

Congresso
Internacional da
Agroindústria
25 a 27 de setembro



Ciência,
Tecnologia e
Inovação: do
campo à mesa

PREVALÊNCIA DE *Listeria* spp. E *Listeria monocytogenes* EM QUEIJO ARTESANAL DO MEIO-OESTE CATARINENSE

PREVALENCE OF *Listeria* spp. AND *Listeria monocytogenes* IN ARTISANAL CHEESE FROM SANTA CATARINA MIDWEST

Bruna Marchesan Maran¹; Thalia Indara Balsan²; Nei Fronza³; Silvani Verruck⁴; Sheila Mello da Silveira⁵

Resumo

A ocorrência de doenças veiculadas por alimentos é cada vez mais frequente, atingindo um número crescente de indivíduos. Os surtos ocasionados por *Listeria monocytogenes* têm sido associados a uma ampla gama de produtos alimentícios incluindo derivados lácteos. Muitas especialidades regionais de queijo são fabricadas a partir de leite cru nas propriedades rurais, empregando barreiras tecnológicas numa base empírica, podendo representar risco à segurança do consumidor se patógenos estiverem presentes. O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* isoladas de amostras de queijo artesanal coletados no município de Seara, Estado de Santa Catarina, Brasil. Foram analisadas 8 amostras de queijo artesanal, sendo realizadas as etapas de enriquecimento primário e secundário, seguidas do plaqueamento em meios de cultura seletivos. As colônias suspeitas de *Listeria* spp. ou *L. monocytogenes* foram testadas quanto às características fenotípicas de crescimento em Agar Listeria segundo Ottaviani e Agosti, hemólise, utilização de carboidratos, reação da catalase, coloração de Gram, teste VM-VP, redução de nitrito e motilidade. Nenhuma amostra apresentou presença do patógeno *L. monocytogenes*, mas houve presença do gênero *Listeria* spp. em quatro amostras de queijo artesanal, fazendo-se necessário o contínuo monitoramento do rebanho e da qualidade microbiológica do alimento.

Palavras-Chaves: queijo artesanal, leite cru, listeriose.

Abstract

The occurrence of foodborne diseases is more and more frequent, affecting an increasing number of individuals. Outbreaks caused by *Listeria monocytogenes* have been associated with a wide range of food products including dairy products. Many regional cheese specialties are made from raw milk on rural properties, employing technological barriers on an empirical basis, which can pose a threat to consumer safety when transmitting pathogens. Therefore, the objective of this study was to determine the prevalence of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* isolated from artisanal cheese samples collected in the municipality of Seara, State of Santa Catarina, Brazil. Eight artisanal cheese samples were analyzed, with the primary and secondary enrichment stages being performed, followed by plating in selective culture media. The

¹ Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, bruna.maran@gmail.com

² Engenharia de Alimentos, Instituto Federal Catarinense - Campus Concórdia, thalia.balsan@gmail.com

³ Prof. Dr., Instituto Federal Catarinense - Campus Concórdia, nei.fronza@ifc.edu.br

⁴ Profa. Dra., Universidade Federal de Santa Catarina, silvani.verruck@ufsc.br

⁵ Profa. Dra., Instituto Federal Catarinense - Campus Concórdia, sheila.silveira@ifc.edu.br

suspected colonies of *Listeria* spp. or *L. monocytogenes* were tested for phenotypic growth characteristics on Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti, haemolysis, use of carbohydrates, catalase reaction, Gram coloring, VM-VP test, nitrite reduction, and motility. No sample had the presence of the pathogen *L. monocytogenes*, but there was the presence of the genus *Listeria* spp. in four samples of artisanal cheese, making it necessary to monitor the herd and the microbiological quality of the food continuously.

Keywords: artisanal cheese, raw milk, listeriosis.

Introdução

Doenças veiculadas por alimentos (DVA's) são doenças ocasionadas pela ingestão de alimentos contaminados por bactérias, vírus, parasitas infecciosos, fungos, entre outros (HOFFMANN; SCALLAN, 2017). Dentre os microrganismos considerados patógenos de origem alimentar, podemos citar: *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus* spp., *Clostridium perfringens*, entre outros, os quais são responsáveis por parte das morbidades e mortalidades, resultando em danos significativos ao desenvolvimento socioeconômico em todo o mundo (OMS, 2015; WIWANITKIT, 2018).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2010 ocorreram 600 milhões de casos e cerca de 420 mil mortes causadas por doenças veiculadas por alimentos no mundo, tomando como base 31 agentes de risco de contaminação (OMS, 2015). Já nos Estados Unidos, conforme relatório realizado em dez Estados do País pela *The Foodborne Diseases Active Surveillance Network*, no ano de 2019 ocorreram 25.866 infecções e 122 mortes provenientes de doenças veiculadas por alimentos. Destes casos, os ocasionados por contaminação por *Listeria monocytogenes* foram 134 infecções, com índice de hospitalizações de 98% e taxa de letalidade de 16%, podendo ser considerada um constante problema de saúde pública devido principalmente a sua alta mortalidade (CDC, 2020).

