. & BRIGGS, E.H. Psychrotrophic growth and thermal
inactivation of *Listeria monocytogenes* as a function of milk composition. **J.**
Food Prot. 49(12):994-998, 1986.
040. DONNELLY, C.W.; BRIGGS, E.H.; DONNELLY, L.S. Comparison of heat
resistance of *Listeria monocytogenes* in milk as determined by two methods. **J.**
Food Prot. 50(1):14-17, 1987.
041. DONNELLY, C.W.; BAIGENT, G.J.; BRIGGS, E.H. Flow cytometric for automated
analysis of milk containing *Listeria monocytogenes*. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**
71(3):655-658, 1988.
042. DOYLE, M.P.; MESKE, L.M.; MARTH, E.H. Survival of *Listeria monocytogenes*
during the manufacture and storage of nonfat dry milk. **J. Food**
Prot. 48(9):740-742, 1985.
043. DOYLE, M.P. & SCHOENI, J.L. Selective enrichment procedure for isolation of
Listeria monocytogenes from fecal and biologic specimens. **Appl. Environ.**
Microbiol. 51(5):1127-1129, 1986.
044. DOYLE, M.P.; GLASS, K.A.; BEERY, J.T.; GARCIA, G.A.; POLLARD, D.J.;
SCHULTZ, R.D. Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high-
temperature, short-time pasteurization. **Appl. Environ. Microbiol.** 53(7):1433-
1438, 1987.
045. DOYLE, M.P. Effect of environmental and processing conditions on *Listeria*
monocytogenes. **Food Technol.** 42(4):169-171, 1988.
046. DURST, J. & BERENCSI, G. Data about listeriosis in Hungary. In: WOODBINE,
M.ed. **Problems of listeriosis**. Leicester, Leicester University
Press, 1975. p.106-111. [Proc. Int. Symp. 6. sept 1974].

047. EL-SHENAWY, M.A. & MARTH, E.H. Sodium benzoate inhibits growth of or inactivates *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.** 51(7):525-530, 1988a.
048. EL-SHENAWY, M.A. & MARTH, E.H. Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* by sorbic acid. **J. Food Prot.** 51(11):842-847, 1988b.
049. EL-SHENAWY, M.A. & MARTH, E.H. Behavior of *Listeria monocytogenes* in the presence of sodium propionate. **Int. J. Food Microbiol.** 8(1):85-94, 1989.
050. FARBER, J.M.; JOHNSTON, M.A.; PURVIS, U.; LOITT, A. Surveillance of soft and semi-soft cheeses for the presence of *Listeria* spp. **Int. J. Food Microbiol.** 5(2):157-163, 1987.
051. FARBER, J.M.; SANDERS, G.W.; MALCOLM, S.A. The presence of *Listeria* spp in raw milk in Ontario. **Can. J. Microbiol.** 34(2):95-100, 1988a.
052. FARBER, J.M.; SANDERS, G.W.; SPEIRS, J.I. Methodology for isolation of *Listeria* from foods - a Canadian perspective. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 71(3):675-678, 1988b.
053. FARBER, J.M.; SANDERS, G.W.; SPEIRS, J.I.; D'AOUST, J.Y.; EMMONS, D.B.; MCKELLAR, R. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in inoculated and naturally contaminated raw milk. **Int. J. Food Microbiol.** 7(4):277-286, 1988c.
054. FARBER, J.M.; TITTIGER, F.; GOUR, L. Surveillance of raw-fermented (dry-cured) saussages for the presence of *Listeria* spp. **Can. Inst. Food Sci. Technol. J.** 21(4):430-434, 1988d.
055. FDA is investigating deaths linked to mexican-style cheese. **Food Chem. News** 17 jun:42, 1985.
056. FENLON, D.R. Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. **J. Appl. Bacteriol.** 59:537-543, 1985.
057. FENLON, D.R. Rapid quantitative assessment of the distribution of *Listeria* in silage implicated in a suspected outbreak of listeriosis in calves. **Vet. Rec.** 118(9):240-242, 1986.
