

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**Estudo da presença de *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*
em indústria processadora de queijo Minas frescal**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **João Anderson Keiti Rocha**, aprovada pela Comissão Julgadora em 28 de fevereiro de 2005.

João Anderson Keiti Rocha
Médico Veterinário

Campinas, 28 de fevereiro de 2005.


Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Presidente da Banca

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye

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

Campinas

2004

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	R582e
V	EX
TOMBO BC/	62987
PROC.	16.P.00086.05
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	13/04/05
Nº CPD	

Bibid 348224

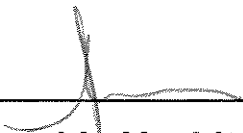
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

R582e Rocha, João Anderson Keiti
Estudo da presença de *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* em indústria processadora de queijo minas frescal / João Anderson Keiti Rocha. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Bacillus cereus*. 2. *Listeria monocytogenes*. 3. Indústria.
4. Queijo. 5. Contaminação. I. Kuaye, Arnaldo Yoshiteru.
II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia
de Alimentos. III. Título.

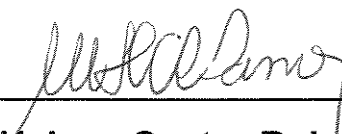
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
(Orientador)



Dra. Valéria Christina Amstalden Junqueira
(Membro)



Dra. Maria Helena Castro Reis Passos
(Membro)

Prof. Dr. José Luiz Pereira
(Membro)

Todas as coisas colaboram para o bem
daqueles que amam a Deus.

Romanos 8:28

Esta dissertação é dedicada à mulher:

Que foi ajuda presente, firme e constante
nos dias, noites, feriados e finais de semana de análises.

Que por centena de vezes, por mais que eu falasse
para se preocupar com seus deveres, ouvia me dizer:
“Quero ir para o laboratório te ajudar!”

Que nos momentos de desânimo, com alegria me falava:
“Só falta mais um pouco, vamos lá!”

Que preferiu atrasar sua própria tese
para ajudar a minha.

Que foi conselheira, cozinheira, motorista, faxineira,
lavadeira e assistente de bancada.

Que chorava por minha tristeza.
Que sorria por minha alegria.

Namorada e esposa.
Amor e amiga.

Esta dissertação, minha querida Elizabeth, também é sua.

Com amor.

Aos meus queridos pais,

Sem o apoio de vocês, jamais teria saído de Araçatuba para alçar vôos mais altos. Tudo o que sou é fruto de anos de seus esforços e trabalho árduo para oferecerem o melhor para mim.

Sem vocês, eu não seria nada do que sou.

Obrigado, muito obrigado.



Ao meu orientador,

Professor Arnaldo, não sei os motivos que o levaram a me aceitar como seu orientado,

Mas agradeço muito por isso.

Um orientador presente em todos os momentos e sempre disposto a ajudar, apesar de todas as suas ocupações,

É um privilégio que nem todos têm.

Agradecimento:

A todos do laboratório: Dirce (pelas milhares de dicas), Juliane, Celina (pelo PCR), D^a Denir, D^a Jacinta e Maria Sílvia.

Aos membros da banca, pelas importantes sugestões.

À Universidade Estadual de Campinas que me acolheu, em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos.

À CAPES pela bolsa de estudos a mim concedida.

À D^a. Maria Sílvia, D^a. Verônica e D^a. Silvinha. Sem a gentileza delas seria impossível a realização deste trabalho.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a confecção desta dissertação.

ÍNDICE

RESUMO.....	<i>xi</i>
SUMMARY.....	<i>xii</i>
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO GERAL	3
2.1. Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. O Queijo Minas Frescal	4
3.2. Taxonomia e Identificação de <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Bacillus cereus</i>	4
3.2.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	4
3.2.2. <i>Bacillus cereus</i>	6
3.3. Fatores de Virulência de <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Bacillus cereus</i>	9
3.3.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	9
3.3.2. <i>Bacillus cereus</i>	11
3.4. Epidemiologia de <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Bacillus cereus</i>	13
3.4.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	13
3.4.2. <i>Bacillus cereus</i>	16
3.5. Ocorrência dos Microrganismos em Leite e Derivados.....	18
3.5.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	18
3.5.2. <i>Bacillus cereus</i>	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1. Características da Indústria.....	23
4.2. Material Utilizado para Isolamento e Identificação.....	23
4.2.1. Isolamento e Identificação de <i>Listeria monocytogenes</i>	23
4.2.2. Isolamento e Identificação de <i>Bacillus cereus</i>	24
4.3. Metodologia	25
4.3.1. Coleta das Amostras.....	25
4.3.2. Detecção e Caracterização Bioquímica de <i>L. monocytogenes</i>	28
4.3.3. Detecção, Enumeração e Caracterização Bioquímica de <i>B. cereus</i>	29
4.3.4. Pesquisa de Produção de Enterotoxina Diarréica por <i>B. cereus</i> Isolados de Queijo Minas Frescal	31
4.4. Descrição das Principais Alterações do Ambiente de Processamento de Queijo Minas Frescal ao Longo das Coletas de Amostras	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1. Avaliação da Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	38
5.3. Avaliação da Pesquisa de <i>Bacillus cereus</i>	44
5.3.1. Pesquisa de Produção de Enterotoxina Diarréica por <i>B. cereus</i> Isolados de Queijo Minas Frescal	47
5.4. Considerações Finais Sobre a Contaminação por <i>B. cereus</i> e <i>Listeria</i> spp. em Planta de Processamento de Produtos Lácteos.....	48
6. CONCLUSÃO	50

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
APÊNDICE A	64
APÊNDICE B	73

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem de espécies de listeria identificadas em relação ao total de isolados em laticínio produtor de queijo Minas frescal.....	40
Tabela 2. Locais de isolamento de espécies de listeria em laticínio produtor de queijo Minas frescal.....	41
Tabela 3. Contagens de células vegetativas e esporos de <i>B. cereus</i> em leite cru e pasteurizado (UFC/ml, esporos/ml).....	44
Tabela 4. Contagens de <i>B. cereus</i> em amostras de queijos Minas frescal (UFC/g).....	47
Tabela 5. Detecção de enterotoxina diarreica <i>in vitro</i> de <i>B. cereus</i> isolados de queijo Minas frescal.....	48
Tabela A1. Resumo do programa de limpeza e sanitização sugerido para indústria processadora de queijo Minas frescal.....	70

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Incidência de diferentes espécies de listeria em superfície de ambiente, equipamentos e utensílios em indústria processadora de queijo Minas frescal.....	39
Quadro 2. Contagem de <i>B. cereus</i> em superfícies de ambientes, equipamentos e utensílios (UFC/cm ²) em indústria processadora de queijo Minas frescal	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma de produção do queijo Minas frescal e pontos de amostragem ambiental.....	27
Figura 2. Layout da indústria processadora de queijos Minas frescal com indicação dos locais durante a 1ª coleta de amostras.....	33
Figura 3. Layout da indústria processadora de queijos Minas frescal com indicação dos locais durante a 2ª coleta de amostras.....	35
Figura 4. Layout da indústria processadora de queijos Minas frescal com indicação dos locais durante as 3ª, 4ª e 5ª coletas de amostras ...	36
Figura A1. Fluxograma de limpeza e higienização do pasteurizador.....	69
Figura B1. Detalhe da indústria de queijo Minas frescal antes das reformas civis	73
Figura B2. Detalhe da indústria de queijo Minas frescal antes das reformas civis	74
Figura B3. Detalhe da indústria de queijo Minas frescal após as reformas civis.....	75
Figura B4. Detalhe da indústria de queijo Minas frescal após as reformas civis.....	76
Figura B5. Detalhe da indústria de queijo Minas frescal após as reformas civis.....	77

RESUMO

Produtos lácteos são constantemente incriminados em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) em várias partes do mundo. Queijos frescos, particularmente, devido à sua alta atividade de água, elevado grau de manipulação durante a produção e ausência do processo de maturação, fornecem condições adequadas para a sobrevivência e crescimento de microrganismos patogênicos, cuja ocorrência é favorecida quando procedimentos de Boas Práticas de Fabricação (BPF) são negligenciados. Duas bactérias vêm despertando a atenção de pesquisas realizadas no setor de laticínios: *Listeria monocytogenes* devido a características de infecção septicêmica com alta taxa de mortalidade entre os indivíduos acometidos e capacidade de multiplicação mesmo em alimentos sob temperaturas de refrigeração, e *Bacillus cereus*, por sua resistência à pasteurização e propriedades deteriorantes sobre o leite, além da sua atuação também como agente etiológico de enfermidades ao homem. Assim, a proposta deste trabalho foi avaliar a disseminação destes microrganismos em uma indústria produtora de queijos frescos caracterizada inicialmente por condições inadequadas de processamento como pela promoção de reformas civis nas instalações sem interrupção dos trabalhos, além da não-adoção de protocolos de BPF. Foram analisados 20 queijos Minas frescal, 120 amostras de superfície do ambiente após o processamento dos produtos, além de 10 amostras entre leite cru e pasteurizado. Neste trabalho não se isolou *L. monocytogenes*. No entanto, a ocorrência e disseminação de 4 outras espécies do gênero (*L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimerii* e *L. grayi*) nos vários pontos da linha de produção indica a potencialidade da *L. monocytogenes* vir a ocorrer. A presença de *B. cereus* foi constatada em todo o ambiente de produção e na maioria das amostras de queijos analisadas, verificando maior grau de contaminação nos produtos finais analisados durante o período em que a indústria se encontrava em reformas civis. A análise de 20 isolados de *B. cereus* dos queijos através de *kit BDE – VIA* para detecção de enterotoxina diarréica mostrou 100% de resultados positivos, o que serve de alerta para a necessidade do controle da presença deste patógeno nos produtos lácteos, além da importância da adoção das Boas Práticas de Fabricação na indústria.

SUMMARY

Dairy products are constantly incriminated in foodborne diseases outbreaks around the world. Particularly soft cheeses, due to its high water activity (A_w), high manipulation degree during the production and ripening process absence, supply good conditions for survival and growth of pathogenic microorganisms. This occurrence is facilitated when Good Manufacturing Practices (GMP) are neglected. Two bacteria is calling up the dairy's researchers: *Listeria monocytogenes* due to septicemical infection characteristic with high mortality rate among involved persons and the multiplication ability in refrigeration temperatures, and *Bacillus cereus* due to pasteurization resistance and milk spoilage properties, besides the performance also as etiological agent of man illness. Thus, the aim of this work was evaluate the dissemination of these microorganisms in a soft cheese factory, characterized initially by inadequate processing conditions as the promotion of civil reforms in installations with no work interruption, besides the non-adoption of GMP protocols. Twenty Minas frescal cheeses samples were analyzed, 120 samples of environment surfaces after product processing, plus 10 samples of raw and pasteurized milk. *L. monocytogenes* was not found in this work. However, the occurrence and dissemination of 4 other species of the genus (*L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimerii* and *L. grayi*) in several sites on processing line indicates the potentiality of *L. monocytogenes* to occur. The presence of *B. cereus* was verified in all processing environment and in most analyzed cheese samples. The largest degree of *B. cereus* contamination on final products was observed during civil reforms. Analysis of 20 *B. cereus* isolates from cheese through kit BDE – VIA for diarrhoeal enterotoxin detection showed 100% positive results. It alerts for the need to control the presence of this pathogen in dairy products and the importance of Good Manufacturing Practices adoption in industry.

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que todos os anos centenas de milhões de pessoas adoecem através do consumo de alimentos contaminados (*World Health Organization*, 1997), sendo os produtos lácteos um dos principais envolvidos (De Buyser *et al.*, 2001). Neste aspecto, os queijos frescos possuem características propícias à contaminação, sobrevivência e crescimento de microrganismos patogênicos, como: elevada atividade de água, alto grau de manipulação durante seu preparo e ausência do processo de maturação. Neste contexto, o estudo da produção de queijo Minas frescal reveste-se de importância, pois além do considerável volume de consumo, é por vezes produzido de forma artesanal sem ser levado em conta o perigo de contaminação do consumidor por microrganismos patogênicos; dentre eles a *Listeria monocytogenes* e o *Bacillus cereus*.

A *Listeria monocytogenes* se tornou objeto de crescentes estudos nas últimas décadas, pois ao contrário de outros agentes de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) que afetam apenas o sistema gastroentérico, o microrganismo pode levar a quadros severos de listeriose com septicemia e alta taxa de letalidade (Schlech, 1996), além da sua capacidade de multiplicação em temperaturas de refrigeração (Donnelly, 2001). Carne, vegetais e produtos lácteos são alimentos comumente relatados como fontes de infecção ao homem, sendo os derivados de leite recentemente envolvidos em um grave surto de listeriose nos EUA nos anos de 2000 – 2001 (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2001).

O *Bacillus cereus* também é alvo de pesquisas do setor laticinista, dada a sua resistência à pasteurização e propriedades deteriorantes sobre o leite (Andersson *et al.*, 1995), além da atuação como agente etiológico de enfermidades ao homem (Kotiranta *et al.*, 2000). O microrganismo é encontrado em solo, poeira, água e vários alimentos como arroz e carne. O BCCDC (*British Columbia Centre for Disease Control*, 2002) relata a ocorrência de surtos

envolvendo leite no Canadá em 1988 e 1999, onde mais de 100 pessoas adoeceram devido à contaminação por *B. cereus*.

Na literatura são encontradas poucas pesquisas relacionadas à sobrevivência de *B. cereus* em queijos frescos e à presença deste nas instalações de processamento do produto. Semelhantemente à *L. monocytogenes*, o *B. cereus* teria condições de sobrevivência e multiplicação tanto no queijo Minas frescal quanto no seu local de produção, constituindo deste modo um risco em potencial para o consumidor deste produto, no que concerne à ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos.

Assim, a proposta da pesquisa foi avaliar a presença destes microrganismos em instalações produtoras de queijo Minas frescal e no produto acabado, identificando os focos potenciais de contaminação na linha de processamento e verificando a patogenicidade dos isolados de *B. cereus*, propondo, então, medidas para o controle destes microrganismos.

2. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a disseminação de *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* em indústria produtora de queijo Minas frescal.

2.1. Objetivos Específicos

- Avaliar as possíveis fontes de contaminação de queijo Minas frescal por *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* durante seu processamento.
- Avaliar a patogenicidade das colônias de *B. cereus* isoladas dos queijos através da detecção da produção de enterotoxina diarréica.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O Queijo Minas Frescal

Inicialmente, entende-se por queijo o produto fresco ou maturado, obtido por separação parcial do soro de leite ou leite reconstituído, coagulado pela ação física do coalho, enzimas, bactérias ou ácidos orgânicos específicos (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA, 1996).

O queijo Minas frescal é um produto típico nacional, caracterizando-se como queijo fresco obtido do leite pasteurizado integral ou parcialmente desnatado, através de coagulação enzimática (MAPA, 1997). Classificado ainda como queijo de muito alta umidade (acima de 55%), massa crua, não maturado, podendo ser levemente prensado ou não, devendo ser conservado sob refrigeração e consumido nos 15 primeiros dias após sua produção (Oliveira, 1986; Pereira *et al.*, 1999; Peresi *et al.*, 2001). Com ampla aceitação nacional, foi o terceiro queijo mais produzido no Brasil na década passada, estando atrás apenas dos queijos mussarela e prato (Centro de Excelência em Laticínios, 2002).

As características físico-químicas e tecnológicas (alta umidade e atividade de água, pH próximo da neutralidade, baixa concentração de sal, produção na maioria das vezes com manipulação intensa e ausência de cura) permitem que o queijo Minas frescal seja susceptível a contaminações bacterianas diversas, tal como por *L. monocytogenes* e *B. cereus*.

3.2. Taxonomia e Identificação de *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*

3.2.1. *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é um bastonete Gram-positivo, anaeróbio facultativo não esporulado, móvel, flagelado, com 0,4 a 0,5 µm de diâmetro e 0,5 a

2 µm de comprimento. Possui temperatura ótima de crescimento na faixa de 30-37°C, com um mínimo de 1-2°C e máximo de 45°C (Ryser & Marth, 1999). Resiste a uma faixa de pH de 5 a 9 e uma concentração de sal de até 10% (Doyle, 1988).

Segundo o *Bergey's Manual*, o gênero *Listeria* compreende ainda outras cinco espécies (*L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. gray*), sendo estas de menor importância em saúde pública (Rocourt, 1994; Sneath, 2000).

A sistemática de identificação de Kauffmann & White para a *Listeria monocytogenes* caracteriza atualmente 5 sorogrupos (1/2, 3, 4, 5 e 6) divididos em 19 sorovares, sendo baseados em 14 antígenos somáticos (O) e quatro flagelares (H) (Rocourt, 1994). O sorovar 4b foi isolado em pelo menos 50% dos casos mundiais bem como nos maiores surtos de listerioses desde 1981 (Rocourt, 1994; Franciosa *et al.*, 2001). Sugere-se que o sorovar 4b possa ter um maior grau de virulência, porém esta correlação não está bem esclarecida (Lundén *et al.*, 2004).

A identificação genética das cepas de *Listeria monocytogenes* tem sido amplamente pesquisada devido à capacidade limitada de caracterização que a sorotipagem oferece. A maioria dos isolados clínicos da bactéria são pertencentes a apenas 3 sorovares: 1/2a, 1/2b e 4b. A fagotipagem também é utilizada, porém apenas 60 a 70% dos isolados são tipificáveis (Pifaretti *et al.*, 1989).

A eletroforese de enzimas multilocadas (MEE) facilitou o estudo da genética e epidemiologia da *L. monocytogenes*. Pifaretti *et al.* (1989) analisaram 175 isolados dos EUA e Europa, identificando 45 perfis eletroforéticos (ET) distintos agrupados em duas grandes divisões. Todos os isolados dos sorotipos 4a, 4b, e 1/2b pertenceram ao perfil eletroforético da divisão I.

A identificação através de genes ribossomais (ribotipagem) vem sendo aplicada na caracterização da bactéria, que é agrupada em pelo menos 14 ribovares, dois dos quais englobam 80% das cepas. Estes dois grupos são constituídos pela maioria dos sorovares 4b e pelo sorogrupo 1/2 (Jacquet *et al.*, 1992).

Czajka & Batt (1994) relatam que a metodologia RAPD-PCR provê uma maior especificidade para a classificação do microrganismo em relação à sorotipagem e, possivelmente, à eletrotipagem.

