

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Paula Marques Rivas

**CONTAMINAÇÃO CRUZADA POR *Listeria monocytogenes* DURANTE
FATIAMENTO MECÂNICO DE QUEIJO MUSSARELA E PREDIÇÃO DE SEU
COMPORTAMENTO DURANTE ARMAZENAMENTO EM REFRIGERAÇÃO**

Porto Alegre

2021

Paula Marques Rivas

**CONTAMINAÇÃO CRUZADA POR *Listeria monocytogenes* DURANTE
FATIAMENTO MECÂNICO DE QUEIJO MUSSARELA E PREDIÇÃO DE SEU
COMPORTAMENTO DURANTE ARMAZENAMENTO EM REFRIGERAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre(a) em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador(a): Prof. Dr. Eduardo César Tondo
Coorientador(a)r: Prof. Dr. Vagner Ricardo Lunge

Porto Alegre
2021

Rivas, Paula Marques
CONTAMINAÇÃO CRUZADA POR *Listeria monocytogenes*
DURANTE FATIAMENTO MECÂNICO DE QUEIJO MUSSARELA E
PREDIÇÃO DE SEU COMPORTAMENTO DURANTE ARMAZENAMENTO EM
REFRIGERAÇÃO / Paula Marques Rivas. -- 2021.
57 f.

Orientador: Eduardo César Tondo.

Coorientador: Vagner Ricardo Lunge.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. *Listeria monocytogenes*. 2. queijo mussarela. 3.
contaminação cruzada. 4. fatiador. 5. doença
transmitida por alimentos. I. Tondo, Eduardo César,
orient. II. Lunge, Vagner Ricardo, coorient. III.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

A minha família, pai, mãe, irmãos, cunhadas e minhas amadas sobrinhas, por constituírem uma base familiar de apoio e principalmente compreensão. Obrigada por sempre acreditarem em mim.

Ao meu marido Tiago, por toda a compreensão e parceria durante essa trajetória. Obrigada por sempre encarar todos os desafios junto comigo, e fazer parte do nosso projeto de vida. Amo você.

Aos colegas da Diretoria de Vigilância em Saúde, em especial à Equipe de Vigilância de Alimentos por conduzir com competência a nossa árdua rotina de trabalho. Obrigada por sustentarem o serviço durante minhas ausências neste período. Um agradecimento especial a minha colega e amiga Nayara pelo apoio e parceria de sempre, seja no trabalho, na vida, como também nesta caminhada acadêmica.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos (ICTA/UFRGS) pelos ensinamentos, pelas amizades construídas neste período, em especial a minha amiga Danielle Carmo da Silva. Gratidão por toda tua dedicação, cuidado e atenção comigo Dani, te admiro muito. Obrigada por tudo!

Ao meu orientador Eduardo César Tondo por todos os ensinamentos e por me conduzir neste trabalho sempre da melhor forma.

À companhia Zaffari por apoiar esta pesquisa cedendo o fatiador utilizado nos experimentos, bem como fornecendo o suporte técnico necessário para ajustes do equipamento.

À todos amigos, familiares, colegas que, de alguma forma estiveram comigo e participaram desta trajetória. Muito obrigada!

CONTAMINAÇÃO CRUZADA POR *Listeria monocytogenes* DURANTE FATIAMENTO MECÂNICO DE QUEIJO MUSSARELA E PREDIÇÃO DE SEU COMPORTAMENTO DURANTE ARMAZENAMENTO EM REFRIGERAÇÃO¹