058. FENLON, D.R. & WILSON, J. The incidence of *Listeria monocytogenes* in raw milk from farm bulk tanks in north-east Scotland. **J. Appl. Bacteriol.** 66(3):191-196, 1989.

059. FERNANDEZ GARAYZABAL, J.F.; DOMINGUEZ RODRIGUEZ, L.;
VASQUEZ BOLAND, J.A.; BLANCO CANCELO, J.L.; SUAREZ
FERNANDEZ, G. *Listeria monocytogenes* dans le lait pasteurisé. **Can. J. Microbiol.** 32(2):149-150, 1986.
060. FERNANDEZ GARAYZABAL, J.F.; DOMINGUEZ RODRIGUEZ, L.;
VASQUEZ BOLAND, J.A.; RODRIGUEZ FERRI, E.F.; BRIONES
DIESTE, V.; BLANCO CANCELO, J.L.; SUAREZ FERNANDEZ, G.
Survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk treated in a pilot plant size
pasteurizer. **J. Appl. Bacteriol.** 63(6):533-537, 1987.
061. FLEMING, D.W.; COCHI, S.L.; MAC DONALD, K.L.; BRONDUM, J.; HAYES,
P.S.; PLIKAYTIS, B.D.; HOLMES, M.B.; AUDURIER, A.; BROOME, C.V.;
REINGOLD, A.L. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of
listeriosis. **N. Engl. J. Med.** 312(7):404-407, 1985.
062. FLORIDA studies show USDA listeria method superior to FDA method. **Food Chem. News** 12 oct:4, 1987.
063. FRASER, J.A. & SPERBER, W.H. Rapid detection of *Listeria* spp in food and
environmental samples by esculin hydrolysis. **J. Food Prot.** 51(10):762-
765, 1988.
064. GEORGE, S.M.; LUND, B.M.; BROCKLEHURST, T.F. The effect of pH and
temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*. **Lett. Appl. Microbiol.** 6(6):153-156, 1988.
065. GEVENICH, H.H.; MUELLER, H.E.; SCHRETTEN-BRUNNER, A.; SEELIGER,
H.P.R. The occurrence of different *Listeria* species in municipal waste
water. **Zentralbl. Bakteriolog. Hyg. Abt. B.** 81(6):563-565, 1985.
066. GILBERT, R.J. & PINI, P.N. Listeriosis and food-borne
transmission. **Lancet** 1(8583):472-473, 1988.
067. GILBERT, R.J.; MILLER, K.L.; ROBERTS, D. *Listeria monocytogenes* and chilled
foods. **Lancet** 1(8634):383-384, 1989.
068. GITTER, M. *Listeria monocytogenes* in "oven ready" poultry. **Vet. Rec.** 99(17):336, 1976.
069. GLASS, K.A. & DOYLE, M.P. Fate and thermal inactivation of *Listeria*
monocytogenes in beaker sausage and peperoni. **J. Food Prot.** 52(4):226-
231, 1989.

070. GOLDEN, D.A.; BEUCHAT, L.R.; BRACKETT, R.E. Direct plating technique for enumeration of *Listeria monocytogenes* in food. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 71(3):647-650, 1988a.
071. GOLDEN, D.A.; BEUCHAT, L.R.; BRACKETT, R.E. Evaluation of selective direct plating media for their suitability to recover uninjured, heat-injured, and freeze injured *Listeria monocytogenes* from foods. **Appl. Environ. Microbiol.** 54(6):1451-1456, 1988b.
072. GOUET, P.; LABADIE, J.; SERRATORE, C. Development of *Listeria monocytogenes* in monoxenic and polyxenic beef minces. **Zentralbl. Bakteriол. Hyg. Abt. 1.** 166(1):87-94, 1978.