Destro *et al.* (1996) em trabalho com 115 isolados de *L. monocytogenes* coletados em planta de processamento de camarão utilizaram os métodos RAPD-PCR e PGFE para a tipagem do DNA cromossomal, os quais revelaram boa capacidade discriminatória, facilidade para interpretação dos resultados e capacidade de subtipificação dos isolados.

3.2.2. *Bacillus cereus*

O *Bacillus cereus* é classificado segundo o *Bergey's Manual* (Sneath, 1990), como bactéria pertencente ao gênero *Bacillus*, que ainda inclui outras 34 espécies confirmadas e outras 26 a serem confirmadas. São bastonetes Gram positivos, com comprimento variando de 3-5 μ m e largura de 1-2 μ m, anaeróbios facultativos e móveis (na maioria das cepas), sendo detentores de flagelos peritricos.

As espécies *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. anthracis*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. pumilus* e *B. thuringiensis* apresentam esporos elipsoidais em posicionamento central à célula-mãe, não possuindo dilatação por ocasião da formação do esporo (Sneath, 1990). Deste modo são denominadas, segundo sua morfologia, como espécies do Grupo 1 (Gordon, 1973; *apud*: Stadhouders, 1992).

O *B. cereus* possui uma temperatura ótima de crescimento situada na faixa de 28-35°C com o mínimo entre 4-7°C e o máximo de 43°C. Seu tempo de geração em condições ideais é de 18-27 minutos. Suporta uma ampla faixa de pH, variando de 4,9 – 9,3 e concentrações de sal em torno de 7,5% (Kramer & Gilbert, 1989; Kotiranta *et al.*, 2000)

Seus esporos apresentam considerável resistência ao calor, com valor D₁₀₀ situando-se entre 2,7-3,1 minutos. Germinam facilmente, podendo chegar a taxas

próximas a 100% em condições favoráveis. Este processo tende a ser rápido, podendo ocorrer dentro de 30 minutos em algumas cepas (Notermans & Batt, 1998).

Devido às características morfofisiológicas das espécies de *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis* serem muito semelhantes entre si (não fermentadoras de manitol, crescimento em presença de lisozima, fermentadoras de glicose em anaerobiose, redutoras de nitrato, etc.) em relação às demais do mesmo gênero, são denominadas normalmente como bactérias do grupo *B. cereus*. Todas as cepas pertencentes ao grupo *B. cereus* são produtoras de lecitinase, sendo que as demais do grupo 1 são lecitinase-negativas (Stadhouders, 1992).

A não-formação de ácido a partir de D-manitol e sua produção a partir de glicose em anaerobiose, além de crescimento na presença de lisozima são propriedades características do grupo *B. cereus*, não se aplicando via de regra a outras espécies do grupo 1, que possuem características variáveis (Stadhouders, 1992).

As bactérias do grupo 1 decompõem a tirosina, sendo que as outras em geral não. Fora deste grupo, somente 3 espécies são claramente aptas a decompor tirosina: *B.adius*, *B. brevis* e *B. laterosporus* (Stadhouders, 1992).

As características sorológicas dentro do gênero *Bacillus* não são bem definidas. Dentro de suas limitações, a caracterização pode ser baseada na pesquisa de antígenos flagelares e somáticos das células vegetativas ou antígenos dos esporos. Entretanto, os antígenos flagelares (H) são os que possuem maior grau de especificidade entre as cepas. O método de tipificação sorológica flagelar, porém, falha devido à ocorrência por parte de cepas de *B. cereus* do compartilhamento de alguns antígenos flagelares semelhantes com o *B. thuringiensis* (Stadhouders, 1992).

Desde que a caracterização molecular começou a ser empregada na classificação das espécies, questionamentos começaram a ser levantados em relação à classificação taxonômica do gênero *Bacillus*. Pesquisas, como de

Kaneko *et al.* (1978) revelaram que *B. anthracis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis* possuíam forte homologia de DNA na faixa de 36% de G+C semelhantes, de modo que surgiram propostas nos meios científicos de agrupamento destas três espécies em uma única espécie, que se cogitou, entre vários postulados, ser o *B. anthracis* a espécie raiz, e as demais sendo subespécies desta.

Estudos mais recentes como os realizados por Helgason *et al.* (2000) em que se utilizou o seqüenciamento genômico através de método baseado em PCR, também apresentam evidências da similaridade dos genomas das três espécies em questão com menos de 5% de divergência nos seus códigos de DNA. Assim, estas poderiam ser consideradas uma só espécie.

As pesquisas buscaram, então, encontrar protocolos que diferenciasssem ao menos as bactérias do grupo *B. cereus* das outras espécies. Hansen *et al.* (2001) desenvolveram *primers* específicos para este grupo que, segundo os autores, possuiriam potencial para serem utilizados na detecção direta das bactérias sem os procedimentos de isolamento ou enriquecimento.

Já em 2003 Manzano *et al.* desenvolveram um método satisfatório para a diferenciação de *B. cereus*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis* através do uso do protocolo PCR associado à técnica de endonuclease restritiva (PCR-RE) em que dois *primers* específicos para espécies do gênero *Bacillus* foram utilizados para a amplificação. Os *amplicons* obtidos foram digeridos por 3 enzimas restritivas diferentes, sendo obtidos perfis eletroforéticos adequados para a diferenciação entre as espécies. Esta técnica, segundo os autores, também possui possibilidade de ser utilizada diretamente em amostras alimentícias onde a população de bactérias é de composição mista.

Na área alimentícia os métodos de caracterização molecular de microrganismos encontraram viabilidade para sua utilização desde o final da década de 90, em especial na identificação de fontes de contaminação dos produtos com considerável poder discriminatório intra-espécies. Andersson *et al.* (1999) compararam o método de ribotipagem e o protocolo RAPD – PCR onde se identificou, de 50 cepas previamente isoladas *B. cereus* e *B. mycoides* oriundas de

laticínios e culturas próprias, 36 diferentes ribovares e 40 perfis diferentes de DNAs amplificados.

3.3. Fatores de Virulência de *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*

3.3.1. *Listeria monocytogenes*

A bactéria possui a peculiar característica, dentre as bactérias causadoras de DTAs, de se multiplicar intracelularmente dentro de seu hospedeiro, de modo que muitas das suas características de virulência estão relacionadas a este ciclo de vida.

Internalinas (InIA, InIB e InIC)

Proteínas ácidas, presentes na superfície celular bacteriana, compostas de 800 aminoácidos têm a função de mediar a entrada da bactéria nas células epiteliais (como as do epitélio intestinal), facilitando o contato entre parasita e hospedeiro (Kuhn & Goebel, 1999).

Proteína P-60

Envolvida na invasão de fibroblastos, com indícios também de participação na invasão de hepatócitos, além de facilitar a fagocitose por parte de macrófagos (Kuhn & Goebel, 1999).

Hemolisina

A hemolisina é reconhecida como o maior fator de virulência da *Listeria monocytogenes*, cuja secreção é essencial para a promoção de seu crescimento intracelular, promovendo a lise da membrana fagossômica dentro dos macrófagos, permitindo o acesso da bactéria ao citoplasma do hospedeiro, onde a

multiplicação da mesma ocorrerá. Esta enzima, também denominada Listeriolisina O (LLO), é classificada como citolisina porogênica sulfidrilo-ativada que promove a formação de grandes poros transmembranosos, responsáveis pela característica citolítica da enzima (Farber & Perterkin, 1991; Kuhn & Goebel, 1999).

Fosfolipases

Semelhantemente à hemolisina, a fosfatidilinositol fosfolipase C e a fosfatidilcolina são responsáveis pelo escape dos vacúolos das células hospedeiras (Kuhn & Goebel, 1999).

Proteína ActA

Proteína de superfície composta de 610 aminoácidos responsável pela polimerização da actina, promovendo a formação de uma espécie de cauda propulsora que será responsável pela movimentação intracelular da bactéria, levando-a à borda da célula para a infecção da célula vizinha (Kuhn & Goebel, 1999).

Superóxido Dismutase e Catalase

Ambas enzimas também produzidas e secretadas pela bactéria atuam na detoxificação dos radicais superóxidos gerados pela combustão oxidativa dentro da célula fagocítica. Tais superóxidos, que são responsáveis pela destruição das bactérias dentro dos fagossomos, são convertidos em peróxido de hidrogênio pela ação do superóxido dismutase, daí clivado pela catalase em água e oxigênio, neutralizando o mecanismo de eliminação bacteriana realizado pelas células de defesa do hospedeiro (Kuhn & Goebel, 1999)

3.3.2. *Bacillus cereus*

A produção de toxinas por parte do *B. cereus* está vinculada a uma série de fatores. O primeiro e o mais importante deles é a presença ou não dos genes codificadores de determinadas toxinas. Hansen & Hendriksen (2001) analisaram por PCR uma coleção de isolados da bactéria e verificaram que apenas 45% das cepas estudadas apresentaram bandas amplificadas de *bceT*, gene codificador da enterotoxina T. Ghelardi *et al.* (2002) constataram a ausência de *bceT* e *cytK* (codificador da citotoxina K) em 100% das 24 amostras por eles analisadas.

Outros fatores de influência sobre a produção de toxinas são: tipo de alimento onde o bacilo se encontra, temperatura, tipo de tratamento térmico e pH deste ambiente. Agata *et al.* (2002) quantificaram a produção de toxina emética em vários alimentos encontrando altos níveis em alimentos farináceos. Dentre estes, os que sofreram processo de fritura e cozimento curiosamente obtiveram maiores taxas. Por outro lado, alimentos como carne e ovos apresentaram baixa concentração da toxina, assim como alimentos preparados com vinagre, provavelmente devido à redução do pH pelo ácido acético.

Pode-se creditar às enterotoxinas do *B. cereus* o caráter de proteínas causadoras de citotoxicidade, acúmulo de líquido na alça ileal ligada de animais experimentais, dermonecrose e morte em ratos experimentais. Foram identificados ao menos quatro diferentes tipos de proteínas enterotóxicas, produzidas e secretadas em sua maioria durante o crescimento logarítmico do microrganismo (Hansen & Hendriksen, 2001).

Ao contrário das enterotoxinas, a toxina emética é produzida durante a fase estacionária e é liberada durante a esporulação da bactéria, na fase de lise celular (Notermans & Batt, 1998).

Atualmente as técnicas de identificação molecular baseadas em PCR permitem a caracterização de grande parte dos genes codificadores destas toxinas, fornecendo mais uma ferramenta para o rastreamento de fontes de contaminação de *B. cereus* toxigênicos (Ghelardi *et al.*, 2000; Hansen & Hendriksen, 2001).

Hemolisina BL (HBL)

É constituída por três componentes: a fração B, com função de ligação e codificado pelo gene *hblA*, e as frações L₁ e L₂, responsáveis pela ação lítica da enzima, codificadas pelos genes *hblD* e *hblC*, respectivamente (Hansen & Hendriksen, 2001). Supõe-se que o mecanismo de ação da hemolisina BL seja pela formação de poros na membrana da célula-alvo provocando a lise osmótica (Lund *et al.*, 2000).

Enterotoxina não-hemolítica (NHE)

Possui três frações: A, B e C, com peso molecular de 45, 39 e 105 kDa e codificados pelos genes *nheA*, *nheB* e *nheC*, respectivamente (Hansen & Hendriksen, 2001).

Um dos *kits* disponíveis no mercado para identificação de cepas toxigênicas de *B. cereus* (*Kit* BDE – VIA Tecra®) detecta a fração de 45 kDa desta toxina através de ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) em configuração conhecida como “sandwich” (Tan *et al.*, 1997; Hansen & Hendriksen, 2001).

EnterotoxinaT (bc-D-ENT)

Pesando 41 kDa esta proteína exibe toxicidade às células Vero e é codificada pelo gene *bceT* (Hansen & Hendriksen, 2001). Apesar de apresentar características citotóxicas ela provavelmente é liberada somente na lise celular, não havendo indicação segura de envolvimento desta toxina em surtos de DTAs (Lund *et al.*, 2000; Choma & Granum, 2002).

Citotoxina K

Descrita pela primeira vez em 2000 por Lund *et al.* esta toxina foi isolada de uma cepa de *B. cereus* responsável por um grave surto ocorrido na França em

1998 resultando em três mortes. Com peso de 34 kDa é altamente citotóxica e hemolítica.

Toxina Emética

A toxina emética foi primeiramente identificada no Reino Unido após variados incidentes associados ao consumo de arroz cozido de restaurantes chineses. Esta toxina foi purificada e identificada como um peptídeo cíclico denominado “cereulídeo”. Possui massa molecular de 1,2 kDa e é estável a enzimas proteolíticas, baixo pH e temperatura elevada. Seu mecanismo de ação resume-se ao estímulo das vias aferentes do nervo vago resultando em vômito (Granum, 1994; Notermans & Batt, 1998).

3.4. Epidemiologia de *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*

3.4.1. *Listeria monocytogenes*

A *L. monocytogenes* está freqüentemente presente no trato intestinal de humanos de modo que estimativas levam a crer que 5-10 % da população em geral pode ser portadora assintomática do organismo. Além disso, anticorpos anti-*Listeria* spp. são encontrados em pessoas sadias de modo que a presença do organismo nas fezes não é necessariamente indicativa da infecção conhecida como listeriose (Farber & Peterkin, 1991).

Com especial oportunismo por indivíduos com baixa imunidade celular a população de risco inclui gestantes e neonatos, pessoas com enfermidades ou tratamentos imunodepressores e idosos (Rocourt, 1994).

A infecção em adultos se apresenta com quadro de meningite e bacteremia. Infecções localizadas, tais como artrite séptica, endocardite, osteomielite e peritonite são raras e, em geral, precedem a bacteremia. Em gestantes, a listeriose ocorre mais freqüentemente no 3º trimestre de gestação. Enquanto na

mãe a infecção pode ser assintomática ou caracterizada por quadro semelhante a um resfriado, o feto pode sofrer conseqüências mais sérias, incluindo aborto espontâneo, morte fetal, nascimento prematuro, septicemia neonatal e meningite no recém-nascido (Rocourt, 1994). Apesar dos protocolos antibióticos a listeriose neonatal permanece com alta taxa de mortalidade atingindo valores de até 36% (Farber & Peterkin, 1991).

Não obstante os avanços das pesquisas, a dose mínima infectante para a *L. monocytogenes* não é seguramente confirmada, sendo este desconhecimento um sério problema para as indústrias e as agências governamentais. O Departamento de Saúde Pública dos EUA (PHSIS) estabeleceu tolerância zero para a *L. monocytogenes* em alimentos cozidos e os “prontos para consumo”. Esta política se baseia nos seguintes argumentos: capacidade do microrganismo de causar enfermidades em humanos, capacidade de multiplicação em temperatura de refrigeração e, principalmente, pela sua dose infectante ser desconhecida (Shank *et al.*, 1996).

A bactéria é antiga conhecida no meio veterinário como patógeno de animais, primariamente acometendo ovinos e bovinos (Archer, 1996).

Devido à sua ampla distribuição na natureza, o homem pode entrar em contato com a bactéria através de uma variedade de fontes, como carne, leite e derivados, frutos do mar e vegetais, assim como água, insetos, poeira, fezes e portadores humanos (Brackett, 1988; Ryser & Marth, 1999).

O primeiro surto de listeriose de origem alimentar ocorreu nas Províncias Marítimas do Canadá em 1981, com 41 acometidos e 17 mortes. Salada de repolho foi o alimento incriminado, isolando-se o sorovar 4b (Schlech, 1996; Farber & Peterkin, 1991).

Na França, dois grandes surtos ocorreram entre 1992 e 1993. O primeiro, de maior relevância, acometeu 225 indivíduos, com 22 abortos e 63 mortes. Ambos os surtos estiveram relacionados a produtos suínos prontos para consumo contaminados com o sorovar 4b (Meng & Doyle, 1997).

Surto de uma forma branda de listeriose foi relatado na Itália em 1994 envolvendo 39 pessoas das quais 70% tiveram quadro gastroentérico e o restante apresentando sintomatologia semelhante ao resfriado. Neste caso, salada à base de arroz foi implicada como veiculador da doença, isolando-se o sorovar 1/2a (Meng & Doyle, 1997).

Pesquisas realizadas nos Estados Unidos pelo Departamento de Agricultura (USDA) em 1999 indicaram uma prevalência de 2,5% de listeria em alimentos prontos para consumo, apontando ainda uma prevalência de 4,6% em frios cárneos para lanche (USDA, *apud*: Norton, 2002).

Lyytikäinen *et al.* (2000) relataram um surto de listeriose envolvendo o sorovar 3a ocorrido na Finlândia onde acometeu 25 pacientes de um hospital e resultou em 6 mortes. Tal evento foi relacionado ao consumo de manteiga contaminada.

Em 2000-2001 um surto nos EUA foi associado ao consumo de queijo fresco tipo mexicano de fabricação caseira onde se utilizou leite contaminado. Doze pessoas foram acometidas pela doença (incluindo 10 gestantes), provocando 5 abortos, 3 partos prematuros, 2 recém-nascidos infectados, um adulto acometido por meningite e outro desenvolvendo abscesso cerebral (Centers for Diseases Control and Prevention, 2001).

Em 2001, 48 pessoas foram acometidas por gastroenterite febril após o consumo de queijo fresco na Suécia. A tipificação dos isolados do produto e dos pacientes por análise de enzimas restritivas revelou perfis idênticos entre si (Lundén *et al.*, 2004).

Na Europa entre 1991 e 2001 foram notificados 2065 casos de listeriose, porém estima-se que o número real tenha sido maior principalmente devido a falhas na comunicação dos casos aos serviços epidemiológicos (Lundén *et al.*, 2004).

Mundialmente surtos de listeriose já foram registrados na Nova Zelândia, Canadá, França, EUA, Suíça e Inglaterra, sendo os alimentos de maior risco:

vegetais frescos, carnes cruas, leite cru, derivados de leite, ovos e frutos do mar (Meng & Doyle, 1997).

3.4.2. *Bacillus cereus*

A enfermidade de origem alimentar em humanos causada pelo *B. cereus* é expressa através de duas síndromes distintas: a síndrome diarreica e a síndrome emética.

A síndrome diarreica é caracterizada por dor abdominal, diarreia intensa e, menos freqüentemente náuseas e vômitos, com persistência dos sintomas por 12 – 24 h; sintomas estes semelhantes à intoxicação causada por *Clostridium perfringens*. Neste quadro clínico está comumente envolvido o consumo de produtos lácteos, vegetais e carne (Kotiranta *et al.*, 2000).