Listeria spp. são bactérias Gram-positivas em forma de bastonete curto ou cocobacilo, não esporuladas e que podem ser aeróbicas ou anaeróbicas facultativas. Dentre as 10 espécies do gênero *Listeria*, pode-se destacar a *L. monocytogenes* como espécie patogênica para os seres humanos (THAKUR; ASRANI; PATIAL, 2018). Essas são anaeróbias facultativas, fermentadoras de glicose sem produção de gás e têm crescimento ideal a 37°C, mas são capazes de crescer em uma ampla faixa de temperatura entre 0 e 45°C. Possui resistência ao cloreto de sódio e cresce em pH entre 4,6 a 9,2 (REES; DOYLE; TAYLOR, 2017). Outras características que podem diferenciá-la de outros microrganismos estão apresentadas na Tabela 1, as quais fazem parte dos testes bioquímicos realizados para identificação de *L. monocytogenes* (RYSER; DONNELLY, 2015).

Tabela 1. Características de *Listeria monocytogenes*

Característica	Resultado
Motilidade guarda-chuva	+
Produção de catalase	+
β -Hemolise	+
L- Ramnose	+
D-Xilose	-
Oxidase	-

Fonte: Adaptado de Ryser, Donnelly (2015).

A espécie *Listeria monocytogenes* é causadora de dois tipos de listeriose em seres humanos, a do tipo invasiva e a não invasiva. A listeriose não invasiva ou gastrointestinal não é diagnosticada com frequência e ocorre geralmente em adultos saudáveis, provocando febre e diarreia. Já a listeriose invasiva ocorre geralmente em pessoas mais suscetíveis como neonatos, gestantes, indivíduos com 65 anos ou mais e indivíduos imunocomprometidos, atuando em cada grupo de pessoas de maneira distinta (DESAI; TRIMBLE, 2019).

O patógeno causador de listeriose pode ser isolado de fontes ambientais como solo e água, trato gastrointestinal de bovinos, coelhos, peixes, aves, humanos e outros, além de diversos alimentos tais como leite cru, carne crua, queijos moles, peixes, aves, frutos do mar, frutas, vegetais e outros produtos minimamente processados ou prontos para o consumo. Essa contaminação em alimentos pode ser resultado de possíveis más condições de manuseio e processamento do alimento, uma vez que o patógeno pode resistir a temperaturas de congelamento e falhas na pasteurização (THAKUR; ASRANI; PATIAL, 2018).

Como a *L. monocytogenes* está presente no solo, pastagens e água, as fazendas de gado leiteiro tornam-se um ambiente natural para esta bactéria que, por consequência, pode estar presente no trato gastrointestinal dos animais. Dessa forma, para evitar a contaminação cruzada entre o ambiente do rebanho e a sala de ordenha para o leite cru, é necessária a implantação de medidas para impedir a colonização do ambiente de obtenção e processamento de leites e derivados e impedir a contaminação pós-processamento de produtos lácteos (FOX; JIANG; GOBIUS, 2018).

Em alguns países da América Latina há muitos queijos produzidos de maneira artesanal que são geralmente fabricados em instalações pequenas próximas da fazenda e que, muitas vezes, carecem de medidas de higienizações eficazes e do controle microbiológico do leite utilizado na produção de derivados (BARRÍA *et al.*, 2020). Devido a esses e outros fatores, muitos queijos de curta maturação de origem latino-americana estão associados a surtos de origem alimentar (GÉRARD *et al.*, 2020). No Brasil, não há relatos de surtos de listeriose humana provocados por alimentos, no entanto os casos ocorridos no país ainda são subdiagnosticados e subnotificados (BARANCELLI *et al.*, 2014).

O setor de laticínios tem grande importância econômica no Brasil, sendo que em 2014 foram produzidos 1.032.000 toneladas de queijo baseada principalmente em pequenas e médias indústrias (CRUZ *et al.*, 2016; OXARAN *et al.*, 2017). Porém, o processo de produção de queijo é bastante diversificado e, além da produção industrial, há também a produção de forma artesanal que, por sua vez, pode apresentar-se como a principal fonte de renda de pequenos produtores rurais (CORREIA; ASSIS, 2017).

Os queijos artesanais brasileiros são aqueles elaborados por métodos tradicionais que possuem vinculação e valorização territorial, regional ou cultural e que respeitam os protocolos de elaboração estabelecidos para cada variedade (BRASIL, 2019). Existem muitas variedades de queijos tradicionais de cada região tais como o queijo Marajó produzido na ilha do Marajó no norte do País, os queijos requeijão e manteiga do nordeste, Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serro e Triângulo Mineiro tradicionais do Estado de Minas Gerais e queijo Serrano e colonial característicos do Sul do Brasil (KAMIMURA *et al.*, 2019).