073. GRAU, F.H. & VANDERLINDE, P.B. Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum packaged beef. In: **International congress of meat science and technology**, 34. Brisbane, Australia. 1988. **Proceedings. Part B.** p.518-519.
074. GRAY, M.L. Silage feeding and listeriosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 136:205-208, 1960.
075. GRAY, M.L. & KILLINGER, A.H. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. **Bacteriol. Rev.** 30(2):309-382, 1966.
076. GREGORIO, S.B. & EVELAND, W.C. Isolation of *Listeria monocytogenes* from inapparent sources in Michigan. In: WOODBINE, M.ed. **Problems of listeriosis.** Leicester, Leicester University Press, 1975. p.87-93. [Proc. Int. Symp. 6. sept 1974].
077. HAO, D.Y.Y.; BEUCHAT, L.R.; BRACKETT, R.E. Comparison of media and methods for detecting and enumerating *Listeria monocytogenes* in refrigerated cabbage. **Appl. Environ. Microbiol.** 53(5):955-957, 1987.
078. HARRIS, L.J.; DAESCHEL, M.A.; STILES, M.E.; KLAENHAMMER, T.R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.** 52(6):3784-3787, 1989.
079. HARRISON, M.A. & CARPENTER, S.L. Survival of large populations of *Listeria monocytogenes* on chicken breasts processed using moist heat. **J. Food Prot.** 52(6):376-378, 1989.
080. HARTMANN, U.; FRIEDRICH, K.; BEYER, F.; TERPLAN, G. (Improved identification of *Listeria* through a moxalactam-containing medium). **Dtsch. Molk. Ztg.** 109(38):1164-1166, 1988.

081. HAYES, P.S.; FEELEY, J.C.; GRAVES, L.M.; AJELLO, G.W.; FLEMING, D.W.
Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**(2):438-440, 1986.
082. HEISICK, J.E.; HARREL, F.M.; PETERSON, E.H.; MCLAUGHLIN, S.;
WAGNER, D.E.; WESLEY, I.V.; BRYNER, J. Comparison of four
procedures to detect *Listeria* spp in foods. *J. Food Prot.* **52**(3):154-157, 1989a.
083. HEISICK, J.E.; WAGNER, D.E.; NIERMAN, M.L.; PEELER, J.T. *Listeria* spp found
on fresh market produce. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(8):1925-1927, 1989b.
084. HIRD, D.W. Review of evidence for zoonotic listeriosis. *J. Food Prot.* **50**(5):429-
433, 1987.
085. HO, J.L.; SHANDS, K.N.; FRIEDLAND, G.; ECKIND, P.; FARSEER, D.W. An
outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infections involving patients from
eight Boston hospitals. *Arch. Int. Med.* **146**:520-524, 1986.
086. HOFER, E. Pesquisa sobre a ocorrência de *Listeria monocytogenes* em fezes
humanas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **8**(2):110-116, sd.
087. HOFER, E. Estudo epidemiológico da ocorrência de portadores de *Listeria*
monocytogenes entre operários de matadouros e indivíduos com distúrbios
entéricos. Rio de Janeiro, 1974. 114p. [Tese de Livre Docência Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro].
088. HOFER, E. Pesquisa de *Listeria* spp em vegetal consumido pelo homem. In:
Congresso Brasileiro de Microbiologia, 6. Salvador, Bahia, 1975a.
Anais p.192.
089. HOFER, E. Isolamento e caracterização de *Listeria monocytogenes* em água de
esgoto. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **73**(1/2):31-38, 1975b.
090. HOFER, E. Bacteriologic and epidemiologic studies on the occurrence of *Listeria*
monocytogenes in healthy cattles. *Zentralbl. Bakteriол. Hyg. Abt. A.* **256**:175-
183, 1983.
091. HOFER, E. & PÓVOA, M.M. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em solos. *Mem.*
Inst. Oswaldo Cruz **79**(1):45-53, 1984.