A síndrome emética foi reportada pela primeira vez em 1971 na Inglaterra sendo causada pela ação da toxina cereulídica. Esta síndrome tem como sintomas: náusea, vômito e eventualmente diarreia, sinais clínicos semelhantes aos encontrados na enfermidade causada por *Staphylococcus aureus*. O quadro é manifesto de 1- 5 h após o consumo da toxina e persiste por até 24 h. A toxina é produzida durante a fase estacionária de crescimento do microrganismo no alimento e liberada em grande quantidade durante a lise celular, de modo que não é necessária a ingestão da célula viável em si, bastando apenas a ingestão da toxina pré-formada para o desenvolvimento dos sinais clínicos. A síndrome diarreica, por sua vez, tem como característica a produção de toxinas pelas células vegetativas do *B. cereus* quando da sua fase de crescimento logarítmico no intestino delgado do hospedeiro (Kotiranta *et al.*, 2000; Christiansson, 1992).

Valores acima de 10^5 UFC/g de alimento como a concentração padrão mínima para a ocorrência de toxinfecção por *B. cereus* foram outrora amplamente citados (Johnson, 1984; Ahmed *et al.*, 1983). Levantamentos mais recentes, entretanto, apontam que concentrações muito inferiores a este valor também podem levar a um quadro de toxinfecção. Um trabalho citado por Notermans & Batt (1998) relata que 107 casos de síndrome emética no Reino Unido mostraram

que as concentrações de *B. cereus* presentes nos alimentos (principalmente arroz) variaram de 10^3 a 10^{10} UFC/g, com média de 10^7 UFC/g. Outros levantamentos citados pelo mesmo autor mostram que os valores relacionados à síndrome diarréica variaram de 10^3 a 10^8 UFC/g, com valor médio de 10^7 UFC/g. Anteriormente, autores brasileiros também encontraram baixas concentrações de *B. cereus* em alimentos responsáveis por incidentes de toxinfecção alimentar da ordem de 10^2 a 10^3 UFC/g (Rabinovitch *et al.*, 1985).

O *Bacillus cereus* foi identificado pela primeira vez por Frankland & Frankland em 1887, sendo a ocorrência desta bactéria em leite já descrita desde 1916 como contaminante comum de leite cru. A partir daí sua presença em leite pasteurizado vem sendo descrita por vários pesquisadores em diversos países, inclusive com a presença de cepas do tipo psicrótróficas (Meer *et al.*, 1991; Te Giffel *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1998; Larsen & Jørgensen, 1999).

O primeiro caso documentado de toxinfecção humana causada por *B. cereus* é datado de 1950 pelo consumo de sobremesa de baunilha sendo encontradas concentrações de esporos acima de 10^4 UFC/g no amido de milho usado para o preparo dos alimentos (Andersson *et al.*, 1995).

Durante a década de 60 o *B. cereus* foi o terceiro maior causador de enfermidades transmitidas por alimentos na Hungria, sendo pratos cárneos freqüentemente envolvidos, fato este devido ao intenso uso de condimentos na culinária húngara (Andersson *et al.*, 1995; Ahmed *et al.*, 1983).

Dois surtos envolvendo *B. cereus* foram registrados no Canadá. O primeiro em 1988, envolvendo 36 pessoas após o consumo de *milkshake* em um *fast food*. O produto possuía contagens do microrganismo acima de 10^5 UFC/g. No ano seguinte, 74 pessoas em uma escola foram acometidas após o consumo de leite que apresentava contagens acima de 10^6 UFC/g (*British Columbia Centre for Disease Control*, 2002).

No Brasil, Azeredo (1998) avaliou a presença do microrganismo em 216 amostras das três grandes classes de arroz comercializados no país (polido, parbolizado e integral), encontrando 50%, 10% e 100% das amostras

respectivamente contaminadas com contagens variando de 10^2 a 10^3 . Surto relacionados ao *B. cereus* já foram relatados nos Estados Unidos, Reino Unido, Canadá, Holanda, países escandinavos, Japão e outros onde os alimentos incriminados foram: produtos cárneos, laticínios, condimentos e produtos da culinária chinesa.

3.5. Ocorrência dos Microrganismos em Leite e Derivados

3.5.1. *Listeria monocytogenes*

Uma ampla variedade de produtos lácteos vem sendo incriminada como veiculadora de bactérias do gênero *Listeria*. Entre estes produtos o queijo é alvo de grande interesse devido à sua constante associação com surtos de listeriose. A presença desse microrganismo em queijos se deve, entre outros fatores, à facilidade de acesso da bactéria ao produto pela sua alta manipulação na indústria e sua habilidade de sobreviver às etapas de produção e cura.

Ryser & Marth (1988) relatam a sobrevivência da bactéria por até 130 dias em um preparado onde o queijo *Cheddar* era o principal ingrediente.

No Brasil, Destro *et al.* (1991) constataram a presença de *Listeria* spp. em 10% de 40 amostras de leite cru e em 40% das amostras de queijo Minas frescal. Neste último, 10% foram identificadas como *Listeria monocytogenes*. Em nenhuma das 40 amostras de leite pasteurizado foi identificado o microrganismo.

Em 1993, Moura *et al.* pesquisaram a incidência de *Listeria* spp. em leite cru e pasteurizado em uma grande beneficiadora de leite do Estado de São Paulo, analisando um total de 440 amostras. Os autores verificaram que 12,7% das amostras de leite cru e 0,9% de leite pasteurizado foram positivas para bactérias do gênero *Listeria*, sendo que 9,5% das amostras de leite cru foram positivas para *L. monocytogenes*.

Silva *et al.* (1998) analisando 103 amostras de vários tipos de queijos (Gorgonzola, Roquefort, ricota, Cheddar, Brie, Camembert e Minas frescal caseiro e industrializado) no Estado do Rio de Janeiro, encontraram 10,68% de contaminação por *L. monocytogenes* e 19,42% por outras listérias. A maior incidência ocorreu nos queijos Minas frescal de fabricação caseira isolando-se os sorotipos 1/2a, 1/2b, e 4b.

O queijo Minas frescal comercializado na região de Campinas – SP foi pesquisado em trabalhos de Vieira (2000) e Carvalho (2003). Em vinte amostras analisadas por Vieira, 25% estavam contaminadas por *L. monocytogenes*, 40% por *L. innocua*, 20% por *L. welshimeri* e 5% por *L. seeligeri*. Analisando 93 amostras do produto, Carvalho verificou que 11,8% das amostras apresentavam contaminação por *Listeria* spp., sendo 3% por *L. monocytogenes* e 8% por *L. innocua*.

No México, Vázquez-Salinas *et al.* (2001) encontraram em um total de 1300 amostras de leite cru, 23% de amostras positivas para *Listeria* spp., sendo que 13% encontravam-se contaminadas por *L. monocytogenes*.

No Paraná, 100 amostras de vários tipos de queijos foram analisados por Moskalewsky *et al.* (2003), onde foram isoladas *Listeria* spp. em 12% das amostras, sendo 6% *L. monocytogenes*.

Naldini (2002) através de inoculação experimental, verificou a viabilidade de *L. monocytogens* em queijos Minas frescal produzidos com adição de culturas lácticas estocados por vinte e cinco dias. Ainda constatou a elevação da concentração do microrganismo em até dois ciclos logarítmicos nos queijos produzidos com acidificação direta e armazenados durante o mesmo período.

Kabuki *et al.* (2004a) em trabalho com queijos frescos tipo hispânico constataram a presença de *L. monocytogenes* em 6,3% de 111 amostras analisadas. Ribotipagem realizada com amostras de isolados dos produtos e do ambiente da indústria revelou que, dentre os vários perfis, o ribotipo mais persistente na planta de processamento durante o tempo da pesquisa era o mesmo que havia sido isolado no produto final.

3.5.2. *Bacillus cereus*

Segundo Andersson *et al.* (1995) esta bactéria vem se tornando um grande problema nos países do hemisfério norte, pois seus esporos são resistentes à pasteurização, podendo vir a germinar no leite já pasteurizado e se proliferar, de modo que este leite pode se tornar veículo do microrganismo além da ocorrência de problemas tecnológicos, como a agregação da camada lipídica do leite pasteurizado por ação das lecitinases, fenômeno este conhecido como *bitty cream* e ainda a formação do *sweet curdling* ou coalho doce. Soma-se a estes fatos a presença constante de esporos no leite que é recebido na indústria, pois já na fazenda o leite é contaminado através de poeira, esterco e ração contendo altíssimas contagens do microrganismo, além da alta capacidade de adesão às mais variadas superfícies.

Assim, a identificação da rota de contaminação desde a chegada da matéria-prima até a expedição do produto final torna-se parte importante dentro de um programa de controle das bactérias patogênicas na indústria.

A princípio, o *B. cereus* no leite pasteurizado pode ser originado principalmente de esporos presentes no leite cru ou a partir de focos de contaminação dentro do ambiente da indústria (Lin *et al.*, 1998; Svensson *et al.*, 1999).

Andersson *et al.* (1995) expõem a facilidade da contaminação da planta de processamento de leite devido à contaminação inicial do leite cru que chega ao estabelecimento, à sobrevivência dos esporos à pasteurização e à forte capacidade de adesão destes esporos às superfícies de aço inoxidável, que podem em grande parte permanecer aderidos mesmo após o processo de limpeza das instalações.

Ahmed *et al.* (1983) analisaram 40 amostras de leite cru e pasteurizado, além de produtos lácteos como queijo e sorvetes. Apesar de encontrarem baixas concentrações de *B.cereus*, o microrganismo foi isolado em grande número de amostras analisadas, principalmente em queijo Cheddar.

Granum *et al.* (1993) verificaram que, de 85 colônias isoladas de produtos lácteos (leite desnatado, leite semi-desnatado e creme de leite), 59% se revelaram enterotoxigênicas e 15% psicrotróficas.

Te Giffel *et al.* (1996) analisaram 229 amostras das mais variadas classes de alimentos, desde alimentos chineses, doces, produtos de panificação, leite, carne, até ervas e condimentos, sendo detectada a presença presuntiva de *B. cereus* em 48% das amostras.

Em um trabalho onde se investigou 334 amostras de leite pasteurizado semi-desnatado foram encontradas, em 40% das amostras, a presença presuntiva de *B. cereus* em baixas contagens, variando de 50 a 5000 UFC/ml (Te Giffel *et al.*, 1997).

Estudo realizado por Cardoso (2000) revelou a presença do *B. cereus* em 48,3% de 240 amostras de leite A, B e C analisados. Foram detectados níveis baixos de contaminação, na faixa de 10^2 UFC/ml, com maior concentração no leite tipo C. Não houve detecção de cepas psicrotróficas nas amostras analisadas.

Lin *et al.* (1998) realizaram o procedimento de rastreamento de contaminação por *B. cereus* em planta de leite pasteurizado através de amostragem do leite em vários pontos durante o processamento do mesmo, além de coleta de amostras de superfícies do ambiente através de *swab*. O autor encontrou baixo número de células vegetativas de *B. cereus* no leite cru; encontrando, porém, esporos do microrganismo em alta concentração, na faixa de 10^5 UFC/ml. Essa contagem foi similar à das células vegetativas encontradas no leite pasteurizado. Os resultados obtidos sugerem que a maior fonte de contaminação por *B. cereus* em leite pasteurizado vem a ser os esporos de *B. cereus* do leite cru. A contaminação pós-pasteurização através das linhas de processamento ou ambiental teria pouca importância na contaminação do produto.

Com o desenvolvimento das técnicas de caracterização molecular Svensson *et al.* (1999) utilizaram, com sucesso, a técnica de RAPD – PCR para uma prolongada investigação de fontes de contaminação em planta de beneficiamento de leite. Grandes grupos (*clusters*) de isolados geneticamente

relacionados foram encontrados no silo de armazenamento pré-pasteurização e no produto final durante os dois anos da duração da coleta, indicando um provável foco de contaminação persistente neste silo.

Registros relacionados à presença desta bactéria em queijos são escassos, havendo na literatura apenas um relato de incidente de enfermidade de origem alimentar em 1967 no Canadá, citado por Schmitt *et al.* (1976), ocorrido com queijo Feta, onde uma pessoa foi acometida de síndrome emética.

A sobrevivência de *B. cereus* em queijo Gouda foi pesquisada por Rukure e Bester (2001) onde se inoculou o microrganismo, chegando a concentrações de 10^2 no leite utilizado. Após a salga do queijo não foi detectado *B. cereus* nas amostras. O autor sugere a baixa atividade de água (A_w), baixo potencial de óxido-redução, alto teor de sal e a depleção de lactose combinados com a acidez característica deste queijo como fatores que inviabilizaram a sobrevivência da bactéria.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Características da Indústria

O laticínio onde foi realizado o estudo situa-se na região de Campinas, Estado de São Paulo. Trata-se de uma indústria de pequeno porte onde são processados em torno de 4 – 7 mil litros de leite diários, provenientes de 68 produtores localizados em um raio de 6 a 35 km de distância do laticínio. Os produtos fabricados no local são: queijo Minas frescal, queijo Minas padrão e ricota que são distribuídos na região e na capital do Estado.

4.2. Material Utilizado para Isolamento e Identificação

4.2.1. Isolamento e Identificação de *Listeria monocytogenes*

- Esponjas de celulose estéreis para amostragem de superfícies (*Speci-Sponge Bags, Nasco*)
- Solução cloro-neutralizante de tiosulfato de sódio⁺
- Caldo de Enriquecimento para *Listeria* (*Listeria Enrichment Broth, Oxoid*)
- Caldo Fraser Modificado (*Modified Fraser Broth, Oxoid*)
- Ágar Oxford Modificado (*Modified Oxford Agar, Oxoid*)
- Ágar Trypticase de Soja Extrato de Levedura (*Trypticase Soy Agar-Yeast Extract, Oxoid*)
- Ágar-Sangue de Equino (*Horse Blood Agar, Oxoid, Laboratório Boa Vista*)
- Ágar Motilidade (*Motility Test Medium*)*
- Ágar para Teste de Fermentação de Carboidratos: (manitol, ramnose e xilose)*
- *Kit API Listeria System (BioMérieux)*

- Obs: * elaborados com ingredientes oriundos de diversas marcas comerciais, segundo formulação recomendada pelo CHFB (*Canadian Health and Food Branch, 2001*).
- + elaborados em laboratório, através de solução tampão-fosfato *Butterfield*, segundo recomendação APHA (*American Public Health Association, 2001*) adicionado de 5% de solução cloro-neutralizante (tiosulfato de sódio), segundo formulação do produto *D-E Neutralizing Broth, Difco*.

4.2.2. Isolamento e Identificação de *Bacillus cereus*

- Esponjas de celulose estéreis para amostragem de superfícies (*Speci-Sponge Bags, Nasco*)
- Solução de rinsagem cloro-neutralizante de tiosulfato de sódio⁺
- Solução Tampão-fosfato *Butterfield* (*Butterfield's Phosphate-buffered dilution water*)^{*}
- Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina (*Mannitol-Egg Yolk-Polimixin Agar, Difco*)
- Ágar Nutriente (*Nutrient Agar, Merck*)
- Caldo Glicose-Vermelho de Fenol (*Fenol Red Glucose Broth*)^{*}
- Caldo Nitrato (*Nitrate Broth*)^{*}
- Caldo VP Modificado (*Modified VP Medium*)^{*}
- Ágar Tirosina (*Tyrosine Agar*)^{*}
- *Kit Bacillus Diarrhoeal Enterotoxin Visual Immunoassay – BDE-VIA* (*TECRA International Pty.*)

- Obs: * elaborado com ingredientes oriundos de diversas marcas comerciais, segundo formulação recomendada pelo FDA (*U.S. Food and Drugs Administration, 2001*).
- + elaborado em laboratório, através de solução tampão-fosfato *Butterfield*, segundo recomendação APHA (*American Public Health Association, 2001*), adicionado de 5% de solução cloro-neutralizante (tiosulfato de sódio), segundo fórmula do produto *D-E Neutralizing Broth, Difco*.

4.3. Metodologia

4.3.1. Coleta das Amostras

Leite

Foram analisadas 13 amostras de leite, sendo 6 amostras de leite cru e 7 amostras de leite pasteurizado. Cada amostra foi formada através da mistura de 10 alíquotas de 100ml de leite cru ou pasteurizado, coletadas aleatoriamente durante todo o período de produção do dia, totalizando 1000ml por unidade amostral.

Queijos

Um total de 25 queijos Minas frescal foi analisado em todo o trabalho, sendo que em cada uma das coletas, 5 unidades amostrais foram analisadas, segundo recomendação da Resolução - RDC 12, de 02 de janeiro de 2001 (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2001).

Amostras Ambientais

Foram coletadas 120 amostras de superfícies das instalações, equipamentos e utensílios da linha de produção após os procedimentos de limpeza e sanitização da planta, somando 24 amostras em cada uma das 5 coletas.

A amostragem foi realizada utilizando-se o método de contato direto de esponja, que consistiu na pressão e arraste de esponja estéril de celulose embebida em 10 ml de solução de rinsagem cloro-neutralizante pelo local a ser analisado, segundo recomendado pela *American Public Health Association* - APHA (2001). A área a ser analisada foi estabelecida de acordo com o local, sendo 400cm² para drenos, 75cm² para a bomba de transporte de soro e 2500cm² para os demais locais.

Os locais sujeitos à coleta de material de amostras ambientais estão discriminados na *Figura 1*.

Os materiais coletados foram acondicionados em caixas isotérmicas contendo barras de gel eutético congelado em seu interior sendo, então, levados ao laboratório e analisados no prazo de 18 – 24h.