No Estado de Santa Catarina, a produção de queijo artesanal, conforme o censo agrícola brasileiro de 2017, foi estimada em 8.210 toneladas por ano (CARVALHO *et al.*, 2019). E, em 2019, o Decreto nº362 regulamentou a Lei nº 17486 de 2018 que dispõe sobre a produção e comercialização de queijos artesanais de leite cru no Estado (SANTA CATARINA, 2018, 2019). O leite cru para elaboração do queijo deve ser recém-ordenhado da própria fazenda ou de outras propriedades próximas, desde que atendam todas as normas técnicas sanitárias, para depois ser beneficiado por meio de métodos tradicionais que mantenham as características históricas-culturais e regionais, utilizando mão de obra predominantemente familiar e respeitando as boas práticas de fabricação com a garantia da segurança alimentar (SANTA CATARINA, 2019). Todavia, os queijos produzidos a partir de leite cru podem apresentar maiores ocorrências de contaminação por *Listeria*, principalmente em produtos com umidade de alta a média, tornando-se um desafio para a segurança de alimentos (SANTOS, 2016). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* isoladas de amostras de queijo artesanal coletadas no município de Seara, Santa Catarina.

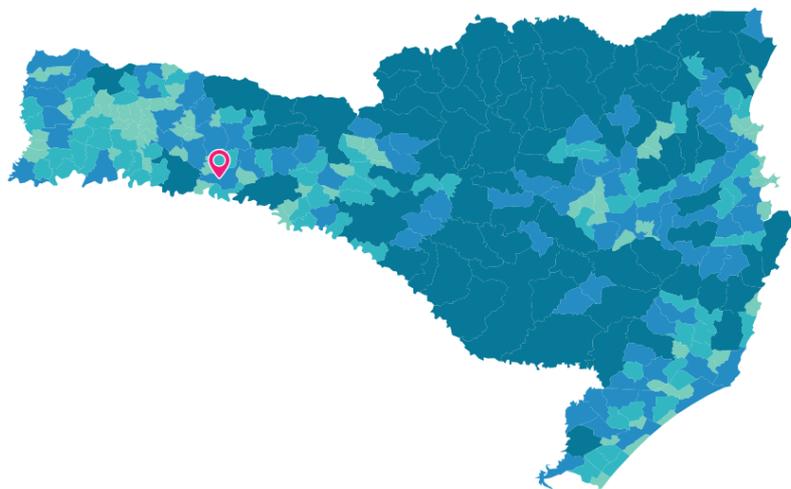
Material e Métodos

ÁREA DE ESTUDO

As propriedades rurais que participaram do projeto pertencem ao município de Seara pertencente a região do meio oeste de Santa Catarina (Figura 1) e foram definidas em conjunto com a EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina) e

Crediseara. Para este estudo, foram utilizadas 8 amostras de queijos artesanais. As amostras de queijo artesanal foram coletadas assepticamente em frascos e embalagens estéreis, acondicionadas em caixas isotérmicas e transportadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos pela EPAGRI para a realização das análises microbiológicas.

Figura 1. Localização do município de Seara no Estado de Santa Catarina, Brasil.



Fonte: IBGE (2019).

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Pré-enriquecimento das amostras

O pré-enriquecimento da amostra foi realizado utilizando-se caldo UVM de enriquecimento para *Listeria*, incubado a 30 °C por 24 horas. Para o enriquecimento seletivo, a partir do meio de pré-enriquecimento, foi inoculado o caldo Fraser, suplementando-o conforme a indicação do fabricante e também incubado a 30 ° C por 24 a 48 horas (BRASIL, 2003).

Identificação

A partir do enriquecimento secundário com o caldo Fraser, inoculou-se, com o auxílio da alça de platina, a superfície dos meios sólidos ágar ALOA sem suplemento, ágar Oxford (AO) e ágar Palcam (AP). Então incubou-se as placas de Petri invertidas a 37°C por 24 e 48 horas. Repetiu-se o procedimento acima do primeiro meio sólido para o segundo meio de enriquecimento sólido, ALOA, incubando-o as placas invertidas a 37°C por 24h ± 2h. Para o ágar ALOA, considerou-se como presuntivo positivo para *Listeria monocytogenes* as colônias verde-azuladas cercadas por um halo opaco e *Listeria* spp. positivo as colônias verde-azuladas com ou sem halo opaco (ISO, 2017).

Seleção de colônias para confirmação

Selecionou-se colônias de cada placa presumida como *Listeria monocytogenes* ou *Listeria* spp. estriando-as em placas de ágar nutriente pré-secas permitindo o desenvolvimento de colônias isoladas. Incubou-se as placas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24h e então realizou-se os testes de confirmação para *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes*. Caso a primeira colônia fosse negativa, utilizou-se até 5 colônias de cada placa de meio seletivo para análise (ISO, 2017).