092. HOHNE, K.; LOOSE, B.; SEELIGER, H.P.R. Recent findings of *Listeria monocytogenes* in slaughter animals of Togo (West Africa). In: WOODBINE, M.ed. **Problems of listeriosis**. Leicester, Leicester University Press, 1975. p.127-130. [Proc. Int. Symp. 6. sept 1974].
093. HOOVER, D.G.; WALSH, P.M.; KOLAETIS, K.M.; DALY, M.M. A bacteriocin produced by *Pediococcus* species associated with a 5,5-megadalton plasmid. **J. Food Prot.** 51(1):29-31, 1988.
094. HUGHEY, V.L.; WILGER, P.A. ; JOHNSON, E.A. Antibacterial activity of hen egg white lysosyme against *Listeria monocytogenes* Scott A in foods. **Appl. Environ. Microbiol.** 55(3):631-638, 1989.
095. JOHNSON, J.L.; DOYLE, M.P.; CASSENS, R.G.; SCHOENI, J.L. Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimentally infected cattle and in hard salami. **Appl. Environ. Microbiol.** 54(2):497-501, 1988a.
096. JOHNSON, J.L.; DOYLE, M.P.; CASSENS, R.G. Survival of *Listeria monocytogenes* in ground beef. **Int. J. Food Microbiol.** 6(3):243-247, 1988b.
097. JUNTILA, J.; HIRN, J.; HILL, P.; NURMI, E. Effect of different levels of nitrite and nitrate on the survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of fermented sausage. **J. Food Prot.** 52(3):158-161, 1989.
098. KACZMARSKI, E.B. & JONES, D.M. Listeriosis and ready-cooked chicken. **Lancet** 1(8637):549, 1989.
099. KAMPELMACHER, E.H. & NOORLE-JANSEN, L.M. Further studies on the isolation of *Listeria monocytogenes* in clinically healthy individuals. **Zentralbl. Bakteriol. Hyg. Abt 1. Orig.A.** 221:70-77, 1972.
100. KAMPELMACHER, E.H. & NOORLE-JANSEN, L.M. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in effluents. In: WOODBINE, M.ed. **Problems of listeriosis**. Leicester, Leicester University Press, 1975. p.66-70. [Proc. Int. Symp. 6. sept 1974].
101. KAMPELMACHER, E.H.; MASS, D.E.; NOORLE JANSEN, L.M. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in feces of pregnant women with and without direct animal contact. **Zentralbl. Bakteriol. Hyg. Abt.1. Orig. A.** 234:238-242, 1976.
102. KARAIOANNOGLOU, P.G. & XENOS, G.C. Survival of *Listeria monocytogenes* in meatballs. **Hell. Kteniatri.** 23(3):111-118, 1980.

103. KARCHES, H. & TEUFEL, P. (*Listeria monocytogenes*. Its occurrence in minced meat and behaviour in fresh zwiebelmettwurst sausage). *Fleischwirtschaft* 68(11):1388-1392,1420, 1988.
104. KERR, K.; DEALLER, S.F.; LANCEY, R.W. *Listeria* in cook-chill food. *Lancet* 2(8601):37-38, 1988a.
105. KERR, K.; DEALLER, S.F.; LANCEY, R.W. Materno-fetal listeriosis from cook-chill and refrigerated food. *Lancet* 2(8620):1133, 1988b.
106. KHAN, M.A.; NEWTON, I.A.; SEAMAN, A.; WOODBINE, M. The survival of *Listeria monocytogenes* inside and outside its host. In: WOODBINE, M.ed. **Problems of listeriosis**. Leicester, Leicester University Press, 1975. p.75-85. [Proc. Int. Symp. 6. sept 1974].
107. KVENBERG, J.E. Outbreaks of listeriosis/ *Listeria* contaminated foods. *Microbiol. Sci.* 5(12):355-358, 1988.
108. KWANTES, W. & ISSAC, M. *Listeria* infection in West Glamorgan. In: WOODBINE, M.ed. **Problems of listeriosis**. Leicester, Leicester University Press, 1975. p.112-114. [Proc. Int. Symp. 6. sept 1974].