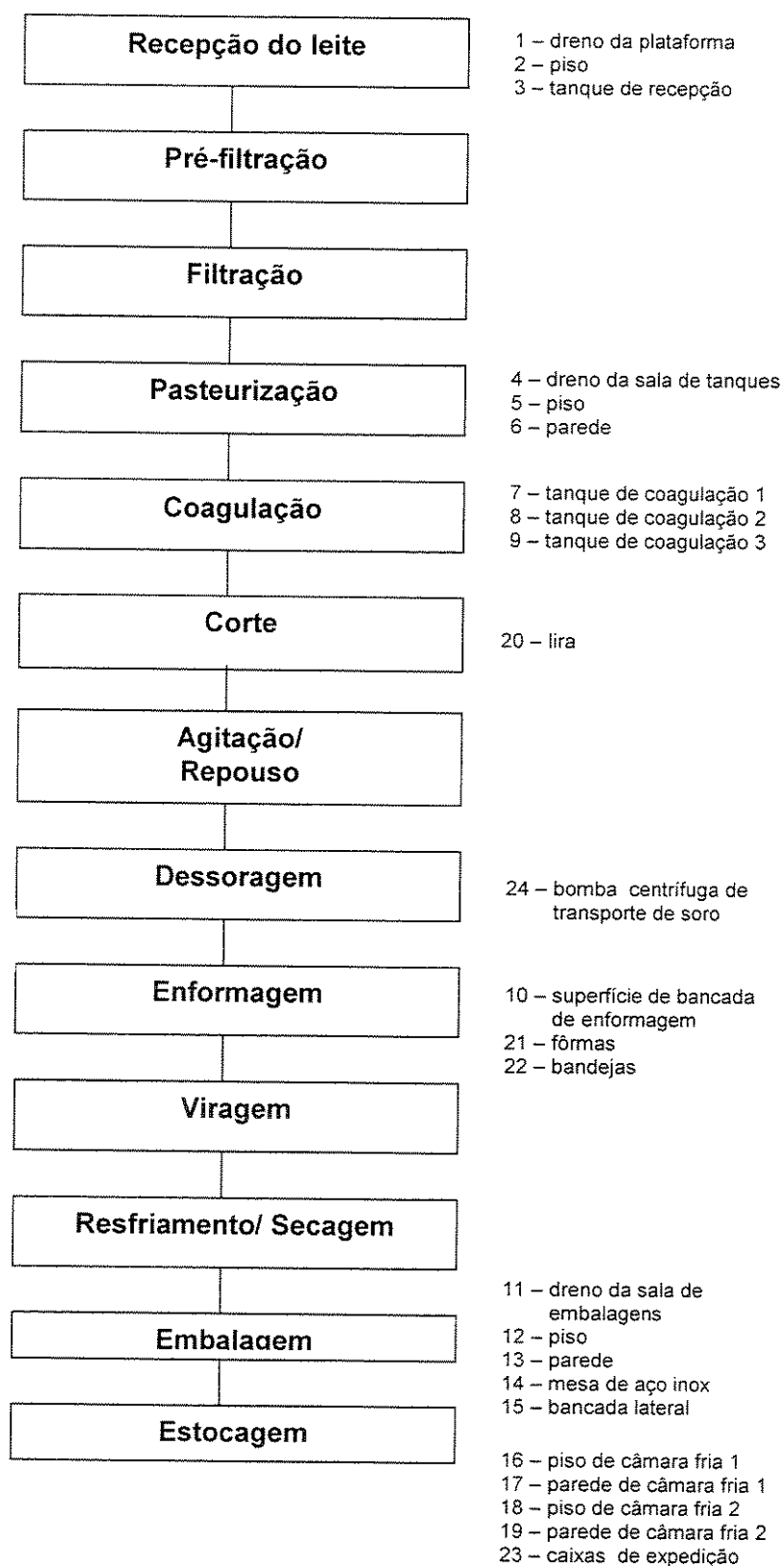


Figura 1. Fluxograma de produção do queijo Minas frescal e pontos de amostragem ambiental.

4.3.2. Detecção e Caracterização Bioquímica de *L. monocytogenes*

As análises foram realizadas segundo metodologia recomendada pelo *Canadian Health Product and Food Branch* (2002), associando-se à etapa de confirmação à identificação por meio do *Kit API Listeria* (BioMérieux).

Leite

Porções de 25ml da amostra de leite foram homogeneizadas em 225ml de caldo *Listeria Enrichment Broth* (LEB) na etapa de enriquecimento das amostras, sendo incubadas a 35°C por até 48h. Na etapa de enriquecimento seletivo, após 24h e 48h de incubação do caldo LEB, inoculou-se 0,1ml deste meio em caldo *Modified Fraser Broth* (MFB) incubando-se os tubos a 35°C por 24h.

Para a etapa de isolamento os meios MFB indicativos de cultura positiva para *Listeria* spp. (meios com coloração enegrecida devido à hidrólise da esculina em presença de íons férricos) foram estriados em ágar Oxford modificado e ágar LPM, incubando-se a 35°C por 24-48h e a 30°C por 24-48h respectivamente.

Na etapa de confirmação foram selecionadas cinco colônias com características positivas para *Listeria* spp. em cada placa dos meios de cultura anteriormente citados sendo submetidas aos seguintes testes: prova de hemólise, prova de motilidade, prova de utilização de carboidrato e prova de catalase. Isolados que mesmo após as provas confirmatórias suscitaram dúvidas quanto à identificação, tiveram a classificação de espécie confirmada através do *Kit API Listeria*.

Queijos

Vinte e cinco gramas das amostras de queijo foram homogeneizadas em 225ml de caldo *Listeria Enrichment Broth* (LEB) na etapa de enriquecimento das amostras, sendo incubadas a 35°C por 48h. A partir deste ponto as amostras

seguiram para a etapa de enriquecimento seletivo e demais processos semelhantemente ao descrito para as amostras de leite.

Amostras ambientais

As esponjas foram imersas em 100ml de caldo LEB sendo vigorosamente agitadas por 1 minuto para permitir o contato efetivo do material coletado na esponja com o caldo. Incubou-se a 35°C por 48h, seguindo a partir deste ponto para a etapa de enriquecimento seletivo e demais processos semelhantemente ao descrito para as amostras de leite.

4.3.3. Detecção, Enumeração e Caracterização Bioquímica de *B. cereus*

As análises foram realizadas segundo metodologia recomendada pelo *U.S. Food and Drug Administration* (2002). Para o procedimento específico de tratamento térmico na enumeração de esporos de *B. cereus* foi utilizada metodologia recomendada pela *American Public Health Association* - APHA (2001).

Leite

Amostras de leite cru e pasteurizado foram analisadas para a quantificação de células vegetativas e esporos de *B. cereus*. Unidades analíticas de 50ml das amostras foram homogeneizadas em 450ml de tampão-fosfato *Butterfield* sendo realizadas diluições decimais subseqüentes utilizando-se o mesmo tipo de solução tampão. Os volumes que abrangeram 1ml e 0,1ml de amostra de leite e 0,1ml de cada diluição decimal foram espalhados em superfície de ágar *Mannitol-Egg Yolk-Polymixyn* (MYP), sendo incubados a 30°C /24h. Após contagem, cinco colônias típicas de *B. cereus* foram isoladas e submetidas aos seguintes testes de confirmação: coloração de Gram, prova da utilização da glicose em anaerobiose, prova de redução de nitrato a nitrito, prova de Voges-Proskauer, prova de decomposição de tirosina e prova de crescimento em presença de lisozima. Estas

mesmas colônias do grupo *B. cereus* ainda foram submetidas à análise para identificação da espécie: prova de motilidade, atividade hemolítica e ausência de cristais parasporais.

Para a quantificação de esporos de *B. cereus* unidades analíticas de 50ml das amostras foram previamente submetidas a tratamento térmico de 70°C/10min seguido de imediato resfriamento à temperatura ambiente, conforme recomendação da *American Public Health Association* - APHA (2001), seguindo a partir deste ponto procedimento semelhante ao utilizado para a quantificação, isolamento e confirmação de células vegetativas do microrganismo.

Queijos

Unidades analíticas de 50g de amostra foram homogeneizadas em 450ml de solução de citrato de sódio 2% sendo realizadas diluições decimais subseqüentes através da utilização de solução tampão-fosfato *Butterfield*. Aliquotas de 0,1ml de cada diluição decimal foram espalhadas em superfície de ágar *Mannitol-Egg Yolk-Polymixyn* (MYP), sendo as placas incubadas a 30°C /24h e as colônias características de *B. cereus* enumeradas. A partir deste ponto os procedimentos posteriores seguiram metodologia semelhante à utilizada para a quantificação, isolamento e confirmação do microrganismo em leite.

Amostras Ambientais

Volumes da solução de rinsagem que abrangeram 1ml, 0,1ml, além de 0,1ml de suas diluições decimais (em tampão-fosfato *Butterfield*) foram espalhados em superfície de ágar MYP e incubados a 30°C /24h; após este período, as colônias características de *B. cereus* foram enumeradas. A partir deste ponto, seguiu-se metodologia semelhante às utilizadas para análise das amostras de leite.

Cada alíquota de 1ml da solução de rinsagem correspondeu a 40cm² de área analisada dos drenos, 7,5cm² de área da bomba de transporte de soro e 250cm² da área analisada dos demais locais.

4.3.4. Pesquisa de Produção de Enterotoxina Diarréica por *B. cereus* Isolados de Queijo Minas Frescal

Foram selecionadas 20 colônias de *B. cereus* isoladas dos queijos para detecção de enterotoxina diarréica visando avaliar o risco que tais culturas contaminantes poderiam trazer para o consumidor destes queijos.

As colônias selecionadas foram reativadas através de inoculação em caldo BHI adicionado de 5% de glicose e incubadas a 35°C por 24h, seguindo a partir daí, as recomendações constantes no manual do fabricante do *Kit Bacillus Diarrhoeal Enterotoxin Visual Immunoassay – BDE-VIA (TECRA International Pty.)*.

Foi utilizado como controle positivo substrato contendo enterotoxina diarréica e como controle negativo diluente padrão. Ambos acompanhavam o *kit*.

4.4. Descrição das Principais Alterações do Ambiente de Processamento de Queijo Minas Frescal ao Longo das Coletas de Amostras

Durante as coletas a indústria sofreu reformas civis e alterações no fluxo de processamento as quais serão descritas a seguir. A 1ª coleta foi realizada antes das reformas civis conforme *layout* mostrado na *Figura 2*. Na 2ª coleta, as reformas estavam em andamento com a sala de tanques vedada para circulação de pessoas. Isto incorreu na alteração de quatro locais de amostragem: dreno, piso e parede da sala de tanques, além da superfície da bancada de enformagem (Ver item 4.4.2.). Após as reformas (3ª, 4ª e 5ª coletas) os pontos de amostragem foram os mesmos do período da 1ª coleta.

4.4.1. Características da Indústria no Período da 1ª Coleta de Amostras

Procedimentos de Higienização

Limpeza

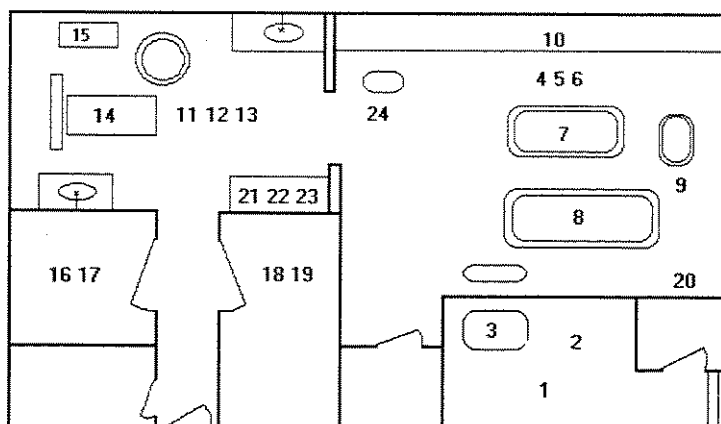
- Procedimentos de limpeza realizados apenas no final do expediente de trabalho.
- Pisos e paredes: detergente neutro.
- Mesas e bancadas: detergente neutro.
- Tanques de coagulação: detergente neutro.
- Pasteurizadora: sistema *cleaning-in-place*.
- Utensílios (fôrmas, bandejas, liras, pás): detergente neutro com enxágüe sob água fria.
- Instalações sanitárias: detergente neutro.

Sanitização

- Procedimentos realizados apenas no final do expediente de trabalho.
- Pisos e paredes: enxágüe simples com solução clorada residual oriunda da sanitização de utensílios.
- Mesas e bancadas: enxágüe simples com solução clorada residual oriunda da sanitização de utensílios.
- Tanques de coagulação: enxágüe simples com solução clorada residual oriunda da sanitização de utensílios.
- Pasteurizadora: sistema *cleaning-in-place*
 - Enxágüe com água clorada (1-2 mg de cloro/l);
 - Circulação de hidróxido de sódio 0,4% a 85 °C por 25 minutos;
 - Enxágüe com água a 65°C, sem tempo definido;
 - Circulação de ácido nítrico 0,5% a 65 °C por 25 minutos;
 - Enxágüe com água para remoção de ácido;
 - Circulação de solução clorada (400 mg de cloro/l) por 25 minutos, sendo que esta solução permanecia no equipamento até o dia seguinte. Antes do início da pasteurização do dia seguinte, a solução

de cloro era removida com auxílio de enxágüe com água clorada (1-2 mg de cloro/l).

- Utensílios (fôrmas, bandejas, liras, pás): solução clorada sem dosagem definida, sem tempo de contato definido.
- Instalações sanitárias: solução clorada sem dosagem definida.



Legenda

- | | |
|--|----------------------------------|
| 1 – dreno da plataforma de recepção | 13 – parede |
| 2 – piso da plataforma de recepção | 14 – mesa de aço inox |
| 3 – tanque de recepção | 15 – bancada lateral |
| 4 – dreno da sala de tanques | 16 – piso de câmara fria 1 |
| 5 – piso da sala de tanques | 17 – parede de câmara fria 1 |
| 6 – parede da sala de tanques | 18 – piso de câmara fria 2 |
| 7 – tanque de coagulação 1 | 19 – parede de câmara fria 2 |
| 8 – tanque de coagulação 2 | 20 – lira |
| 9 – tanque de coagulação 3 | 21 – fôrmas |
| 10 – superfície de bancada de enformagem | 22 – bandejas |
| 11 – dreno da sala de embalagens | 23 – caixas de expedição |
| 12 – piso | 24 – bomba de transporte de soro |

Figura 2. Layout da indústria processadora de queijos Minas frescal, com indicação dos locais durante a 1ª coleta de amostras.

4.4.2. Características da Indústria no Período da 2ª Coleta de Amostras

No período desta coleta a reforma estava sendo realizada na sala de tanques, que não estava sendo utilizada, sendo os tanques de coagulação 1, 2 e 3 transferidos para a sala de embalagens já reformada. A reforma consistiu, entre

outros itens, no aumento da área geral da sala e a troca geral do revestimento de pisos e paredes. Drenos estavam sendo novamente cimentados e suas grades trocadas. Janelas de ferro foram trocadas por outras de alumínio. Telas de proteção fixas contra pragas foram trocadas por outras de retirada rápida. Instalação de maior número de exaustores e instalação de luminárias com proteção contra quebras.

Os tanques de coagulação foram deslocados para a sala de embalagens. O pasteurizador não foi removido de modo que o leite pasteurizado era transportado até os tanques através de encanamento de alumínio.

A sala de tanques foi vedada para circulação de pessoas da produção. O bloqueio entre a área de trabalho e a área de reforma foi montado com placas de madeira compensada. Deste modo, as amostragens do dreno, piso e parede da sala de tanques, além da superfície da bancada de enformagem não foram realizadas. Tais pontos de amostragem foram substituídos por outros que, naquele momento, possuíam a mesma função dos locais anteriores. Assim, a amostra do dreno da sala de tanques foi substituída por amostra do dreno que servia ao escoamento provisório dos tanques. As amostras de piso e parede da sala de tanques foram substituídas por amostras de piso e parede próximas à localização provisória dos tanques. A amostra de superfície de bancada de enformagem foi substituída por amostra da bancada onde provisoriamente era realizada a enformagem dos queijos.

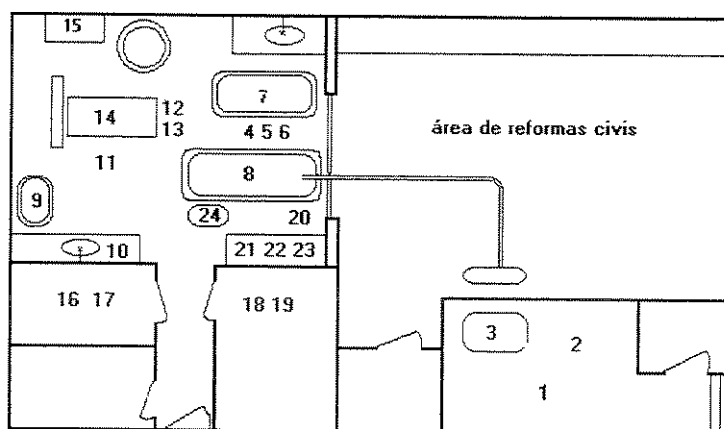
Procedimentos de Higienização

Limpeza

- Idêntica ao da 1ª coleta.

Sanitização

- Idêntica ao da 1ª coleta.



Legenda

- | | |
|--|----------------------------------|
| 1 – dreno da plataforma de recepção | 13 – parede |
| 2 – piso da plataforma de recepção | 14 – mesa de aço inox |
| 3 – tanque de recepção | 15 – bancada lateral |
| 4 – (substituição do) dreno da sala de tanques | 16 – piso de câmara fria 1 |
| 5 – (substituição do) piso da sala de tanques | 17 – parede de câmara fria 1 |
| 6 – (substituição da) parede da sala de tanques | 18 – piso de câmara fria 2 |
| 7 – tanque de coagulação 1 | 19 – parede de câmara fria 2 |
| 8 – tanque de coagulação 2 | 20 – lira |
| 9 – tanque de coagulação 3 | 21 – fôrmas |
| 10 – (substituição da) superfície de bancada de enformagem | 22 – bandejas |
| 11 – dreno da sala de embalagens | 23 – caixas de expedição |
| 12 – piso | 24 – bomba de transporte de soro |

Figura 3. Layout da indústria processadora de queijos Minas frescal com indicação dos locais durante a 2ª coleta de amostras.

4.4.3. Características da Indústria no Período da 3ª Coleta de Amostras

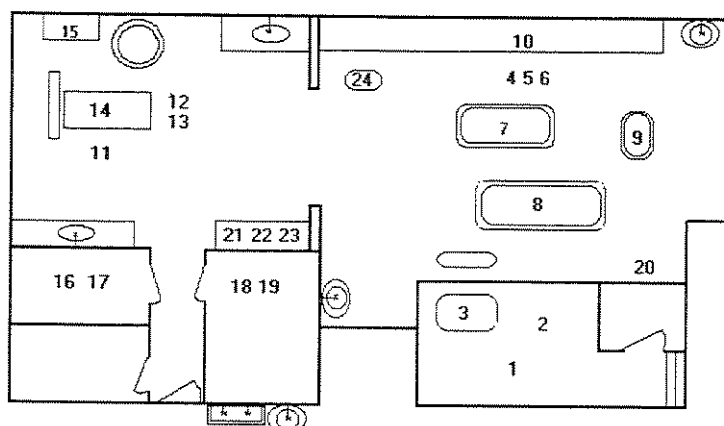
Procedimentos de Higienização

Limpeza

- Idênticos aos da 1ª coleta.