Autor: Paula Marques Rivas

Orientador: Prof. Dr. Eduardo César Tondo

Co-orientador: Prof. Dr. Vagner Ricardo Lunge

RESUMO

A listeriose, doença grave causada pelo consumo de alimentos contaminados com *Listeria monocytogenes* (LM), tem sido relatada após o consumo de muitos alimentos, inclusive do queijo mussarela, um dos mais consumidos em vários países. A contaminação cruzada durante o fatiamento tem sido identificada como uma das principais origens da contaminação de queijos por LM. O objetivo do estudo foi avaliar a transferência de LM durante o fatiamento mecânico do queijo mussarela e posterior comportamento do microrganismo no queijo fatiado armazenado em refrigeração. Na primeira etapa, um queijo mussarela foi contaminado com um *pool* de LM, resultando em 5 log UFC/fatia. Após, o queijo foi fatiado em fatiador automático com lâmina desinfetada e LM foi quantificada nas fatias 1^a, 2^a, 5^a, 25^a, 50^a, 75^a e 100^a e na lâmina. Na segunda etapa, um queijo não contaminado foi fatiado em lâmina previamente contaminada com LM (3,67 log UFC/10cm²). Após fatiar 100 fatias, a lâmina foi amostrada com *swabs* e LM foi quantificada em sua superfície e nas fatias 1^a, 2^a, 5^a, 25^a, 50^a, 75^a e 100^a. Na terceira etapa, fatias de queijo foram contaminadas com LM (1,39 log UFC/g) e sua multiplicação foi acompanhada durante 10 e 15 dias a 10°C, e os resultados foram comparados aos do *software* Combase de microbiologia preditiva. Os resultados demonstraram que houve transferência significativa ($p \leq 0,05$) de LM presente nas fatias para a lâmina, demonstrando aumento das contagens após as primeiras fatias e estabilização, após as fatias 50^a e 100^a. As contagens variaram de 2,71 log UFC/10cm² (1^a fatia), até 3,67 log UFC/10cm² (100^a fatia). Os resultados das fatias contaminadas (3,80 a 4,23 log UFC/g) são complementares aos resultados dos *swabs*, indicando que, a medida que mais fatias foram processadas, a transferência de células bacterianas tornou-se constante e em baixo nível. A lâmina contaminada artificialmente também transferiu LM para as fatias de queijo não contaminado, demonstrando transferência de cerca de 2 log UFC/g ao longo de todo fatiamento. As fatias contaminadas artificialmente e armazenadas a 10°C demonstraram aumento significativo ($p \leq 0,05$) de LM, apresentando 1,51log UFC/g, aos 10 dias, e 1,69log UFC/g aos 15 dias. Os resultados preditivos demonstraram contagens muito maiores, isto é, 3,03log UFC/g (10 dias) e 4,68log UFC/g (15 dias), com crescimento significativo ($p \leq 0,05$) até 15 dias. O fatiamento de queijo mussarela pode representar risco a saúde pública se houver contaminação do fatiador, associado ao aumento do consumo e validade prolongada.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (57 p.) agosto, 2021.

EVALUATION OF CROSS CONTAMINATION BY *Listeria monocytogenes* DURING MECHANICAL SLICING OF MOZZARELLA CHEESE AND PREDICTION THEIR BEHAVIOR UNDER COLD STORAGE.¹