Teste de hemólise em ágar sangue

Selecionou-se com o auxílio de alça de platina colônias com características morfológicas e fisiológicas indicativas de *Listeria* spp. e também amostra controle de *L. monocytogenes* e inoculou-as em placas com meio ágar-sangue sólido. Incubou-se as placas a 37°C por 24h e logo após examinou-se as cepas de teste e amostras controles de *L. monocytogenes* (ISO, 2017).

Utilização de carboidratos

Para a preparação do caldo de L-Ramnose e D-Xilose preparou-se anteriormente a base e a solução do carboidrato. A base é composta por 10g de digesto enzimático de tecidos animais, 1g de extrato de carne, 5g de cloreto de sódio, 0,02g de púrpura de bromocresol 1000mL de água. Dissolveu-se os componentes em água e corrigiu-se o pH para $6,8 \pm 0,2$ a 25°C . Então esterilizou-se em autoclave por 15min a 121°C . Para cada uma das soluções de carboidratos, D-Xilose e L-Ramnose, utilizou-se 100mL de água e 5g de carboidrato, passando-os pela esterilização por filtração em membrana de $0,45\mu\text{m}$. Então, preparou-se asépticamente os tubos de ensaio com 1mL de solução do carboidrato e 9mL de base (ISO, 2017).

Selecionou-se colônias típicas de *Listeria* spp. a partir do ágar nutriente e inoculou-as em cada um dos caldos, incubando a 37°C por 5 dias. Realizou-se o mesmo procedimento para a amostra controle positiva de *L. monocytogenes*. Para a reação positiva observou-se a formação de ácido indicado pela coloração amarela para ambos os carboidratos (ISO, 2017).

Reação de catalase

Suspendeu-se uma colônia isolada no ágar nutriente em uma gota de solução de peróxido de hidrogênio 3% em uma lâmina. Observou-se a formação ou não formação imediata de bolhas de gás. O aparecimento de bolhas de gás indica uma reação catalase positiva (ISO, 2017).

Coloração de Gram

A técnica de coloração de Gram foi realizada de acordo com a ISO 721. Selecionou-se as colônias obtidas no ágar nutriente e inoculou-se as mesmas em tubos com meio líquido nutritivo não seletivo. Incubou-se a 25°C de 8 a 24h até que o meio ficasse turvo. Com o auxílio de alça de platina previamente esterilizada, obteve-se uma porção do caldo turvo e depositou-se sob uma lâmina limpa. Então, realizou-se, com o auxílio de outra lâmina a 45° sob a primeira, a técnica de esfregação passando posteriormente pela fixação em chama. Cobriu-se o esfregação com solução cristal violeta deixando-se agir por 1 min. Passado o tempo, enxaguou-se suavemente a lâmina inclinada com água destilada por alguns segundos. Cobriu-se a lâmina com a solução de iodo e deixou-se agir por 1min para lavar novamente a lâmina inclinada com água destilada por alguns segundos. Despejou-se então suavemente e continuamente uma película de etanol 95% na lâmina inclinada durante 30s. Enxaguou-se suavemente a lâmina inclinada com água para eliminar o etanol, cobriu-se a lâmina com safranina por 40s e enxaguou-se suavemente a lâmina inclinada com água deixando a lâmina secar (ISO, 2019).

Analizou-se a lâmina sob a objetiva de imersão de alta potência de um microscópio onde as células bacterianas que aparecem azul ou violeta são denominadas de Gram-positivas e aquelas que são coradas de rosa escuro a vermelho são denominadas de Gram-negativas (ISO, 2019).

Teste de Vermelho de Metila e Vogues Proskauer (VM-VP)

Usando a alça de platina, inoculou-se o tubo contendo 5mL do meio VMVP previamente estéril e incubou-se a 37°C por 48h. Após a incubação, pipetou-se 1mL do tubo incubado para outro tubo onde adicionou-se 0,6mL de solução de α -naftol a 5% e 0,2mL de solução de hidróxido de potássio a 40%. Agitou-se bem e inclinou-se o tubo deixando agir por 15min a 1h examinando a coloração. Se a coloração do tubo ficasse vermelha forte indicaria que a reação era positiva. *Listeria* spp. é positiva para VP. Caso a coloração permanecesse da cor do reagente (amarelo ou esverdeado) o teste era negativo. Reincubou-se a cultura remanescente no caldo VM-VP por mais 24h e realizou-se o teste VM. Adicionou-se a 2,5mL da cultura cinco gotas de vermelho de metila e observou-se imediatamente a coloração do meio, que se ficasse vermelha indicaria teste positivo, e se amarela, teste negativo (BRASIL, 2003).