109. LEE, W,H, & MCCLAIN, D. Improved *Listeria monocytogenes* selective agar. *Appl. Environ. Microbiol.* 52(5):1215-1217, 1986.
110. LEISTNER, L.; SCHMIDT, U.; KAYA, M. *Listerien* bei fleisch und fleischerzeugnissen. *Mitteilungsbl. Bundesanst. Fleischforsch.* Kulmbach, 28(104):192-199, 1989.
111. LENNON, D.; LEWIS, B.; MANTELL, C.; BECROFT, D.; DOVE, B.; FARMER, K.; TONKIN, S.; YEATES, N.; STAMP, R.; MICKLESON, K. Epidemic perinatal listeriosis. *Pediatr. Infect. Dis.* 3:30-34, 1984.
112. LIEWEN, M.B. & PLAUTZ, M.W. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Nebraska. *J. Food Prot.* 51(11):840-841, 1988.
113. LISTERIOSIS transmitted by contaminated Jalisco-brand cheese. *J. Food Prot.* 49(4):311, 1986.
114. LOESSNER, M.J.; BELL, R.H.; JAY, J.M.; SHELEF, L.A. Comparison of seven plating media for enumeration of *Listeria* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(12):3003-3007, 1988.

115. LOVETT, J. *Listeria* isolation. In: USA. United States Department of Health, Education and Welfare. Food and Drug Administration. **Bacteriological analytical manual**. 6.ed. Washington, DC, 1984. Supl. 9, 1987a.
116. LOVETT, J.; FRANCIS, D.W.; HUNT, J.M. *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence and pathogenicity. **J. Food Prot.** 50(3):188-192, 1987b.
117. LOVETT, J. & TWEDT, R.M. *Listeria*. **Food Technol.** 42(4):188-191, 1988.
118. LUND, B.M.; KNOX, M.R.; COLE, M.B. Destruction of *Listeria monocytogenes* during microwave cooking. **Lancet** 1(8631):218, 1989.
119. MANEV, C.; YANAKIEVA, M.; IVANOVA, E.; SLAVOVA, R.; KIROV, R.; PLANSKI, G. Healthy bulgarians as *Listeria* carriers. In: WOODBINE, M.ed. **Problems of listeriosis**. Leicester, Leicester University Press, 1975. p.84-86. [Proc. Int. Symp. 6. sept 1974].
120. MARSHALL, D.L. & SCHMIDT, R.H. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in milk preincubated with selected pseudomonads. **J. Food Prot.** 51(4):277-282, 1988.
121. MARTH, E.H. Disease characteristics of *Listeria monocytogenes*. **Food Technol.** 42(4):165-168, 1988.
122. MAUPAS, P.; BIND, J.L.; CHIRON, J.P.; DARCHIS, J.P. Epidemiologic and pathogenic conception of animal and human listeriosis. In: WOODBINE, M.ed. **Problems of listeriosis**. Leicester, Leicester University Press, 1975. p.221-223. [Proc. Int. Symp. 6. sept 1974].
123. MCCLAIN, D. & LEE, W.H. Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 71(3):660-664, 1988.
124. MCCLAIN, D. & LEE, W.H. FSIS method for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from processed meat and poultry products. Beltsville, USDA/F SIS. Microbiology Division, 1989. 12p. [Laboratory Communication nº 57].
125. MCLAUCHLIN, J. *Listeria monocytogenes* recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. **J. Appl. Bacteriol.** 63(1):1-12, 1987.
126. MEAT industry research shows *Listeria* widespread control difficult. **Food Chem. News** 29 jun:27-28, 1987.

127. MESSINA, M.C.; AHMAD, H.A.; MARCHELLO, J.A.; GERBA, C.P.; PAQUETTE, M.W. The effect of liquid smoke on *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.** 51(8):629-631, 1988.