Author: Paula Marques Rivas

Advisor: Prof. Dr. Eduardo César Tondo

Co-Advisor: Prof. Dr. Vagner Ricardo Lunge

ABSTRACT

Listeriosis, a serious disease caused by the consumption of foods contaminated with *Listeria monocytogenes* (LM), has been reported after consumption of many foods, including mozzarella cheese, one of the most consumed in several countries. Cross-contamination during slicing has been identified as one of the main sources of LM contamination of cheeses. The aim of the study was to evaluate the transfer of LM during mechanical slicing of mozzarella cheese and subsequent behavior of the microorganism in sliced cheese stored under refrigeration. In the first step, a mozzarella cheese was contaminated with a pool of LM, resulting in 5log CFU/slice. Afterwards, the cheese was sliced in an automatic slicer with a disinfected blade and LM was quantified in the 1st, 2nd, 5th, 25th, 50th, 75th and 100th slices and on the blade. In the second stage, an uncontaminated cheese was sliced on a blade previously contaminated with LM (3.67 log CFU/10cm²). After slicing 100 slices, the blade was sampled with swabs and LM was quantified on its surface and in the 1st, 2nd, 5th, 25th, 50th, 75th and 100th slices. In the third step, cheese slices were contaminated with LM (1.39 log CFU/g) and their multiplication was followed for 10 and 15 days at 10°C, and the results were compared to those of the Combase predictive microbiology software. The results showed that there was a significant transfer ($p \leq 0.05$) of LM present in the slices to the blade, demonstrating an increase in counts after the first slices and stabilization after the 50th and 100th slices. Counts ranged from 2.71 log UFC /10cm² (1st slice), up to 3.67 log UFC/10cm² (100th slice). The results from the contaminated slices (3.80 to 4.23 log CFU/g) are complementary to the results from the swabs, indicating that as more slices were processed, bacterial cell transfer became constant and low-level. The artificially contaminated blade also transferred LM to the uncontaminated cheese slices, demonstrating a transfer of about 2 log CFU/g throughout the entire slicing. The artificially contaminated slices stored at 10°C showed a significant increase ($p \leq 0.05$) in LM, with 1.51log CFU/g at 10 days and 1.69log CFU/g at 15 days. The predictive results showed much higher counts, that is, 3.03log CFU/g (10 days) and 4.68log CFU/g (15 days), with significant growth ($p \leq 0.05$) up to 15 days. Slicing mozzarella cheese can pose a risk to public health if there is contamination of the slicer, associated with increased consumption and prolonged shelf life.

¹ Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (57 p.) August, 2021

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo Geral	3
2.2	Objetivos Específicos.....	3
2.2.1	Objetivo específico 1	3
2.2.2	Objetivo específico 2.....	3
2.2.3	Objetivo específico 3.....	3
2.2.4	Objetivo específico 4.....	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	4
3.2	Queijo mussarela	7
3.3	Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) envolvendo <i>Listeria monocytogenes</i>	9
3.4	Contaminação cruzada em fatiadores.....	12
3.5	Comportamento de <i>L. monocytogenes</i> durante armazenamento em refrigeração.....	15
4.	MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1	Preparo do inóculo	20
4.2	Preparo da amostra de queijo contaminada artificialmente	21
4.3	Fatiador.....	22
4.4	Avaliação da transferência de <i>L. monocytogenes</i> de queijo contaminado artificialmente para lâmina do fatiador	23
4.5	Avaliação da transferência de <i>L. monocytogenes</i> da lâmina contaminada para queijo não contaminado.....	24
4.5.1	Contaminação da lâmina	24
4.5.2	Fatiamento de queijo mussarela não contaminado.....	24
4.6	Predição do comportamento de <i>Listeria monocytogenes</i> em fatias de queijo mussarela durante armazenamento em refrigeração.....	25
4.7	Análises estatísticas.....	27
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1	Transferência de <i>Listeria monocytogenes</i> de queijo contaminado	