Redução do nitrato

Inoculou-se 5mL de caldo previamente preparado e estéril com uma alçada da cultura a ser analisada e incubou-se a 35°C por 24h. Logo após a incubação, adicionou-se 0,25mL de reagente A (solução 0,8% de ácido sulfúrico) e 0,25mL de reagente B para cada cultura. Em no

máximo 10 minutos, observou-se a presença de coloração rósea avermelhada como teste positivo, indicando que o nitrato foi reduzido a nitrito. Diante de resultado negativo, adicionou-se uma pitada de pó de zinco e deixou-se agir por 10 minutos. Então, observou-se se a cor permaneceu inalterada (teste positivo), ou se adquiriu coloração rósea avermelhada, indicando teste negativo para redução de nitrato (BRASIL, 2003).

Motilidade

Com o auxílio de uma agulha de inoculação previamente estéril, selecionou-se uma colônia típica de *Listeria* spp. da placa contendo ágar nutriente e inoculou-a no tubo contendo ágar motilidade previamente preparado e esterilizado. Incubou-se o tubo a 25°C por 48h. Após a inoculação, examinou-se o crescimento em torno do local onde foi inoculada a cultura suspeita e observou-se se ocorreu padrão típico de crescimento semelhante ao de guarda-chuva. Caso o crescimento não fosse suficiente, incubava-se por mais 5 dias, observando novamente após este tempo (ISO, 2017).

Resultados e Discussão

Dentre as oito amostras de queijo artesanal analisadas, apenas quatro apresentaram colônias típicas de *Listeria* spp. e/ou *Listeria monocytogenes* no ágar ALOA, Palcam ou Oxford. Desta forma, as colônias bacterianas suspeitas foram testadas quanto às características fenotípicas de crescimento em ágar ALOA, ágar sangue, utilização de carboidratos, reação da catalase, coloração de Gram, teste VM-VP, redução de nitrito e motilidade com resultados apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Análise das características fenotípicas das colônias suspeitas de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em queijo artesanal.

Amostra	Ágar de isolamento	ALOA		Hemólise	Xilose	Ramnose	Catalase	Gram	VM	VP	Nitrato	Motilidade
		24h	48h									
CP		+ <i>L. monocytogenes</i>		+	-	+	+	Cocobacilo G+	+	+	-	-
A1	Palcam	+ L. spp.	+ L. spp.	Fraca	+	+	+	Cocobacilo G+	+	-	-	-
A4	Palcam	-	+ L. spp.	-	+	+	+	Cocobacilo G+	+	+	-	-
	ALOA*	-	-	-			+	Cocobacilo G+	-	-	-	-
A5	ALOA*	-	+ L. spp.	-	-	-	+	Cocobacilo G+	-	-	-	-
	Oxford	-	+ L. spp.	-	+	-	+	Cocobacilo G+	-	-	-	-
	Palcam	+ L. spp.	+ L. spp.	Fraca	+	+	+	Cocobacilo G+	+	+	-	-
A7	ALOA*	-	+ L. spp.	-	+	-	+	Cocobacilo G+	-	-	-	-
	Oxford	-	+ L. spp.	-	-	-	+	Cocobacilo G+	-	-	-	-
	Palcam	-	+ L. spp.	-	-	-	+	Cocobacilo G+	-	-	-	-

CP: controle positivo. +L. spp.: positivo para *Listeria* spp.. A1, A4, A5, A7: amostras de queijo colonial. *Ágar base para ALOA sem suplemento.

Para o meio cromogênico, seletivo e diferencial ALOA, foram identificadas no tempo de 24h apenas o crescimento de colônias típicas de *Listeria* spp. em duas amostras (A1 e A5, ambas incubadas inicialmente no meio Palcam). Em 48h apenas a amostra A4 incubada inicialmente com ALOA não apresentou colônias típicas de *Listeria* spp., resultando em presuntivo negativo. Todas as demais amostras de queijo apresentaram-se com colônias típicas de *Listeria* spp. com coloração verde-azulada sem a presença de halo opaco, sendo o controle positivo o único que apresentou a presença de halo opaco circundando as colônias verde-azuladas em 24 e 48h resultando em presuntivo positivo para *L. monocytogenes*. Essa diferenciação e detecção de *Listeria* spp. ocorre pela ação da enzima β -D-glicosidase que atua na clivagem dos conjugados X- β -D-glucosídeo, deixando as colônias com coloração verde-azulada. Porém, *L. monocytogenes* diferencia-se das demais através da atividade de lecitinase pela ação da fosfatidil inositol fosfolipase C (PIPLC). Desta forma, *L. monocytogenes*, além de formar colônias verde-azuladas, hidrolisa o substrato do meio produzindo um halo opaco que circunda as colônias (ISO, 2017). No entanto, mesmo não apresentando colônias características de *L. monocytogenes*, todos os demais testes obrigatórios para *L. monocytogenes* foram realizados a fim de conhecer a ecologia bacteriana presente.