128. NICOLAS, J.A. Contamination of meat and meat products with *Listeria monocytogenes* in Haute-Vienne, France. **Sci. Aliments.** 5(Hors Series IV):175-179, 1985.
129. OBIGER, G. Studies on the thermostability of the main infectious agents under the conditions of pasteurization. **Arch. Lebensmittelhyg.** 27(4):137-144, 1976.
130. OLSEN, J.A.; YOUSEF, A.E.; MARTH, E.H. Growth and survival of *Listeria monocytogenes* during making and storage of butter. **Milcheissenschaft** 43(8):487-489, 1988.
131. PINI, P.N. & GILBERT, R.J. The occurrence in the UK of *Listeria* species in raw chicken and soft cheeses. **Int. J. Food Microbiol.** 6(4):317-326, 1988a.
132. PINI, P.N. & GILBERT, R.J. A comparison of two procedures for the isolation of *Listeria monocytogenes* from raw chicken and soft cheeses. **Int. J. Food Microbiol.** 7(4):331-337, 1988b.
133. PRENTICE, G.A. & NEAVES, P. *Listeria monocytogenes* in food: its significance and methods for its detection. **Bull. Fed. Int. Lait.** n°223, 1988. 31p.
134. RACCACH, M.; MCGRATH, R.; DAFTARIAN, H. Antibiosis of some latic acid bacteria including *Lactobacillus acidophilus* toward *Listeria monocytogenes*. **Int. J. Food Microbiol.** 9(1):25-32, 1989.
135. RALOVICH, B. Selective and enrichment media to isolate *Listeria*. In: WOODBINE, M.ed. **Problems of listeriosis**. Leicester, Leicester University Press, 1975. p.86-288. [Proc. Int. Symp. 6. sept 1974].
136. RALOVICH, B. Data on the enrichment and selective cultivation of listeriae. **Int. J. Food Microbiol.** 8(3):205-217, 1989.
137. RECENT products recalls and *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.** 49(9):755-756, 1986.
138. REY, L. **Planejar e redigir trabalhos científicos**. São Paulo, E. Blucher. 1987. 240p.
139. ROSENOW, E.M. & MARTH, E.H. Growth of *Listeria monocytogenes* in skin, whole and chocolate milk, and in whipping cream during incubation at 4, 8, 13, 21 and 35°C. **J. Food Prot.** 50(6):452-459, 1987a.

140. ROSENOW, E.M. & MARTH, E.H. Addition of cocoa powder, cane sugar and carrageenan to milk to enhances growth of *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.** 50(9):726-729, 1987b.
141. RYSER, E.T.; MARTH, E.H.; DOYLE, M.P. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture and storage of cottage cheese. **J. Food Prot.** 48(9):746-750, 1985.
142. RYSER, E.T. & MARTH, E.H. Behavior of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of cheddar cheese. **J. Food Prot.** 50(1):7-13, 1987a.
143. RYSER, E.T. & MARTH, E.H. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of camembert cheese. **J. Food Prot.** 50(5):372-378, 1987b.
144. RYSER, E.T. & MARTH, E.H. Behavior of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of brick cheese. **J. Dairy Sci.** 72:838-853, 1989.
145. RYSER, E.T. & MARTH, E.H. Behavior of *Listeria monocytogenes* in skim milk during fermentation with mesophilic lactic starter cultures. **J. Food Prot.** 51(8):600-606, 1988a.
146. SCHAACK, M.M. & MARTH, E.M. Behavior of *Listeria monocytogenes* in skim milk during fermentation with mesophilic lactic starter cultures. **J. Food Prot.** 51(8):600-606, 1988a.
147. SCHAACK, M.M. & MARTH, E.M. Behavior of *Listeria monocytogenes* in skim milk and in yogurt mix during fermentation by thermophilic lactic acid bacteria. **J. Food Prot.** 51(8):607-614, 1988b.
148. SCHAACK, M.M. & MARTH, E.M. Survival of *Listeria monocytogenes* in refrigerated cultured milks and yogurt. **J. Food Prot.** 51(11):848-852, 1988c.