Sanitização

- Idênticos aos da 1ª coleta.



Legenda

- | | |
|--|----------------------------------|
| 1 – dreno da plataforma de recepção | 13 – parede |
| 2 – piso da plataforma de recepção | 14 – mesa de aço inox |
| 3 – tanque de recepção | 15 – bancada lateral |
| 4 – (substituição do) dreno da sala de tanques | 16 – piso de câmara fria 1 |
| 5 – (substituição do) piso da sala de tanques | 17 – parede de câmara fria 1 |
| 6 – parede da sala de tanques | 18 – piso de câmara fria 2 |
| 7 – tanque de coagulação 1 | 19 – parede de câmara fria 2 |
| 8 – tanque de coagulação 2 | 20 – lira |
| 9 – tanque de coagulação 3 | 21 – fôrmas |
| 10 – superfície de bancada de enformagem | 22 – bandejas |
| 11 – dreno da sala de embalagens | 23 – caixas de expedição |
| 12 – piso | 24 – bomba de transporte de soro |

Figura 4. Layout da indústria processadora de queijos Minas frescal com indicação dos locais durante as 3ª, 4ª e 5ª coletas de amostras

4.4.4. Características da Indústria no Período da 4ª Coleta de Amostras

Procedimentos de Higienização

Limpeza

- Idênticos aos da 1ª coleta.

Sanitização

- Procedimentos realizados apenas no final do expediente de trabalho.
- Pisos e paredes: enxágüe simples com solução clorada residual oriunda da sanitização de utensílios e enxágüe simples com solução de hidróxido de sódio sem concentração definida.

- Mesas e bancadas: enxágüe simples com solução clorada residual oriunda da sanitização de utensílios e enxágüe simples com solução de hidróxido de sódio sem concentração definida.
- Tanques de coagulação: enxágüe simples com solução clorada residual oriunda da sanitização de utensílios e enxágüe simples com solução de hidróxido de sódio sem concentração definida.
- Pasteurizadora: sistema *cleaning-in-place* semelhantemente à 1ª coleta.
- Utensílios (fôrmas, bandejas, liras, pás): solução clorada sem dosagem definida, sem tempo de permanência definido e enxágüe simples com solução de hidróxido de sódio sem concentração definida.
- Instalações sanitárias: solução clorada sem dosagem definida.

Layout

- Idêntico ao da 3ª coleta.

4.4.5. Principais Características da Indústria no Período da 5ª Coleta de Amostras

Procedimentos de Higienização

Limpeza

- Seguindo sugestões descritas no *Apêndice A*.

Sanitização

- Seguindo sugestões descritas no *Apêndice A*.

Layout

- Idêntico ao da 3ª coleta

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a fase de coleta de amostras a empresa sofreu reformas civis das instalações e alterações no fluxo de processamento que refletiram, em especial, nas contagens de *B. cereus* verificadas em cada coleta. A 1ª coleta foi realizada na indústria ainda sem reformas, com o piso cerâmico da planta apresentando rachaduras e áreas com o contra-piso exposto, dificultando os procedimentos de limpeza e sanitização. Na 2ª coleta, a empresa manteve o processamento de queijos mesmo durante as reformas civis (troca de pisos e revestimento de paredes) comprometendo assim a manutenção de um ambiente limpo durante o processamento. A 3ª e a 4ª coletas foram realizadas na indústria após o término das reformas, porém, permanecendo com protocolos de higienização inadequados. Particularmente durante o período da 4ª coleta, houve a adoção de protocolo não usual de higienização da planta industrial com a utilização de solução de hidróxido de sódio sem controle dos parâmetros de concentração, tempo de contato, temperatura ou cuidados na aplicação. A 5ª coleta foi realizada após a recomendação e aplicação de métodos mais adequados para a higienização das instalações (vide *Apêndice A*).

5.1. Avaliação da Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Do total de 120 amostras de superfícies de ambientes e equipamentos analisadas, 22 amostras (17,5%) apresentaram resultados positivos para *Listeria* spp.

As reformas civis ocorrentes no laticínio (2ª coleta) e a alteração dos procedimentos de higienização a partir da 4ª coleta aparentemente não influenciaram no perfil de contaminação por *Listeria* spp., sendo estas isoladas antes e depois do referidos eventos.

O Quadro 1 mostra as espécies de listeria encontradas e os respectivos locais de isolamento.

Quadro 1. Incidência de diferentes espécies de listeria em superfícies de ambiente, equipamentos e utensílios em indústria processadora de queijo Minas frescal.

Local de Amostragem		1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta	5ª coleta
Plataforma de recepção	dreno				<i>L. grayi</i>	<i>L. grayi</i>
	piso					
	tanque					
Sala de Tanques	dreno		* <i>L. seeligeri</i>	<i>L. seeligeri</i>		<i>L. seeligeri</i>
	piso	<i>L. seeligeri</i>	**		<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimerii</i>
	parede		**			
	tanque 1 (aço inoxid.)	<i>L. seeligeri</i>				
	tanque 2 (aço inoxid.)					
	tanque 3 (polietileno)					
	bancada de enformagem		***			
Sala de embalagem	dreno					
	piso			<i>L. innocua</i>		
	parede					
	mesa de aço inox	<i>L. innocua</i>				
	bancada lateral					
Câmara fria 1	piso	<i>L. seeligeri</i> <i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. seeligeri</i>
	parede					
Câmara fria 2	piso	<i>L. innocua</i>		<i>L. seeligeri</i>		<i>L. seeligeri</i>
	parede					
Utensílios	lira de inox					
	fôrmas de queijo					
	bandejas					
	caixas de expedição					
Equipamento	bomba de transporte de soro				<i>L. welshimerii</i>	<i>L. welshimerii</i>

Obs.: * referente ao dreno provisoriamente responsável pelo escoamento dos tanques de coagulação durante a 2ª coleta;

** referente ao piso e parede mais próximos aos tanques de coagulação durante a 2ª coleta;

*** referente à bancada onde provisoriamente eram enformados os queijos durante 2ª coleta.

Apesar de identificadas *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimerii* e *L. grayi*, não se isolou *L. monocytogenes*, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Porcentagem de espécies de listeria identificadas em relação ao total de isolados em laticínio produtor de queijo Minas frescal.

Espécie isolada	Frequência de isolamento	% do total de isolados
<i>L. seeligeri</i>	13	59,1
<i>L. innocua</i>	4	18,2
<i>L. welshimerii</i>	3	13,6
<i>L. grayi</i>	2	9,1
Total	22	100

L. seeligeri foi a espécie mais isolada e mais disseminada pela planta de processamento (Tabelas 1 e 2) representando 59,1% do total de isolados. Em menores quantidades foram isoladas as demais espécies, que somadas representam 40,9% do total. O isolamento de *L. seeligeri* nesta proporção difere de trabalhos de outros autores onde *L. innocua* foi a espécie de maior incidência, sendo a primeira muitas vezes não isolada (Moura *et al.*, 1993; Pritchard *et al.*, 1995; Menendez *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2003).

Apesar de *L. monocytogenes* não ter sido isolada em nenhuma das amostras, a presença das demais espécies de forma persistente e disseminada deve ser considerada como um fato importante. Neste aspecto, Tompkin (2002) afirma a necessidade de pronta resposta à presença de qualquer espécie de listeria com o mesmo rigor dispensado à *L. monocytogenes* através de procedimentos de limpeza e sanitização efetivos para a redução dos microrganismos.

Tabela 2. Locais de isolamento de espécies de listeria em laticínio produtor de queijo Minas frescal.

Espécie isolada	Local de amostragem
<i>L. grayi</i>	Dreno da plataforma
<i>L. welshimerii</i>	Piso da sala de tanques Bomba de transporte de soro
<i>L. innocua</i>	Piso da sala de embalagem Mesa central da sala de embalagem Piso da câmara fria 1 Piso da câmara fria 2
<i>L. seeligeri</i>	Dreno da sala de tanques de coagulação Dreno de escoamento provisório dos tanques de coagulação (2ª coleta) Piso da sala de tanques de coagulação Tanque de coagulação 1 Piso da câmara fria 1 Piso da câmara fria 2

Dentre as amostras de leite cru e pasteurizado analisadas não foram encontradas listerias. Pesquisa realizada por Kozak *et al.* (1996) descreve que apenas 3-4% do leite cru produzido nos EUA, Canadá e Europa são contaminados por bactérias do gênero *Listeria*. A maior prevalência de *Listeria* spp. no ambiente e equipamentos que no leite foi descrita em trabalho realizado em indústrias de laticínios por Kells & Gilmour (2004).

Em 25 amostras de queijo analisadas durante as cinco coletas não foram encontradas listerias. A baixa ocorrência do microrganismo em queijo também foi descrita em pesquisa realizada por Silva *et al.* (1998) onde 12 queijos Minas frescal foram analisados, sendo isolado *L. innocua* em 1 amostra. Cassarotti *et al.* (1994) não isolaram o microrganismo em 20 amostras do mesmo tipo de queijo. Slade (1992) consideram que o crescimento de *Listeria* spp. parece ser dependente de sua habilidade de superar com sucesso os microrganismos competidores.

Em superfícies que contatam o alimento isolou-se listeria nas amostras de tanque de coagulação, mesa de aço inoxidável da sala de embalagem e bomba de transferência de soro. O isolamento de várias espécies do gênero *Listeria* nestas superfícies evidencia o risco potencial de contaminação do produto por *L. monocytogenes*. Gudbjörndóttir *et al.* (2004) em trabalho sobre incidência de *L. monocytogenes* em plantas de processamento de carne bovina, aves e frutos do mar relatam que 11,5% das amostras de superfícies de contato direto com o alimento estavam contaminadas com o microrganismo mesmo após a higienização dos locais. Os autores afirmam que procedimentos ineficazes de higienização podem permitir a formação de biofilmes com a incorporação de listerias, vindo assim a contaminar os alimentos contínua ou esporadicamente durante a produção. Tais superfícies requerem especial atenção quando do planejamento de rotinas para limpeza e desinfecção.

Kabuki *et al.* (2004) em trabalho realizado junto a plantas de produção de queijos frescos, detectaram elevada taxa de contaminação por *L. monocytogenes* em pisos e drenos, com 30% e 20,6% de amostras positivas respectivamente. Nosso trabalho constatou a presença de *Listeria* spp. em drenos e pisos de quase todas as áreas de processamento. Este fato deve ser considerado na melhoria do programa de limpeza e sanitização tendo em vista o perigo de um foco persistente de contaminação dentro da planta. Pesquisa conduzida por Kells & Gilmour (2004) em superfícies de ambiente e equipamentos de duas indústrias de laticínios relatam os drenos como importantes fontes de contaminação por *Listeria* no ambiente de produção. A limpeza dos pisos com jato d'água de alta pressão poderia permitir a formação de aerossóis contaminados resultando na transferência de microrganismos dos pisos e drenos para outros locais. Spurlock & Zottola (1991) demonstram a viabilidade de *L. monocytogenes* em aerossóis por até 210 minutos.

A presença constante de *Listeria* spp. nos pisos das câmaras frias em todas as coletas evidencia a característica psicrotrófica do gênero além da sua persistência em locais de higienização não freqüente. Um número considerável de

isolamentos em áreas mantidas a baixa temperatura em laticínios também foi descrito por Pritchard *et al.* (1995). Neste trabalho, em 63 amostras ambientais com isolamento de listeria, 11 (17,5%) eram provenientes de refrigeradores e freezers. Sergelidis *et al.* (1997) analisaram superfícies de pisos e prateleiras de 395 refrigeradores entre domésticos, comerciais e industriais (plantas de laticínios e de produtos cárneos) onde encontraram *L. monocytogenes* (1,8%), *L. innocua* (2,5%) e *L. seeligeri* (0,2%). Tratando em especial dos refrigeradores industriais os autores atribuem a contaminação por *Listeria* spp. à falha geral de aplicação das Boas Práticas de Fabricação, ressaltando ainda o risco de contaminação cruzada ao produto final.

Outro fator a ser considerado é a possibilidade de contaminação do ambiente das câmaras-frias através do ar insuflado pelos evaporadores. Evans *et al.* (2004) analisaram os evaporadores de câmaras-frias em 15 plantas de processamento de vários tipos de alimentos onde os equipamentos possuíam rotinas irregulares de limpeza. Apesar de não encontrarem microrganismos do gênero *Listeria*, a presença de microrganismos viáveis totais atingiu contagens acima de 10^3 UFC/cm² em todos os evaporadores. Apesar deste trabalho não ter abrangido tal local para análise, estudos posteriores envolvendo os equipamentos são oportunos.

A capacidade de persistência de cepas de listeria, em especial a de *L. monocytogenes* foi demonstrada em amplo trabalho realizado por Holah *et al.* (2004) onde foram analisadas 196.000 amostras de produtos acabados e 750.000 amostras ambientais de empresas de alimentos resfriados, onde se constatou a presença de ribotipos específicos de *L. monocytogenes* na indústria por até 13,8 meses. Os autores afirmam ainda que a origem dessa persistência pode ser creditada a vários fatores desde a adaptação física das bactérias (adesão de superfície, formação de biofilme, resistência à limpeza e sanitização, etc.) até o favorecimento por condições típicas em ambientes de indústria de alimentos resfriados (baixa temperatura, ampla faixa de pH, suprimento de nutrientes, frequência inadequada de limpeza e sanitização, etc.).

5.2. Avaliação da Pesquisa de *Bacillus cereus*

Analisando a *Tabela 3*, verifica-se que o leite apresentou grande variabilidade de contaminação durante as coletas, atingindo valores de até 7×10^5 UFC/ml e $3,0 \times 10^1$ esporos/ml no leite cru e valores de $2,5 \times 10^4$ UFC/ml e $1,9 \times 10^4$ esporos/ml no leite pasteurizado. Meer *et al.* (1991) citam em sua revisão uma ampla variação nas concentrações de esporos do microrganismo em leite pasteurizado, abrangendo desde valores menores que 0,5 até 3×10^2 esporos /ml.

Tabela 3. Contagens de células vegetativas e esporos de *B. cereus* em leite cru e pasteurizado (UFC/ml, esporos/ml).

Amostra	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta	5ª coleta
Leite cru – cel. veget.	$5,3 \times 10^2$	nd	$1,7 \times 10^4$	nd	7×10^5
Leite cru – esporos	$3,0 \times 10^1$	nd	$2,6 \times 10^1$	nd	<1
Leite past. – cel. veget.	nd	$2,5 \times 10^4$	3,3	nd	$3,0 \times 10^1$
Leite past. – esporos	$1,3 \times 10^2$	$1,9 \times 10^4$	1,1	nd	<1

Obs: nd – não determinado.

Lin *et al.* (1998), em pesquisa com 232 amostras de leite, constataram baixa incidência de células vegetativas do microrganismo em leite cru (menos de 50 UFC/ml); porém, uma elevada concentração de esporos, com valor médio acima de 10^5 esporos/ml. O leite pasteurizado também apresentara elevada concentração de *B. cereus*, com valores acima de 10^5 UFC/ml. Os autores afirmam que a presença de *B. cereus* no ambiente indica uma fonte potencial de contaminação do leite e ainda, que a contaminação do ambiente da usina pode ser oriunda do leite contaminado. De fato, ambas afirmações não se contradizem tendo em vista o círculo vicioso que se forma levando à persistência do microrganismo no laticínio.

Dentre as 120 amostras de ambiente e superfície de equipamento coletadas houve grande variação no grau de contaminação dos locais de amostragem. As análises revelaram desde locais com populações menores que 1

UFC/cm² até $2,6 \times 10^4$ UFC/cm², como na bomba de transporte de soro. Drenos e pisos apresentaram constante contaminação por *B. cereus* com contagens variando, na maioria das coletas, em torno de 10 a 10^3 UFC/cm² (Quadro 2).

Dentre as superfícies que contatam diretamente a matéria-prima e o produto final (tanques, fôrmas, bandejas, etc.) os tanques de coagulação apresentaram, durante a pesquisa, valores abaixo de 1 UFC/cm², com exceção feita à 2ª coleta onde foram encontrados valores de $5,1 \times 10$ UFC/cm² e $1,0 \times 10$ UFC/cm² nos tanques 1 e 2, respectivamente. As reformas civis daquele período podem ter contribuído para tal resultado face às condições inadequadas de higienização do local. O tanque de polietileno manteve contagens abaixo de 1 UFC/cm². Sua utilização também como tanque para sanitização de fôrmas e bandejas comportando solução clorada por longos períodos pode ter colaborado para a manutenção das baixas contagens. As fôrmas de queijo permaneceram com valores menores que 1 UFC/cm². As contagens nas bandejas para queijo que chegaram a valores de até $1,5 \times 10^3$ UFC/cm² durante a 2ª coleta, tiveram sua contagem reduzida para valores menores que 1 UFC/cm² na 4ª e 5ª coletas. Dentre as amostras de superfície, a lira apresentou a maior contagem de *B. cereus*, atingindo $1,5 \times 10^5$ UFC/cm² durante a segunda coleta. As condições insatisfatórias de sanitização ocorrentes, em especial durante aquela coleta, podem ter levado a valor tão elevado de contaminação.

Quadro 2. Contagem de *B. cereus* em superfícies de ambientes, equipamentos e utensílios (UFC/cm²) em indústria processadora de queijo Minas frescal.