O teste de hemólise em ágar sangue é positivo para *L. monocytogenes* quando as colônias são estreitas, claras e apresentam zonas leves de hemólise (ISO, 2017) como encontrado no controle positivo (CP). Duas amostras de queijo apresentaram hemólise fraca (A1 e A5 com Ágar Palcam). A presença de hemólise é o principal fator de virulência de *L. monocytogenes*, porém *L. seeligeri* e *L. ivanovii* também apresentam atividade hemolítica (RYSER; DONNELLY, 2015) e, desta forma, as amostras que apresentaram hemólise fraca podem ser quaisquer destas espécies. As demais amostras não apresentaram atividade hemolítica, o que indica que essas possivelmente não são colônias de *L. monocytogenes*, mas sim de outras espécies do gênero *Listeria* spp.

O consumo de carboidratos como xilose e ramnose produzindo ácidos modifica o pH do meio e ocorre mudança na coloração do mesmo. O uso ou não desses carboidratos depende da espécie de *Listeria* spp. que está sendo analisada. *Listeria monocytogenes*, por exemplo, é positiva para consumo de L-Ramnose e negativa para D-Xilose (ISO, 2017) e, portanto, analisando os resultados encontrados nenhuma das amostras apresentou teste positivo para *L. monocytogenes*. As colônias isoladas a partir do ágar Palcam das amostras de queijo A1, A4 e A5 apresentaram consumo de xilose e ramnose positivos. De acordo com a ISO 11290 (2017) dentre as espécies do gênero *Listeria* spp., *L. fleischmanii*, *L. rocourtiae* e *L. weihenstephanensis* são capazes de fermentar L-ramnose e D-xilose produzindo ácido e a

espécie *L. welshimeri* é capaz de consumir D-xilose e possui característica de reação variável para o consumo de L-ramnose com produção de ácido. Com isso, as amostras positivas para ambos os carboidratos podem ser quaisquer das espécies citadas acima. Enquanto isso, as colônias isoladas a partir do ágar ALOA e Oxford da amostra A5 apresentaram consumo somente de xilose, característica apresentada pelas espécies *L. ivanovii*, *L. seeligeri* e variável para *L. welshimeri* (ISO, 2017). Já as demais amostras não apresentaram consumo de nenhum dos dois carboidratos, característica identificada como *L. marthii* e variável para *L. innocua* e *L. grayi* (ISO, 2017). Desta forma, as amostras apresentaram-se positivas para *Listeria* spp. mas negativas para *L. monocytogenes*.

A reação da catalase ocorre quando, ao adicionar-se peróxido de hidrogênio (H₂O₂) sobre uma colônia de bactéria, a enzima catalase atua degradando o peróxido de hidrogênio em H₂O e $\frac{1}{2}$ O₂, liberando bolhas de oxigênio (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). O teste de reação da catalase resultou para todas as amostras como catalase positiva, característica de *Listeria* spp. uma vez que estas possuem a enzima catalase (ISO, 2017).

Outra característica que todas as colônias presuntivas de *Listeria* spp. apresentaram foi a forma de cocobacilo Gram-positivo, confirmando a característica da possível presença de *Listeria* spp. nas amostras. Já no teste VM-VP as colônias das amostras A4 e A5 isoladas de ágar Palcam, juntamente com o controle apresentaram resultado positivo tanto para VM quanto para VP, característica apresentada por *Listeria* spp. dentre as quais podemos citar *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* e com característica variável para consumo de glicose mas VP positivo temos *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii* e *L. marthii* que também podem ser uma das espécies detectadas nessas amostras dependendo da combinação dos resultados das demais análises (NÚÑEZ-MONTERO *et al.*, 2018). Porém a amostra A1 apresentou VM positivo e VP negativo, característica que possivelmente possa inferir na presença de *Listeria* spp. uma vez que algumas espécies isoladas recentemente apresentaram resultado VP negativo como *L. rocourtae*, *L. weihenstephanensis* e *L. fleischmanii* (ISO, 2017; NÚÑEZ-MONTERO *et al.*, 2018). As demais amostras apresentaram-se VM e VP negativos, característica não encontrada nos estudos analisados como característica de *Listeria* spp..

Por sua vez, o teste de redução de nitrato apresenta modificação da coloração do meio para rosa, quando as bactérias não realizam a reação de redução de nitrato à nitrito. Caso as bactérias realizassem essa reação a coloração do meio não sofreria modificação quando adicionado pó de zinco (BRASIL, 2003). As amostras de queijo artesanal apresentaram resultado negativo para todas as colônias isoladas, característica apresentada para as espécies *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. marthii*, podendo ser variável para diferentes cepas de *L. grayi*. Desta forma, as colônias isoladas podem ser quaisquer das espécies

citadas acima, mas não apresentam característica de *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis* e *L. fleischmanii* uma vez que essas apresentam característica de redução de nitrato positivo (NÚÑEZ-MONTERO *et al.*, 2018).