149. SCHLECH III, W.F.; LAVIGNE, P.M.; BORTOLUSSI, R.A.; ALLEN, A.C.; HALDANE, E.V.; WORT, A.J.; HIGHTOWER, A.W.; JONHSON, S.E.; KING, S.H.; NICHOLLS, E.S.; BROOME, C.V. Epidemic listeriosis- evidence for transmission by food. **N. Engl. J. Med.** 308(4):203-205, 1983.
150. SCHLECH III, W.F. & LAVIGNE, P.M. New perspectives on the gastrointestinal mode of transmission in invasive *Listeria monocytogenes* infection. **Clin. Invest. Med.** 7(4):321-324, 1984.

151. SCHLECH III, W.F. Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes*. **Food Technol.** 42(4):176-178, 1988.
152. SCHMIDT, U.; SEELIGER, H.P.R.; GLENN, E.; LANGER, B.; LEISTNER, L. Listerienfunde in rohen fleischerzeugnissen. **Fleischwirtschaft** 68(10):1313-1316, 1988.
153. SCHMIDT, U. Verfahren zum nachweis von listerien in fleisch und fleischerzeugnissen. **Mitteilungsbl. Bundesanst. Fleischforsch.**, Kulmbach, 28(105):264-268, 1989.
154. SCHWARTS, B.; BROOME, C.V.; BROWN, G.R.; HIGHTOWER, A. W.; CIESIELSKI, C.A.; GAVENTA, S.; GELLIN, B.G.; MASCOLA, L. Association of sporadic listeriosis with consumption of uncooked hot dogs and undercooked chicken. **Lancet** 2(8614):779-782, 1988.
155. SEELIGER, H.P.R. & WELSHIMER, H.J. Genus *Listeria*. In: BUCHANAN, R.E. ; GIBBSON, N.E. eds. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 8.ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1976. p.593-596.
156. SEELIGER, H.P.R. & JONES, D. Genus *Listeria*. In: SNEATH, P.H.A; MAIR, N.S. & SHARPE, M.E. eds. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 9.ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1986. v.2, p.1235-1245.
157. SEELIGER, H.P.R. Listeriosis- history and actual developments. **Infection** 16(suppl. 2):80-84, 1988.
158. SHAHAMAT, M.; SEAMAN, A.; WOODBINE, M. Survival of *Listeria monocytogenes* in high salt concentrations. **Zentralbl. Bakteriol. Hyg. Abt. A.** 246(4):506-511, 1980a.
159. SHAHAMAT, M.; SEAMAN, A.; WOODBINE, M. Influence of sodium chloride, pH and temperature on the inhibitory activity of sodium nitrite on *Listeria monocytogenes*. **Soc. Appl. Bacteriol. Techn. Ser.** 15:227-237, 1980b.
160. SHELEF, L.A. Survival of *Listeria monocytogenes* in ground beef or liver during storage at 4^o and 25^oC. **J. Food Prot.** 52(6):379-383, 1989.
161. SILLIKER, J.H. *Listeria monocytogenes*. **Food Technol.** 40(8):24, 1986.

162. SIPKA, M.; ZAKULA, S.; KOVINCIC, I.; STAJNER, B. Secretion of *Listeria monocytogenes* in cows milk and its survival in white brined cheese. In: INTERNATIONAL DAIRY CONGRESS, 19. New Delhi, 2-6 dec. 1974. New Delhi, 1974. v.1E. p.157.
163. SIZMUR, K. & WALKER, C.W. *Listeria* in prepacked salads. *Lancet* 1(8595):1167, 1988.
164. SKOVGAARD, N. & MORGEN, C.A. Detection of *Listeria* spp in faeces from animals, in feeds and in raw food of animal origin. *Int. J. Food Microbiol.* 6(3):229-242, 1988.