Local de Amostragem		1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta	5ª coleta
Plataforma de recepção	Dreno	nd	1,3x10 ³	9,0x10 ²	2,8x10 ²	<1
	Piso	nd	1,4	1,3x10 ²	5,6x10 ²	<1
	Tanque	<1	<1	<1	<1	<1
Sala de Tanques	Dreno	3,7	1,3x10 ³ *	3,5x10 ²	2,5x10 ¹	2,5x10 ¹
	Piso	nd	2,9 **	2,0	4x10 ³	1,4
	Parede	2	6,7x10 ³ **	<1	<1	<1
	tanque 1 (aço inoxid.)	<1	5,1x10 ¹	<1	<1	<1
	tanque 2 (aço inoxid.)	<1	1,0x10 ¹	<1	<1	<1
	tanque 3 (polietileno)	<1	<1	<1	<1	<1
	bancada de enformagem	<1	<1 ***	6,8	1,2x10 ¹	<1
Sala de embalagem	dreno	3,2x10 ¹	4,8x10 ²	9,8x10 ²	2,5x10 ¹	<1
	piso	nd	<1	2,2x10 ³	<1	<1
	parede	nd	1,2x10 ³	<1x10 ¹	<1	<1
	mesa de aço inox	<1	2,9x10 ¹	<1	<1	<1
	bancada lateral	<1	3,6x10 ¹	<1	<1	<1
Câmara fria 1	piso	<1	1,6x10 ²	<1	2,6x10 ²	1x10 ¹
	parede	<1	2,0x10 ¹	4	<1	<1
Câmara fria 2	piso	<1	1,0x10 ³	1,9x10 ³	8	1,6x10 ³
	parede	<1	2,2	<1	<1	<1
Utensílios	lira de inox	<1	1,5x10 ⁵	<1x10 ⁴	<10	7
	fôrmas de queijo	nd	<1	<1	<1	<1
	bandejas	nd	1,5x10 ³	2,2	<1	<1
	caixas de expedição	nd	<1	<1	<1	<1
Equipamento	bomba de transporte de soro	nd	1x10 ²	2,0x10 ²	2,1x10 ¹	2,6x10 ⁴

Obs: nd – não determinado;

* referente ao dreno provisoriamente responsável pelo escoamento dos tanques de coagulação durante a 2ª coleta;

** referente ao piso e parede mais próximos aos tanques de coagulação durante a 2ª coleta;

*** referente à bancada onde provisoriamente eram enformados os queijos durante 2ª coleta.

Drenos e pisos apresentaram variado grau de contaminação durante as coletas com contagens atingindo valores máximos em torno de 10³ UFC/cm². Paredes atingiram contagens de até 6,7x10³ UFC/cm², porém na maioria das coletas apresentou contaminação menor que 1 UFC/cm².

A bomba de transporte de soro de leite apresentou contaminação persistente durante as coletas chegando a 2,6x10⁴ UFC/cm² na 5ª coleta. A importância deste equipamento reside na sua utilização tanto para a remoção do soro de leite dos tanques de coagulação, quanto para a limpeza da planta ao término do processamento. Uma bomba de múltiplo uso mal higienizada poderia tornar-se fonte crônica de contaminação cruzada de instalações e equipamentos quando da sua utilização para o transporte de soro de leite e no enxágüe final pós-sanitização. Peng *et al.* (2001) demonstraram a capacidade de adesão dos

esporos e células vegetativas de *B. cereus* à superfície do aço inoxidável, comumente usado na indústria, podendo levar à produção de biofilmes que resultaria em maior resistência dos microrganismos ao calor e a processos de sanitização. Os autores relatam ainda o aumento da taxa de adesão do *B. cereus* a estas superfícies em presença de componentes do leite.

O grau de contaminação por *B. cereus* das unidades amostrais de queijos pertencentes a uma mesma coleta não apresentaram grandes variações entre si (Tabela 4). As amostras analisadas antes do período de reformas civis (primeira coleta) apresentaram contagens em torno de 10^5 UFC/g. Já durante as reformas (segunda coleta) observou-se uma elevação nos níveis de contaminação atingindo um valor médio de $1,3 \times 10^7$ UFC/g. Nas 3ª e 4ª coletas (terminadas as reformas) houve um decréscimo de dois ciclos logarítmicos na contagem de *B. cereus*, com valores em torno de 10^4 UFC/g. Na última coleta, a contaminação reduziu-se a valores menores que 1×10^3 UFC/g, provavelmente devido à utilização dos protocolos de higienização industrial sugeridos à direção da empresa após a 4ª coleta (vide apêndice B).

Tabela 4. Contagens de *B. cereus* em amostras de queijos Minas frescal (UFC/g).

Amostras	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta	5ª coleta
Unid. amostral 1	$4,5 \times 10^5$	$8,7 \times 10^6$	$6,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$< 1 \times 10^3$
Unid. amostral 2	$1,0 \times 10^6$	$1,6 \times 10^7$	$5,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$< 1 \times 10^3$
Unid. amostral 3	$7,3 \times 10^5$	$8,0 \times 10^6$	$< 1,0 \times 10^4$	$4,9 \times 10^4$	$< 1 \times 10^3$
Unid. amostral 4	$3,3 \times 10^5$	$2,0 \times 10^7$	$4,0 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$	$< 1 \times 10^3$
Unid. amostral 5	$1,7 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	$3,0 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	$< 1 \times 10^3$

5.2.1. Pesquisa de Produção de Enterotoxina Diarréica por *B. cereus* Isolados de Queijo Minas Frescal

De vinte isolados de *B. cereus* obtidos das amostras de queijos submetidas à análise por Kit BDE – VIA, 100% das amostras expressaram positividade para a produção de enterotoxina diarréica *in vitro*, como mostra a Tabela 5:

Tabela 5. Detecção de enterotoxina diarreica *in vitro* de *B. cereus* isolados de queijo Minas frescal.

Coleta	Nº de colônias analisadas	Nº de colônias positivas
1ª coleta	5	5
2ª coleta	5	5
3ª coleta	4	4
4ª coleta	5	5
5ª coleta	1	1
Total	20	20

Apesar da produção desta enterotoxina nos alimentos depender de fatores como tipo de substrato, temperatura, competição bacteriana entre outras, a constatação da capacidade de sua produção por todos os isolados analisados indica o alto risco a que o consumidor fica exposto pelo consumo destes queijos.

5.3. Considerações Finais Sobre a Contaminação por *B. cereus* e *Listeria* spp. em Planta de Processamento de Produtos Lácteos.

A presença de diferentes espécies de listeria disseminadas pelo ambiente de produção dos queijos levanta a possibilidade de contaminação do produto durante seu processamento. A avaliação das possíveis fontes de contaminação do queijo durante sua produção é fundamental para a aplicação de medidas que visem eliminar os focos de contaminação já instalados, além de impedir ou diminuir a recontaminação do ambiente industrial. A higienização mais freqüente de câmaras frias deve ser realizada. Pisos e drenos devem ter maior atenção quando da sua higienização, pois o simples enxágüe com solução de hipoclorito de sódio deixando-a escorrer pelos drenos não é eficiente para a remoção de listérias.

É provável que a sanitização ineficiente da planta ao longo do tempo tenha facilitado a formação de biofilmes, permitindo à *Listeria* spp. boas condições para fixação às superfícies e aumentando sua resistência frente aos produtos de higiene e sanitização ali empregados atualmente .

A experiência pessoal deste autor em planta industrial de produtos cárneos com contaminação persistente por *L. monocytogenes* revelou que apesar da utilização de vários programas de higienização do local, a fumigação integral do local por composto fenólico foi o único capaz de eliminar o problema. Deste modo, a possibilidade de adoção por parte do laticínio de programas onde se empregue o uso periódico de agentes sanitizantes mais potentes deve ser considerada.

Face à resistência dos esporos de *B. cereus* à pasteurização e à facilidade de adesão a superfícies de ambiente e equipamentos formando biofilmes resistentes, a erradicação deste microrganismo do ambiente de processamento torna-se difícil, porém, o controle da sua disseminação utilizando medidas de monitoramento, limpeza e sanitização adequadas é possível.

Inicialmente, poder-se-ia limitar a entrada de esporos de *B. cereus* na indústria através de orientação aos fornecedores de leite sobre boas práticas de ordenha, além de promover o monitoramento sobre a quantidade de esporos no leite durante a recepção na indústria, identificando os fornecedores cuja matéria-prima possuísse níveis elevados de contaminação. Associado a estas medidas, a adoção integral e efetiva de Boas Práticas de Fabricação como recomenda a Portaria nº 368 de 04 de setembro de 1997, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (1997), a Portaria CVS – 6 de 10 de março de 1999, da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (1999), além da implantação de procedimentos de higiene operacional adequados e padronizados, descritos em documento próprio como recomenda a Resolução nº10 de 22 de maio de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2003), colaborariam na redução da contaminação microbiana já instalada na planta de produção.

6. CONCLUSÃO

Considerando os resultados alcançados, a presente pesquisa permitiu as seguintes conclusões:

1. A disseminação de bactérias do gênero *Listeria* ocorre em vários locais da linha de produção de queijo Minas frescal.
2. Os procedimentos deficientes de higienização são um dos principais fatores que levam à persistência do gênero *Listeria* na indústria.
3. A contaminação por *B. cereus* ao longo do processamento de queijos Minas frescal ocorre ainda na matéria-prima, com o leite cru. A presença do microrganismo é verificada em todos os ambientes de produção do queijo Minas frescal, chegando inclusive ao produto final.
4. Situações que geram condições higiênico-sanitárias inadequadas, como a promoção de reformas civis concomitantes ao processamento de alimentos, promovem a elevação dos níveis de contaminação por *B. cereus* no ambiente da indústria e no produto final.
5. A presença de *B. cereus* produtores de enterotoxina diarréica ocorre com alta frequência nos queijos elaborados sob condições higiênico-sanitárias insatisfatórias; portanto, a implantação efetiva de um programa de Boas Práticas de Fabricação e particularmente de protocolos de higienização mais adequados deve ser considerada, visando a redução do risco que o consumo destes produtos pode acarretar à população.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGATA, N.; OTA, M.; YOKOYAMA, K. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 73, n. 1, p. 23-27, Feb., 2002.
2. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Aprovado pela Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br> . Acesso em: 12 jul., 2004.
3. AHMED, A. A-H.; MOUSTAFA, M. K.; MARTH, E.; Incidence of *Bacillus cereus* in milk and some milk products. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 46, n. 2, p. 126-128, Feb., 1983.
4. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4ª ed. Washington: APHA, 2001.
5. ANDERSSON, A.; SVENSSON, B.; CHRISTIANSSON, A.; RÖNNER, U. Comparison between automatic ribotyping and random amplified polymorphic DNA analysis of *Bacillus cereus* isolates from the dairy industry. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 47, n. 1-2, p. 147-151, Mar., 1999.
6. ANDERSSON, A.; RÖNNER, U.; GRANUM, P. E. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p.145-155, Dec., 1995.
7. ARCHER, D. L. *Listeria monocytogenes*: the science and policy. **Food Control**, Oxford, v. 7 n. 4/5, p. 181-182, Aug./Oct., 1996.
8. AZEREDO, R. M. C. **Estimativa de Riscos relacionados à contaminação de arroz por *Bacillus cereus***. Campinas, 1998. Tese (Doutora em

- Tecnologia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
9. BRACKETT, R. E. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. **Food Technology**, Chicago, v. 42, n. 4, p. 162-164, Apr./Jun., 1988.
 10. BRITISH COLUMBIA CENTRE FOR DISEASE CONTROL – BCCDC. **Milk safety Notes**. 28 Jun., 2002. Disponível em: <http://www.bccdc.org/content.php?item=145> Acesso em: 26 jul., 2004.
 11. CANADIAN HEALTH AND FOOD BRANCH. **Isolation of *Listeria monocytogenes* from All Food and Environmental Samples**. Disponível em: <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment> . Acesso em: 1 set., 2002.
 12. CARDOSO, A. L. M. P. **Ocorrência, multiplicação e produção de toxina diarreica por cepas mesófilas e psicrotróficas de *Bacillus cereus*, em leite pasteurizado**. Campinas, 2000. 95p. Tese (Doutora em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
 13. CARVALHO, J. D. G. **Avaliação da qualidade de queijos tipo Minas frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializados em Campinas – SP**. Campinas, 2003. 107p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
 14. CASSAROTTI, V.; GALLO, C. R.; CAMARGO, R. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo Minas frescal comercializados em Piracicaba – SP. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 44, n. 3, p. 158-163, Sept., 1994.
 15. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 50, n. 26, p. 560-562, July, 2001. Disponível em:

- <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5026a3.htm> . Acesso em 26 jul., 2004.
16. CENTRO DE EXCELÊNCIA EM LATICÍNIOS. **Derivados – Brasil – Produção**. Disponível em: <http://www.cel.org.br/> . Acesso em: 03 set., 2002.
17. CHOMA, C.; GRANUM, P. E. The enterotoxin T (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. **FEMS Microbiology Letters**. Amsterdam, v. 217, n. 1, p. 115-119, Nov., 2002.
18. CHRISTIANSSON, A. The toxicology of *Bacillus cereus*. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n. 275, p. 4-8, July, 1992.
19. CZAJKA, J.; BATT, C. A. verification of causal relationships between *Listeria monocytogenes* isolates implicated in foodborne outbreaks of listeriosis by randomly amplified polymorphic DNA patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, Washigton, v. 32, n. 5, p. 1280-1287, May, 1994.
20. DE BUYSER, M.-L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and different industrialized countries. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam. v. 67, n.1-2, p.1-17, Jan., 2001.
21. DESTRO, M. T.; LEITÃO, M. F. F.; FARBER, J. M. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 2, p. 705-711, Feb., 1996.
22. DESTRO, M. T.; SERRANO, A. M.; KABUKI, D. Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control, Oxford**, v. 2, n. 2, p. 110-112, Apr., 1991.
23. DONNELLY, C. *Listeria monocytogenes*: A continuing challenge. **Nutrition Reviews**, Birmingham, v. 59, n. 6, p. 183-194, June, 2001.

24. DOYLE, M. P. Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, Chicago, v. 42, n. 4, p. 169-171, Apr., 1988.
25. EVANS, J. A.; RUSSEL, S. L.; JAMES, C.; CORRY, J.E. L. Microbial contamination of food refrigeration equipment. **Journal of Food Engineering**, New York, v. 62, n. 3, p. 225-232, May, 2004.
26. FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 55, n. 3 p. 476-511, Sept., 1991.
27. FRANCIOSA, G.; TARTARO, S.; WEDELL-NEEGAARD, C.; AURELI, P. Characterization of *Listeria monocytogenes* strains involved in invasive and noninvasive listeriosis outbreaks by PCR-based fingerprintings techniques. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 4, p. 1793-1799, Apr., 2001.
28. GHELARDI, E.; CELANDRONI, F.; SALVETTI, S.; BARSOTTI, C.; BAGGIANI, A.; SENESI, S. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 208, n. 1, p. 129-134, Feb., 2002.
29. GRANUM, P. E.; *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, Oxford, v. 76, p. 61s-66s, Oct., 1994.
30. GRANUM, P. E.; BRYNESTAD, S.; KRAMER, J. M. Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 17, n. 4, p. 269-279, Feb., 1993.
31. GUDBJÖRNSDÓTTIR, B.; SUIHKO, M., -L.; GUSTAFSSON, P.; THORKESSON, G.; SALO, S.; SJÖBERG, A. -M.; NICLASSEN, O.; BREDHOLT, S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry

- and seafood plants in Nordic countries. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 21, n. 2, p. 217-223, Apr., 2004.
32. HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B. Detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 1, p. 185-189, Jan., 2001.
33. HANSEN, B. M.; LESER, T. D.; HENDRIKSEN, N. B. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Bacillus cereus* group cells. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 202, n. 2, p. 209-213, Aug., 2001.
34. HELGASON, E.; OKSTAD, O. A.; CAUGANT, D. A.; JOHANSEN, H. A., FOUET, A.; MOCK, M.; HEGNA, I.; KOLSTO A-B. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 6, p. 2627-2630, June, 2000.
35. HOLAH, J. T.; BIRD, J.; HALL, K. E. The microbial ecology of high-risk, chilled food factories; evidence for persistent *Listeria* spp. and *Escherichia coli* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p.68-77, 2004.
36. JACCQUET, C.; BILLE, J.; ROCOURT, J. Typing *Listeria monocytogenes* by restriction polymorphism of the ribosomal ribonucleic acid gene region. **Zentralblatt für Bakteriologie**, n.276, p. 356-365, 1992.
37. JOHNSON, K. M. *Bacillus cereus* foodborne illness – an update. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 47, n. 2, p. 145-153, Feb., 1984.
38. KABUKI, D. Y. **Rastreio de *Listeria monocytogenes* em indústrias processadoras de queijo fresco tipo latino, nos Estados Unidos da América, empregando a subtipagem molecular**. Campinas, 2004. 143p. Tese (Doutora em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

39. KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y.; WIEDMAN, M.; BOOR, J. K. Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in latin-style fresh cheese processing plants. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 87, n. 9, p. 2803-2812, Sept., 2004.
40. KANEKO, T. NOZAKI, R.; AIZAWA, K. Deoxyribonucleic acid relatedness between *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology and Immunology**, v. 22, p. 639-641, 1978.
41. KELLS, J.; GILMOUR, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments, and assessment of *Listeria monocytogenes* blood agar for isolation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 91, n. 2, p. 167-174, Mar., 2004.
42. KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; HAAPSAALO, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes and Infection**, v.2, n. 2, p. 189-198, Feb., 2000.
43. KRAMER, J.M.; GILBERT, J.M. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. Ch. 2, *In: Foodborne Bacterial Pathogens*. Doyle, M. P. (Ed.). New York: Marcel Dekker, Inc., p. 21-70, 1989.
44. KOZAK, J.; BALMER, T.; BYRNE, R.; FISHER, K. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods: Incidence in dairy products. **Food Control**, Oxford, v. 7, n. 4/5, p. 215-221, Aug./Oct., 1996.
45. KUHN, M.; GOEBEL, W. Pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. Ch. 5, *In: Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Ryser, E. T.; Marth, E. H. (Ed.). New York: Marcel Dekker, Inc., 2ª ed., p. 21-70, 1999.
46. LARSEN, H. D.; JØRGENSEN, K. Growth of *Bacillus cereus* in pasteurized milk products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 46, n. 2, p. 173-176, Feb., 1999.