E por fim, todas as amostras apresentaram teste de motilidade negativo. *Listeria* spp. apresentam característica de crescimento tipo guarda-chuva, no entanto, algumas espécies de *Listeria* isoladas recentemente não apresentam motilidade quando realizada análise no ágar motilidade (ISO, 2017). Sendo assim, mesmo não apresentando crescimento tipo guarda-chuva, as colônias isoladas das amostras de queijo tipo artesanal podem ser do gênero *Listeria* spp.. Isto porque ao analisarmos todos os testes em conjunto encontramos características que confirmam o gênero *Listeria* spp. como os aspectos microscópicos, a reação positiva para catalase, e adicionalmente VP e motilidade positiva ou negativa (ISO, 2017).

A fim de indicarmos a possível espécie de *Listeria* spp. presente em cada amostra de queijo, foram comparados os resultados da Tabela 2 com os descritos no anexo D da ISO 11290-1 de 2017 dos principais testes para identificação de *Listeria* spp.. As possíveis espécies presentes no queijo artesanal podem ser observadas na Tabela 3.

Tabela 3. Possíveis espécies de *Listeria* para cada colônia suspeita isolada de queijo artesanal, com base nas características apresentadas na ISO 11290-1 (2017).

Amostra	Ágar de isolamento	Possível espécie de <i>Listeria</i> spp.
A1	Palcam	Nenhuma espécie característica
A4	Palcam	<i>L. welshimeri</i> , <i>L. fleischmanii</i> , <i>L. rocourtiae</i> ou <i>L. weihenstephanensis</i>
A5	ALOA*	Nenhuma espécie característica
	ALOA*	<i>L. marthii</i> , <i>L. grayi</i> ou <i>L. innocua</i>
	Oxford	<i>L. ivanovii</i> , <i>L. welshimeri</i> ou <i>L. seeligeri</i>
A7	Palcam	Nenhuma espécie característica
	ALOA*	<i>L. ivanovii</i> , <i>L. welshimeri</i> ou <i>L. seeligeri</i>
	Oxford	<i>L. marthii</i> , <i>L. grayi</i> ou <i>L. innocua</i>
	Palcam	<i>L. marthii</i> , <i>L. grayi</i> ou <i>L. innocua</i>

A1, A4, A5, A7: amostras de queijo colonial. *Ágar base para ALOA sem suplemento.

Desta forma, podemos constatar que as quatro amostras de queijo que apresentaram resultados presuntivos para *Listeria* spp. foram confirmadas, apresentando possibilidades de serem diferentes espécies do gênero *Listeria* spp., com exceção da presença de *Listeria monocytogenes*, a qual não apresentou confirmação. Estudos realizados por Barancelli *et al.* (2014) e Oxaran *et al.* (2017), nos estados de São Paulo e Goiás, demonstram a baixa incidência de *L. monocytogenes* em indústrias e produtos lácteos incluindo o leite cru utilizado como matéria prima. A presença de *Listeria* spp. pode estar relacionada não só às condições higiênico-sanitárias do local de produção, mas também à matéria prima utilizada para a

produção do alimento (HAMIDIYAN *et al.*, 2018; REES; DOYLE; TAYLOR, 2017), isso porque a alimentação do gado leiteiro como o consumo de silagens e a contaminação durante a ordenha têm sido consideradas a maior fonte de *Listeria* spp. no leite cru.

Conclusões

Como não houve presença de *L. monocytogenes* em nenhuma das amostras avaliadas, conclui-se que as amostras de queijo artesanal de leite cru analisadas neste estudo não representam risco para a saúde do consumidor, no que concerne à *Listeria monocytogenes*, importante patógeno alimentar. Porém, devido à presença do gênero *Listeria* spp., faz-se importante o constante acompanhamento do rebanho e da produção de queijo artesanal.

Agradecimentos

Agradecemos à Andréia Tecchio, pela disponibilização de recursos do projeto R4D para a aquisição de materiais de laboratório e pela coleta de amostras junto aos produtores. Agradecemos também à Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) pela coleta de amostras e o transporte até o IFC Campus Concórdia e à Cooperativa de Crédito Rural Seara (CrediSeara) pela viabilização da aquisição de materiais de laboratório para a realização das análises.

Referências

BARANCELLI, Giovana V. *et al.* Pulsed-Field Gel Electrophoresis characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from cheese manufacturing plants in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 173, p. 21–29, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.018>

BARRÍA, Carla *et al.* Tracing *Listeria monocytogenes* contamination in artisanal cheese to the processing environments in cheese producers in southern Chile. **Food Microbiology**, [S. l.], v. 90, p. 103499, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103499>

BRASIL. LEI 13.860, DE 18 DE JULHO DE 2019. Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências. Brasil: **Diário Oficial da União**, Brasília, 2019.p. 1.