165. SKOVGAARD, N. & NORRUNG, B. The incidence of *Listeria* spp in faeces of Danish pigs and in minced pork meat. *Int. J. Food Microbiol.* 8(1):59-63, 1989.
166. SLADE, P.J. & COLLINS-THOMPSON, D.L. Two-stage enrichment procedures for isolating *Listeria monocytogenes* from raw milk. *J. Food Prot.* 50(11):904-908, 1987.
167. SLADE, P.J.; COLLINS-THOMPSON, D.L.; FLETCHER, F. Incidence of *Listeria* species in Ontario raw milk. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 21(4):425-429, 1988.
168. STEINBRUEGGE, E.G.; MAXCY, R.B.; LIEWEN, M.B. Fate of *Listeria monocytogenes* on ready to serve lettuce. *J. Food Prot.* 51(8):596-599, 1988.
169. STONE, D.L. A survey of raw whole milk for *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 22(3):257-264, 1987.
170. SURAK, J.G. & BAREFOOT, S.F. Control of *Listeria* in the dairy plant. *Vet. Hum. Toxicol.* 29(3):247-249, 1987.
171. TERPLAN, G.; SCHOEN, R.; SPRINGMEYER, W.; DEGLE, I.; BECKER, H. Vorkommen, verhalten und bedeutung von listerien in milch und milchprodukten. *Arch. Lebensmittelhyg.* 37(6):131-137, 1986.
172. THAM, W. Survival of *Listeria monocytogenes* in cheese made of unpasteurized goat milk. *Acta Vet. Scad.* 29(2):165-172, 1988.

173. TRUSCOTT, R.B. & MCNAB, W.B. Comparison of media and procedures for the isolation of *Listeria monocytogenes* from ground beef. **J. Food Prot.** 51(8):626-628, 1988.
174. TWEDT, R.M. Thermal resistance characteristics of *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.** 49(10):849, 1986.
175. USA. United States Department of Agriculture. Monitoring policy on *Listeria monocytogenes* in meat and poultry. 1987. 10p. [Comunicações internas].
176. WATKINS, J. & SLEATH, K.P. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage sludge and river water. **J. Appl. Bacteriol.** 50:1-9, 1981.
177. WEAGANT, S.D.; SADO, P.N.; COLBURN, K.G.; TORKELSON, J.D.; STANLEY, F.A.; KRANE, M.H.; SHIELDS, S.C.; THAYER, C.F. The incidence of *Listeria* spp in frozen sea products. **J. Food Prot.** 51(8):655-657, 1988.
178. WEIS, J. The incidence of *Listeria monocytogenes* on plants and soil. In: WOODBINE, M.ed. **Problems of listeriosis**. Leicester, Leicester University Press, 1975. p.61-65. [Proc. Int. Symp. 6. sept 1974].
179. WEIS, J. The incidence of *Listeria monocytogenes* in domestic and wild animals in South West Germany. In: WOODBINE, M.ed. **Problems of listeriosis**. Leicester, Leicester University Press, 1975. p.121-126. [Proc. Int. Symp. 6. sept 1974].
180. WEIS, J. & SEELIGER, H.P.R. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. **Appl. Microbiol.** 30(1):29-32, 1975.
181. WELSHIMER, H.J. Isolation of *Listeria monocytogenes* from vegetation. **J. Bacteriol.** 95(2):300-303, 1968.
182. WELSHIMER, H.J. & DONKER-VOET, J. *Listeria monocytogenes* in nature. **Appl. Microbiol.** 21(3):516-519, 1971.
183. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Foodborne listeriosis. **Bull. WHO** 66(4):421-428, 1988.
184. YOUSEF, A.E. & MARTH, E.H. Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and storage of colby cheese. **J. Food Prot.** 51(1):12-15, 1988.
185. YOUSEF, A.E.; RYSER, E.T.; MARTH, E.H. Methods for improved recovery of *Listeria monocytogenes* from cheese. **Appl. Environ. Microbiol.** 54(11):2643-2649, 1988.