47. LIN, S.; SCHRAFT, H.; ODUMERU, J. A.; GRIFFITHS, M. W.; Identification of sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 43, n.3, p. 159-171, Sept. 1998.
48. LUND, T.; DE BUYSER, M-L.; GRANUM, P. E. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* may cause necrotic enteritis. **Molecular Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 254-261, Oct., 2000.
49. LUNDÉN, J. TOLVANEN, R.; KORKEALA, H. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. **Journal of Dairy Science Supplement**, v. 87, p. E6-E11, Sept., 2004.
50. LYYTIKÄINEN, O.; AUTIO, T.; MAIJALA, R.; RUUTU, P.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; MIETTINEN, M.; HATAKKA, M.; MIKKOLA, J.; ANTTILA, V-J.; JOHANSSON, T.; RANTALA, L.; AALTO, T.; KORKEALA, H.; SIITONEN, A. An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 5, p. 1838-1841, 2000.
51. MANZANO, M.; COCOLIN, L.; CANTONI, C.; COMI, G. *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* differentiation using a PCR-RE technique. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 81, n. 3, p. 249-254, Mar., 2003.
52. MEER, R. R.; BAKER, J.; BODYFELT, F. W.; GRIFFITHS, M. W. Psychrotrophic *Bacillus* spp, in fluid milk products: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 54, n. 12, p. 969-979, Dec., 1991.
53. MENENDEZ, S.; GODINEZ, M. R.; RODRIGUEZ-OTERO, J. L.; CENTENO, J. A. Removal of *Listeria* spp. in a cheese factory. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v. 17, n. 2, p. 133-139, Sept., 1997.
54. MENG, J.; DOYLE, M. P. Emerging issues in microbiological food safety. **Annual Reviews of Nutrition**, Palo Alto, v. 17, p. 255-275, July, 1997.

55. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Regulamento Técnico Sobre Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Elaboração para Estabelecimentos Elaboradores / Industrializadores de Alimentos.** Aprovado pela Portaria nº 368, de 04 de setembro de 1997. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br> Acesso em: 10 jul., 2004.
56. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal.** Aprovado pela Portaria nº 352, de 04 de setembro de 1997. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br> . Acesso em: 10 jul, 2004.
57. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos.** Aprovado pela Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br> . Acesso em: 10 jul., 2004.
58. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Programa de Procedimentos-Padrão de Higiene Operacional (PPHO) nos Estabelecimentos de Leite e Derivados.** Aprovado pela Resolução nº 10, de 22 de maio de 2003. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em 20 out. 2004.
59. MOSCALEWSKY, W. S.; LEONE, M. A. B.; PONTAROLO, R.; ABRAHÃO, P. R. S.; MONTEIRO, C. L. B. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijos comercializados no Estado do Paraná. In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. **Anais.** São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003. CD ROM.
60. MOURA, S. M.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M. Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 229-237, Aug., 1993.

61. NALDINI, M. C. M. **Comportamento diferencial de *Listeria monocytogenes* em queijos Minas frescal elaborados pelo método convencional e por acidificação direta.** Campinas, 2002. 72p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
62. NORTON, D. M. Polymerase chain reaction-based methods for detection of *Listeria monocytogenes*: toward real-time screening for food and environmental samples. **Journal of AOAC International**, Washington, v. 85, n. 2, p. 505-515, Mar./Apr., 2002.
63. NOTERMANS, S.; BATT, C. A. A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, Oxford, v. 84, n. S1, p. 51s-61s, Oct., 1998.
64. OLIVEIRA, J. S. **Queijo: Fundamentos Tecnológicos.** São Paulo: Ícone/UNICAMP, 1986, 146p.
65. PENG, J-S; TSAI; CHOU, C-C. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 77, n. 1-2, p. 11-18, July, 2001.
66. PEREIRA, M. L; PEREIRA, J., L. SERRANO, A. M. de; BERDOLL, M. S. Estafilococos em alimentos: possibilidades de disseminação através do portador humano e animal. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n. 66/67, p. 48 – 55, nov.-dez., 1999.
67. PERESI, J. T. M.; GRACIANO, R. A. S.; ALMEIDA, I. A. C. de; LIMA, S. I. de ; RIBEIRO, A. K.; CARVALHO, I. S. de; LIMA, M. de. Queijo Minas tipo Frescal artesanal e industrial. Qualidade microscópica, microbiológica e teste de 4sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 83, p. 63-70, abr. 2001.
68. PIFARETTI, J-C; KRESSEBUCH, H.; AESCHBACHER, M.; BILLE, J.; BANNERMAN, E.; MUSSER, J. M.; SELANDER, R. K.; ROCOURT, J. Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes*

- causing epidemic disease. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 86, n. 10, p. 3818-3822, May, 1989.
69. PRITCHARD, T. J.; FLANDERS, K. J.; DONNELLY, C. W.; DONNELLY, C. W. Comparision of the incidence of *Listeria* on equipment versus environmental sites within dairy processing plants. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 26, n. 3, p. 375-384, Aug., 1995.
70. RABINOVITCH, L.; VICENTE, M. M. A.; GUAYCURÚS, T. V.; FREITAS, J. P. G. de; MESQUITA, R. P. de; Avaliação da incidência e da toxicidade de amostras de *Bacillus cereus* em diferentes classes de alimentos comercializados e consumidos no Estado do Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 1, p. 1-9, jan.-mar., 1985.
71. ROCOURT, J. *Listeria monocytogenes*: the state of the science. **Dairy Food and Environmental Sanitation**, London, v. 14, n. 2, p. 70-82, Feb., 1994.
72. RUKURE, G.; BESTER, B. H. Survival and growth of *Bacillus cereus* during Gouda cheese manufacturing. **Food control**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 31-36, Jan., 2001.
73. RYSER, E. T.; MARTH, E. H. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. 2^a ed. New York: Marcel Dekker Inc., 1999.
74. RYSER, E. T.; MARTH, E. H. Survival of *Listeria monocytogenes* in cold-pack cheese food during refrigerated storage. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 51, n. 8, p. 615-621, Aug., 1988.
75. SCHLECH, W. F. Overview of listeriosis. **Food Control**, Oxford, v. 7, n. 4/5, p. 183-186, Aug./Oct., 1996.
76. SCHLECH III, W. F. Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, Chicago, v. 42, n. 4, p. 176-178, Apr., 1988.

77. SCHMITT, N.; BOWMER, E. J.; WILLOUGHBY, B. A. Food poisoning outbreak attributed to *Bacillus cereus*. **Canadian Journal of Public Health**, Ottawa, v. 67, n. 5, p. 418-422, Sept./Oct., 1976.
78. SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO. **Regulamento Técnico que Estabelece os Parâmetros e Critérios para o Controle Higiênico-Sanitários em Estabelecimentos de Alimentos**. Aprovado pela Portaria CVS – 6/99, de 10 de março de 1999. Disponível em: <http://www.cvs.saude.sp.gov.br>. Acesso em: 9 jul., 2004.
79. SHANK, F. R.; ELLIOT, E. L.; WACHSMUTH, I. K.; LOSIKOFF, M. E. US position on *Listeria monocytogenes* in foods. **Food Control**, Oxford, v. 7, n. 4/5, p. 229-234, Aug./Oct., 1996.
80. SILVA JR., E. A. DA. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos**. São Paulo: Varela, 2002.
81. SILVA, I. M. M.; ALMEIDA, R. C. C.; ALVES, M. A. O.; ALMEIDA, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. In critical control points and the environment of Minas frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 81, n. 03, p. 241-248, Mar., 2003.
82. SILVA, M. C. D.; HOFER, E.; TIBANA A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 03, p. 354-356, 1998.
83. SLADE, P. J. Monitoring *Listeria* in the food production environment - Identification techniques. **Food Research International**, Ottawa, v.25, n. 3, p. 203-214, May/June, 1992.
84. SNEATH, P. H. A. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
85. SNEATH, P. H. A. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1990.

-
86. SPURLOCK, A. T.; ZOTTOLA, E. A. The survival of *Listeria monocytogenes* in aerosols. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 54, n. 12, p. 910-912, 916, Dec., 1991.
87. STADHOUDERS, J. Taxonomy of *Bacillus cereus*. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, s/v, n. 275, p. 4-8, July, 1992.
88. SVENSSON, B.; ENEROTH, Å.; BRENDEHAUG, J.; CHRISTIANSSON, A. investigation of *Bacillus cereus* contamination sites in a dairy plant with RAPD-PCR. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 12, p. 903-912, Dec., 1999.
89. TAN, A. HEATON, S. FARR, L. BATES, J. The use of *Bacillus* diarrhoeal enterotoxin (BDE) detection using an ELISA thecnique in the confirmation of the aetiology of *Bacillus* – mediated diarrhoea. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 82, p. 677-682, 1997.
90. TE GIFFEL, M. C.; BEUMER, R. R.; GRANUM, P. E.; ROMBOUTS, F. M. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* from pasteurized milk in household refrigerators in the Netherlands. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 34, n. 3, p. 307-318, Mar., 1997.
91. TE GUIFFEL, M. C.; BEUMER, R. R.; LEIJENDEKKERS, S.; ROMBOUTS, F. M. Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in foods in the Netherlands. **Food Microbiology**, London, v. 13, n. 1, p. 53-58, Feb., 1996.
92. TOMPKIN, R. B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n. 4, p. 709-725, Apr., 2002.
93. U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Bacteriological Analytical Manual Online**. Disponível em <http://www.fda.gov> . Acesso em: 1 set., 2002.

94. VÁZQUEZ-SALINAS, C.; RODAS-SUÁREZ, O.; QUIÑÓNEZ-RAMIREZ, E. I. Occurrence of *Listeria* species in raw milk in farms on the outskirts of Mexico city. **Food Microbiology**, London, v. 18, n. 2, p. 177-181, 2001.]
95. VIEIRA, M. A. S. **Controle de *Listeria monocytogenes* Scott A em queijo Minas frescal através de tratamento termoquímico**. Campinas, 2000. 195p. Tese (Doutora em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
96. WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, **Press Release**, n. 58, aug., 1997. Disponível em <http://www.who.int/archives/inf-pr-1997/en/pr97-58.html>. Acesso em: 9 jul., 2004.

APÊNDICE A

1. SUGESTÕES PARA LIMPEZA E SANITIZAÇÃO

1.1. Limpeza das Instalações

Pisos e Paredes

- Diariamente:
 - Realizar pré-enxágüe com água corrente;
 - Lavar com detergente clorado;
 - Manter a espuma por 15 minutos;
 - Realizar enxágüe final com água corrente.

Forro:

- Mensalmente, utilizando protocolo semelhante ao da limpeza de pisos e paredes.

Aberturas:

- Mensalmente, utilizando protocolo semelhante ao da limpeza de pisos e paredes.

Instalações Sanitárias e Vestiários:

- Diariamente, utilizando protocolo semelhante ao da limpeza de pisos e paredes.

Caixa d' Água

- Semestralmente:
 - Desligar todas as bombas;
 - Esvaziar a o reservatório até restar a quantidade de um palmo de água no fundo do mesmo;

- Escovar as paredes com escovas de fibra vegetal ou fio de plástico macio, não utilizando sabão, detergente ou outro produto semelhante;
- Retirar o lodo formado no fundo do reservatório com baldes e pá de plástico para não danificar as paredes;
- Enxaguar as paredes com água de abastecimento, mantendo as torneiras abertas para evitar a deposição de resíduos no encanamento;
- Pulverizar ou enxaguar as paredes com solução clorada (200mg/l), mantendo úmida toda a superfície interna do reservatório, repetindo a operação se necessário a cada 30 minutos, durante 2 horas;
- Ligar as bombas e encher novamente o reservatório até sua capacidade máxima. O sanitizante será diluído e sua concentração reduzida ao nível permitido pela legislação;
- Anotar em planilha específica a data de limpeza.

1.2. Limpeza e Sanitização Manual dos Equipamentos e Utensílios

Utensílios (liras, agitadores e recipientes):

- Diariamente:
 - Realizar pré-enxágüe com água corrente;
 - Lavar com auxílio de escovas e detergente;
 - Enxaguar abundantemente com água corrente;
 - Imergir os utensílios em solução de água clorada (100 – 250 mg/l) por 15 minutos;
 - Secar ao ar ambiente.

Fôrmas e Bandejas Plásticas:

- Diariamente:
 - Realizar pré-enxágüe com água entre 35 a 40°C;
 - Imergir as peças em tanque contendo solução de água aquecida a 50-55°C;
 - Lavar com auxílio de escovas e detergente;
 - Enxaguar abundantemente com água corrente;
 - Imergir as peças em solução de água clorada (100 – 250 mg/l) por 15 minutos;
 - Secar ao ar ambiente

Mesas e Bancadas:

- Diariamente:
 - Realizar pré-enxágüe com água corrente;
 - Lavar com auxílio de escovas e detergente clorado;
 - Manter a espuma por 15 minutos;
 - Realizar enxágüe final com solução de água clorada (100 – 250 mg/l).

Tanques:

- Diariamente:
 - Realizar pré-enxágüe com água corrente;
 - Lavar com auxílio de detergente clorado;
 - Manter a espuma por 15 minutos;
 - Enxaguar abundantemente com água corrente;
 - Encher os tanques com solução de água clorada (100 – 250 mg/l) mantendo a solução por 15 minutos;
 - Esvaziar.

Latões de leite:

- Imediatamente após a dispensa do leite:
 - Realizar pré-enxágüe com água corrente;
 - Lavar com auxílio de detergente;
 - Enxaguar abundantemente com água corrente;
 - Insuflar vapor d'água por 1 minuto.

Filtros de Linha:

- Diariamente:
 - Desmontar filtro e válvula manual;
 - Realizar pré-enxágüe com água corrente;
 - Limpar com auxílio de detergente;
 - Enxaguar abundantemente com água corrente;
 - Imergir os filtros em água clorada (100-250 mg/l) por 15 minutos;
 - Montar o filtro e válvula manual;
 - Iniciar o sistema de limpeza no lugar (CIP) do circuito completo (tanque de recepção, bomba, filtro e pasteurizador).

Bomba de Transporte de Soro de Leite:

- Diariamente:
 - Desmontar a bomba;
 - Enxaguar abundantemente todas as peças, colocando-as em tanque próprio para limpeza;
 - Com auxílio de escovas, lavar com detergente;
 - Enxaguar abundantemente;
 - Imergir as peças desmontáveis em água clorada (100-250 mg/l) por 15 minutos;
 - Enxaguar abundantemente com água corrente;
 - Secar ao ar ambiente e montar.

Tubulações (inclusive mangueiras):

- Diariamente:
 - Enxaguar com água corrente por no mínimo 10 minutos;
 - Circular solução de hidróxido de sódio 1 – 2% a temperatura de 77 – 80°C, por 20 minutos;
 - Enxaguar até a água de enxágüe voltar ao seu valor normal de pH, aferido através de fita indicadora;
 - Circular solução clorada (100 – 250 mg/l) por 15 – 20 minutos;
 - Desmontar as tubulações pelo menos uma vez por semana para lavagem manual.

1.3. *Cleaning in Place* (CIP) ou Limpeza no lugar (LNL)

Pasteurizador: a limpeza deve ser realizada diariamente antes e após a recepção de leite e segue as seguintes etapas:

- Realizar pré-enxágüe circulando água durante 10 minutos, com ventosas e válvulas desapertadas, sem os filtros, vapor e água de refrigeração desligados;
- Fechar o circuito ao sair água limpa e reduzir a saída do circuito;
- Circular solução de hidróxido de sódio (1%) aquecida a 75 – 80°C por no mínimo 20 minutos;
- Circular água de enxágüe clorada (5mg/l) até a mesma retornar ao seu valor normal de pH, aferido através de fita indicadora;
- Circular solução de ácido nítrico (0,5 – 1%) aquecida a 65 – 70°C por no mínimo 20 minutos;
- Circular solução clorada a 100 mg/l, por 15 a 20 minutos;
- Realizar enxágüe final com água clorada (5mg/l).

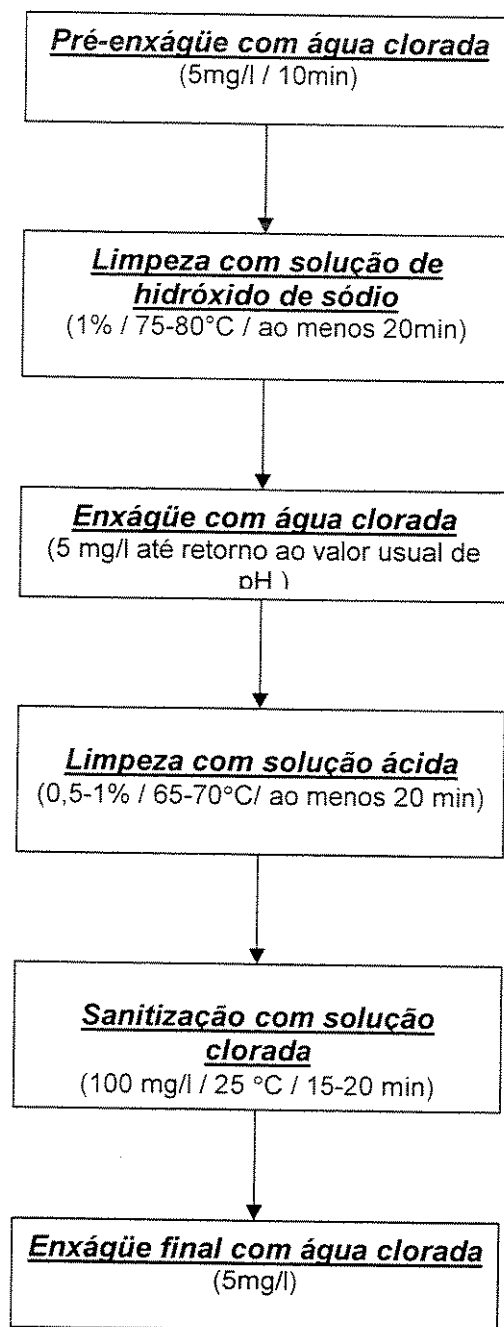


Figura A1. Fluxograma de limpeza e higienização do pasteurizador.

Tabela A1. Resumo do programa de limpeza e sanitização sugerido para indústria processadora de queijo Minas frescal.