BRASIL. Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, 18 set. 2003, Seção 1, p. 14.

CARVALHO, Michelle de Medeiros *et al.* Traditional Colonial-type cheese from the south of Brazil: A case to support the new Brazilian laws for artisanal cheese production from raw milk. **Journal of Dairy Science**, [S. l.], v. 102, n. 11, p. 9711–9720, 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.3168/jds.2019-16373>

CORREIA, Vinícius Tadeu da Veiga; ASSIS, Isabella Cristina Lopes de. Queijos artesanais : revisão de literatura. **Revista eletrônica Nutri Time**, [S. l.], v. 14, p. 8001–8008, 2017.

DESAI, Rahat Wadhwa; TRIMBLE, Lisa M. *Listeria monocytogenes*. In: LUI, Dongyou (org.). **Handbook of Foodborne Diseases**. [S. l.]: CRC Press, 2019. p. 195–206. *E-book*.

FOX, Edward M.; JIANG, Yujun; GOBIUS, Kari S. Key pathogenic bacteria associated with dairy foods: On-farm ecology and products associated with foodborne pathogen transmission. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 84, p. 28–35, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.03.013>

GÉRARD, Amaury *et al.* Determination of the growth potential of *Listeria monocytogenes* in various types of Belgian artisanal cheeses by challenge tests. **Food Microbiology**, [S. l.], v. 92, p. 103582, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103582>

HAMIDIYAN, Negar *et al.* **The prevalence of *Listeria* spp. food contamination in Iran: A systematic review and meta-analysis**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.038>

HOFFMANN, S.; SCALLAN, E. Epidemiology, Cost, and Risk Analysis of Foodborne Disease. In: DODD, Christine E. R. *et al.* (org.). **Foodborne Diseases**. 3. ed. [S. l.]: Elsevier, 2017. p. 31–63. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00002-4>

KAMIMURA, Bruna Akie *et al.* Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, [S. l.], v. 80, p. 40–49, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.014>

NÚÑEZ-MONTERO, Kattia *et al.* *Listeria costaricensis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 68, n. 3, p. 844–850, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002596>

OMS, Organização Mundial da Saúde. **Food-Borne Disease Burden Epidemiology Reference Group**. [S. l.: s. n.]. *E-book*.

OXARAN, Virginie *et al.* *Listeria monocytogenes* incidence changes and diversity in some Brazilian dairy industries and retail products. **Food Microbiology**, [S. l.], v. 68, p. 16–23, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.012>

REES, C. E. D.; DOYLE, L.; TAYLOR, C. M. *Listeria monocytogenes*. In: DODD, Christine E. R. *et al.* (org.). **Foodborne Diseases: Third Edition**. 3. ed. [S. l.]: Elsevier Inc., 2017. p. 253–276. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00012-7>

RYSER, Elliot T.; DONNELLY, Catherine W. *Listeria*. In: **Compendium of Methods of the Microbiological Examination of Foods**. [S. l.]: Washington D.C, 2015. p. 425–443. *E-book*.

SANTA CATARINA, Governo do Estado. Lei nº 17486 de 16 de Janeiro de 2018. Dispõe sobre a produção e comercialização de queijos artesanais de leite cru e adota outras providências. Brasil: **Diário Oficial do Estado**, 2018.

SANTA CATARINA, Governo do Estado. **Decreto nº 362 de 21 de novembro de 2019**.

Regulamenta a Lei nº 17.486, de 2018, que dispõe sobre a produção e comercialização de queijos artesanais de leite cru e adota outras providências. Brasil: Diário Oficial do Estado, 2019.

SANTOS, Anderson Joaquim Pereira dos. **Efeitos do período de maturação de queijos sobre a microbiota deteriorante e listeria monocytogenes.** 2016. - Universidade de Brasília, [s. l.], 2016.

THAKUR, Meenakshi; ASRANI, Rajesh Kumar; PATIAL, Vikram. Listeria monocytogenes: A Food-Borne Pathogen. *In*: HOLBAN, Alina Maria; GRUMEZESCU, Alexandru Mihai (org.). **Foodborne Diseases.** [S. l.]: Elsevier Inc., 2018. v. 15p. 157–192. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811444-5.00006-3>

TORTORA, Gerard J. ...; FUNKE, Berdell R. ...; CASE, Christie L. Crescimento Microbiano. *In*: TORTORA, Gerard J. ...; FUNKE, Berdell R. ...; CASE, Christie L. (org.). **Microbiologia.** 10. ed. [S. l.]: Artmed, 2012. p. 156–183. *E-book*.

WIWANITKIT, Viroj. Important Emerging and Reemerging Tropical : Food-Borne Diseases. *In*: HOLBAN, Alina Maria; GRUMEZESCU, Alexandru Mihai (org.). **Handbook of Food Bioengineering: FoodBorne Diseases.** [S. l.]: Academic Press, 2018. p. 33–55. *E-book*.