Ítems	Frequência	Agentes detergentes e sanitizantes	Métodos	Responsável
Pisos	Diariamente	Detergente clorado	Manual	Todos operadores
Paredes	Diariamente	Detergente clorado	Manual	Todos operadores
Forro	Mensalmente	Detergente clorado	Manual	Todos operadores
Aberturas	Mensalmente	Detergente clorado	Manual	Todos operadores
Instalações sanitárias e vestiários	Diariamente	Detergente clorado	Manual	Todos operadores
Caixa d'água	Semestralmente	Solução clorada	Manual	Operadores da área externa de produção
Fôrmas de queijo e bandejas plásticas	Diariamente	Detergente Solução clorada	Manual	Operadores da área interna de produção
Mesas e bancadas	Diariamente	Detergente clorado Solução clorada	Manual	Operadores da área interna de produção
Tanques	Diariamente	Detergente clorado Solução clorada	Manual	Operadores da área interna de produção
Latões de leite	Imediatamente após a dispensa do leite	Detergente Vapor d'água	Manual	Operadores da plataforma de recepção
Filtros de linha	Diariamente	Detergente Solução clorada	Manual/ CIP	Operadores da plataforma de recepção
Bomba de transporte de soro de leite	Diariamente	Detergente Solução clorada	Manual/ CIP	Operadores da área interna de produção
Tubulações e mangueiras	Diariamente	Solução de hidróxido de sódio Solução clorada	CIP	Operadores da área interna de produção
Pasteurizador	Diariamente	Solução de hidróxido de sódio Solução de ácido nítrico Solução clorada	CIP	Operadores da plataforma de recepção
Outros utensílios (liras, peneiras, etc.)	Diariamente	Detergente Solução clorada	Manual	Operadores da área interna de produção

2. OUTRAS RECOMENDAÇÕES:

2.1 Higienização das mãos

Todas as pessoas que trabalham na área de manipulação de alimentos deverão higienizar as mãos de maneira freqüente e cuidadosa com agentes de limpeza autorizados e em água fria ou quente. As mãos deverão ser higienizadas sempre que:

- Iniciar o trabalho;
- Usar os sanitários;
- Tossir, espirrar ou assoar o nariz;
- Fumar;
- Usar esfregões, panos ou materiais de limpeza;
- Recolher o lixo e outros resíduos;
- Tocar em sacarias, caixas e sapatos;
- Tocar em alimentos não higienizados ou crus;
- Pegar em dinheiro;
- Houver interrupção do serviço;
- Colocar luvas.

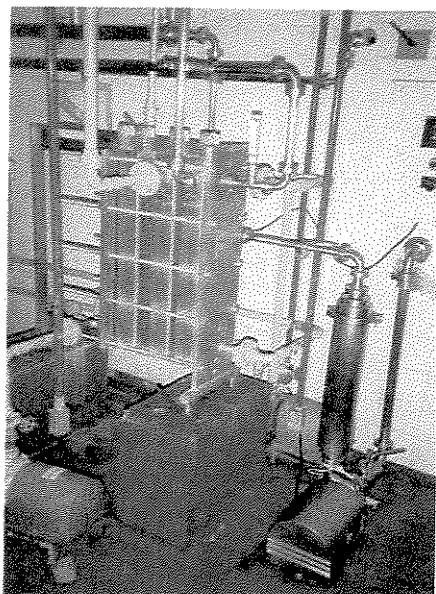
2.1.1. Técnica de higienização das mãos

- Umedecer as mãos e antebraços;
- Passar sabonete líquido, neutro e inodoro. Pode ser usado sabonete anti-séptico, neste caso, massagear as mãos e antebraços por pelo menos 1 minuto;
- Enxaguar bem as mãos e antebraços;
- Secar as mãos com papel toalha descartável não reciclado, ar quente ou qualquer outro meio apropriado;

- Aplicar anti-séptico, deixando secar naturalmente ao ar, quando não utilizado sabonete anti-séptico.

Obs: Sugestões baseadas na Portaria nº 368 de 04 de setembro de 1997 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (1997), Portaria CVS – 6 de 10 de março de 1999, da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (1999), Resolução nº275 de 21 de novembro de 2000, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2000) e Manual de Controle Higiênico-Sanitário de Alimentos (Silva, 2002).

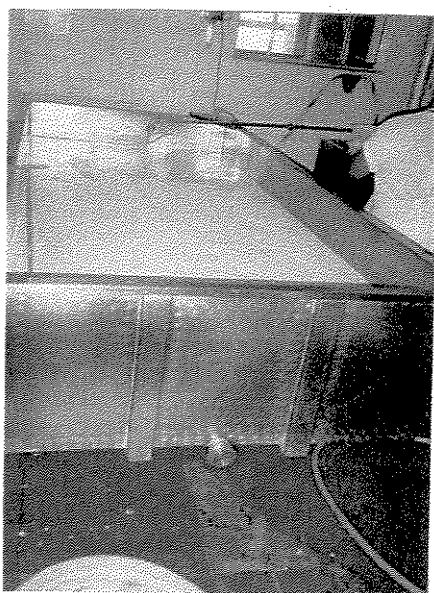
APÊNDICE B



A



B

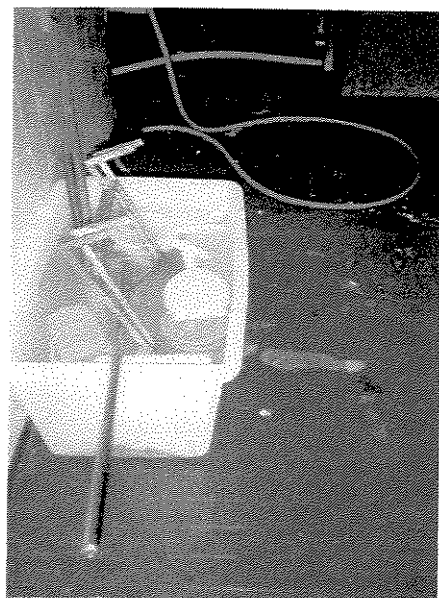


C



D

Figura B1. Detalhe da indústria de queijo Minas frescal antes das reformas civis: **A)** Pasteurizadora; **B)** Tanque 1; **C)** Tanque 2; **D)** Vista parcial da sala de embalagens e tanque de polietileno.



A



B



C



D



E

Figura B2. Detalhe da indústria de queijo Minas frescal antes das reformas civis: **A)** Vista parcial do piso da sala de tanques e utensílios; **B)** Bancada de enformagem e tanque de polietileno; **C)** Câmara-fria 1; **D)** Câmara-fria 2; **E)** Vista parcial do *hall* de acesso a área de produção.

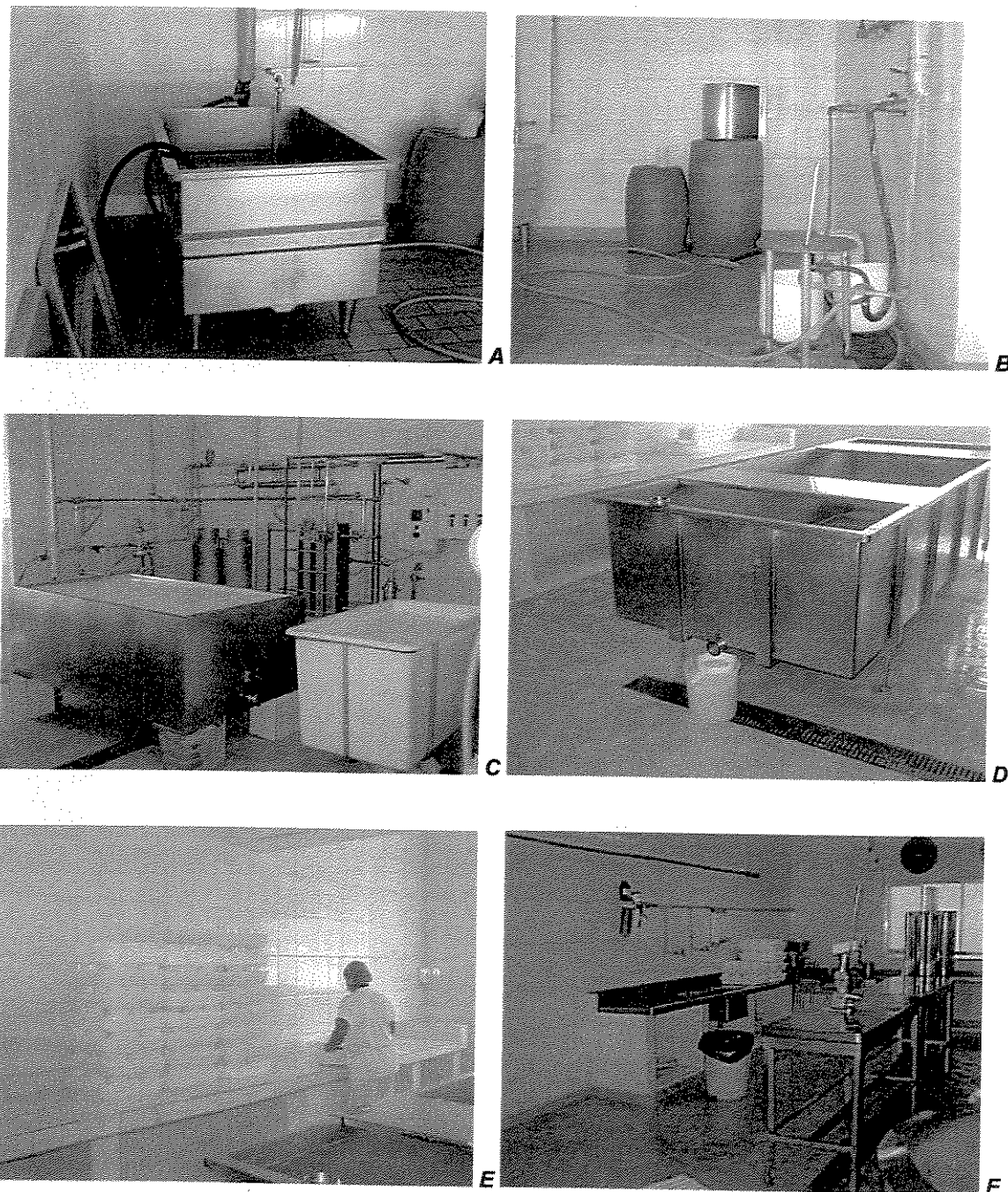


Figura B3. Detalhes da indústria de queijo Minas frescal após as reformas civis: **A)** Tanque de recepção; **B)** Piso e dreno da plataforma de recepção; **C).** Vista parcial da sala dos tanques: tanque 1 e de polietileno; **D)** Tanque 2; **E)** Bancada de enformagem de queijos; **F)** Vista parcial da sala de embalagens: mesa de aço inoxidável para embalagem de queijos e bancada lateral.

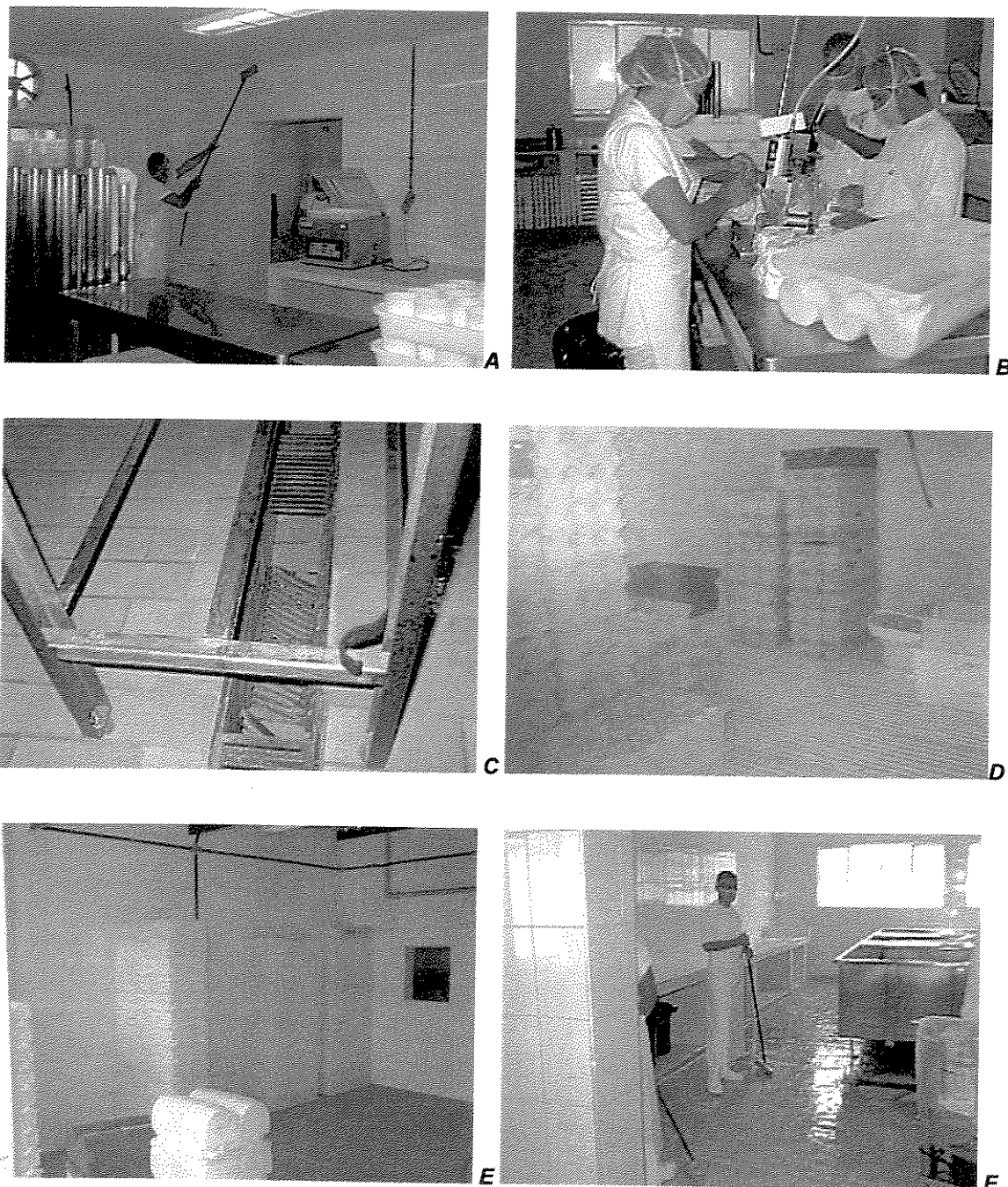


Figura B4. Detalhes da indústria de queijo Minas frescal após as reformas civis: **A)** Vista parcial da sala de embalagens: mesa de aço inoxidável e sala de estoque de caixas de expedição ao fundo; **B)** Mesa de aço inoxidável no momento da embalagem; **C)** Dreno da sala de embalagens; **D)** Câmara fria 1; **E)** Caixas de expedição; **F)** Higienização: Limpeza de pisos com detergente clorado.

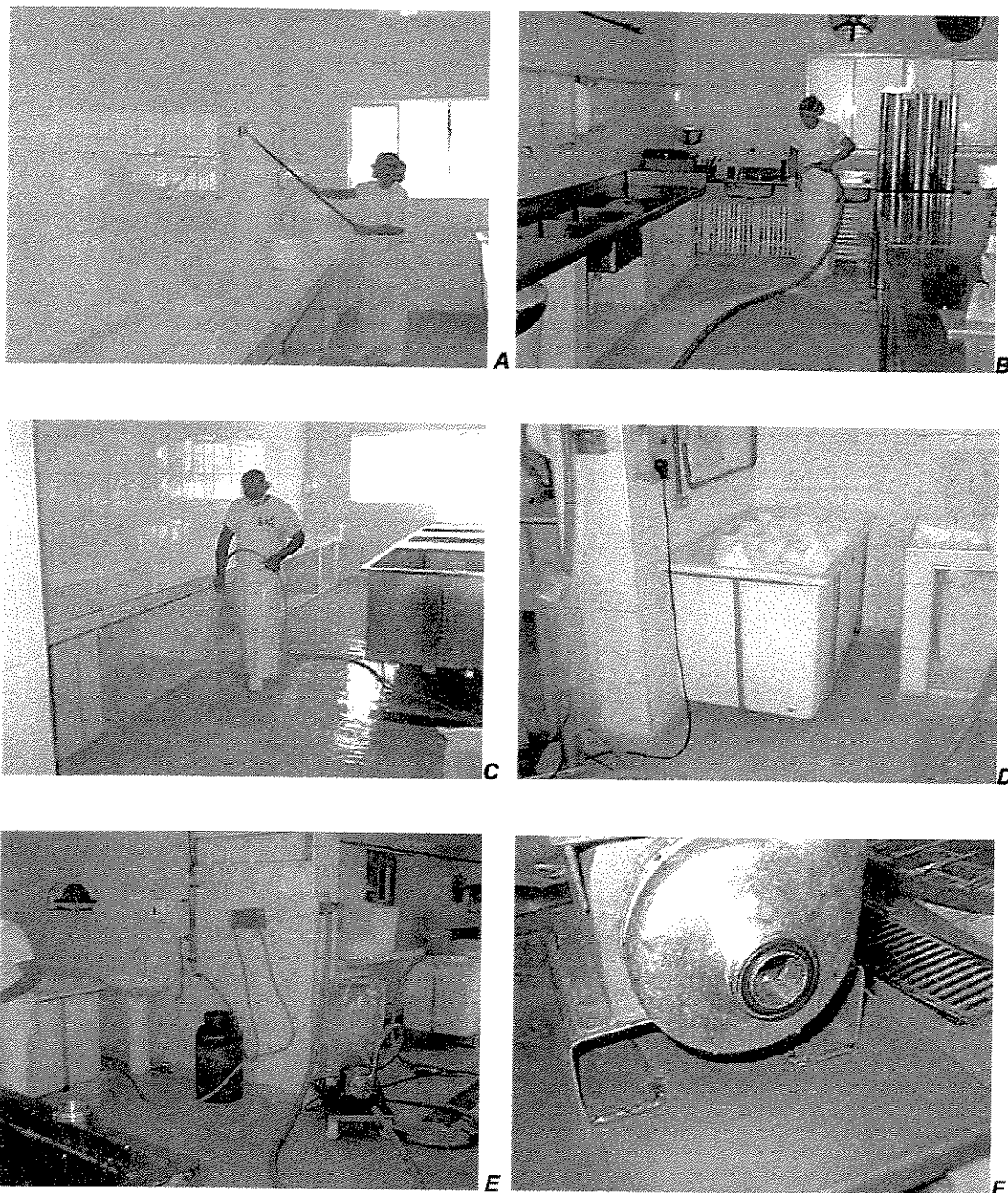


Figura B5. Detalhes da indústria de queijo Minas frescal após as reformas civis: **A)** Higienização: Limpeza de paredes; **B)** Retirada de detergente; **C)** Enxágüe com solução clorada; **D)** Sanitização de fôrmas em solução clorada; **E)** Vista parcial de sala de tanques e bomba de retirada de soro de leite, com sala de embalagens ao fundo. **F)** Detalhe do local de amostragem: área interna de saída da bomba.