	artificialmente para a lâmina do fatiador	28
5.2	Transferência de <i>L. monocytogenes</i> da lâmina contaminada para o queijo mussarela	31
5.3	Predição do comportamento de <i>Listeria monocytogenes</i> em fatias de queijo mussarela armazenadas sob refrigeração.....	33
6.	CONCLUSÃO	36
7.	REFERÊNCIAS	37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Identificação e fonte de isolamento das cepas que compuseram o <i>pool</i> de <i>Listeria monocytogenes</i> utilizado para avaliar a transferência do microrganismo durante o fatiamento de queijo mussarela.....	20
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Indicação de rotulagem de tempo e temperatura de armazenamento, após abertura de embalagens, de diversos queijos mussarela coletados em varejo no sul do Brasil.....	26
Tabela 2: Média das contagens de <i>L. monocytogenes</i> sobre a lâmina do fatiador (log UFC/10cm ²), após fatiamento de queijo mussarela contaminado artificialmente.	28
Tabela 3: Contagens médias de <i>Listeria monocytogenes</i> em fatias de queijo contaminadas artificialmente durante o processo de fatiamento de 100 fatias (F100).....	30
Tabela 4: Resultados médios das contagens de <i>L. monocytogenes</i> nas fatias de queijo mussarela não contaminado, após o fatiamento de 100 fatias por lâmina contaminada.....	31
Tabela 5: Média das contagens laboratoriais e valores preditos no software Combase da contaminação das fatias de queijo mussarela contaminadas artificialmente com <i>L. monocytogenes</i> armazenadas a 10°C, por 10 e 15 dias. 33	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Aw	Atividade de Água
CIM	Concentração inibitória mínima
DTA	Doença Transmitida dos Alimentos
FDA	Food and Drug Administration
EUA	Estados Unidos da América
ICTA	Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
IN	Instrução Normativa
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LM	<i>Listeria monocytogenes</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RPM	Rotações por minuto
ROP	Reduced oxygen packaging
SES	Secretaria Estadual de Saúde
UFC	Unidade formadora de colônias
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, *Listeria monocytogenes* é um dos principais patógenos alimentares em nível mundial, uma vez que os surtos de listeriose têm sido relatados em vários países, envolvendo diversas pessoas e altas taxas de mortalidade, configurando essa doença como um grave problema de saúde pública. Tal situação vem mobilizando esforços de muitos órgãos envolvidos na produção e regulação de alimentos, buscando informações sobre a origem de *L. monocytogenes* e seu comportamento na cadeia produtiva, a fim de controlar e prevenir os agravos desencadeados pelo microrganismo. Embora, no Brasil, ainda não haja registros oficiais de surtos de listeriose alimentar, *L. monocytogenes* tem sido frequentemente isolada de alimentos e de seus ambientes de produção, gerando preocupação aos órgãos reguladores e ao setor produtivo.

Devido a importância desse microrganismo, recentemente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) revisou a norma que dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos, alinhando a regulação nacional com normas e diretrizes internacionais, prevendo critérios para *L. monocytogenes* não apenas em queijos, como também em produtos prontos para o consumo, resultando na publicação da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 331 e IN 60 (BRASIL, 2019b). Em consonância com essa preocupação e considerando o perfil de consumo de produtos de fiambreteria no Rio Grande do Sul, a Secretaria Estadual de Saúde publicou recentemente a Portaria Estadual 749, a qual estabelece o regulamento técnico para as boas práticas na comercialização de produtos de origem animal em açougues e fiambretrias (SES - RS, 2019).

No Brasil, o queijo mussarela é um dos mais consumidos (IBGE, 2019). No Sul do país, esse queijo, além de mais consumido, é também comumente fatiado no próprio varejo (supermercados, padarias e armazéns, fiambretrias, entre outros), juntamente com produtos cárneos, e para isso são utilizados fatiadores comerciais nem sempre fáceis de serem higienizados. Diversos estudos apontam a contaminação cruzada durante o fatiamento mecânico de produtos cárneos como um dos fatores causais mais importantes em surtos de listeriose alimentar, entretanto pouco se sabe sobre o perfil de transferência de *L. monocytogenes* em produtos lácteos, durante o fatiamento.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi quantificar a transferência de *L.*

monocytogenes durante fatiamento mecânico do queijo mussarela e, posteriormente, avaliar o comportamento do microrganismo em fatias de queijo armazenadas em refrigeração. Além disso, uma identificação dos principais fatores que contribuem para a contaminação cruzada durante o fatiamento deste queijo foi estudada, a fim de propor medidas de controle e prevenção da listeriose, devido ao consumo de queijo mussarela fatiado.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a transferência de *L. monocytogenes*, durante fatiamento mecânico do queijo mussarela e, posteriormente, investigar a multiplicação desse microrganismo no queijo fatiado armazenado em refrigeração.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Objetivo específico 1

Quantificar a transferência de *L. monocytogenes* de um queijo contaminado para a lâmina de fatiador automático comercial, durante o fatiamento mecânico.

2.2.2 Objetivo específico 2

Quantificar a transferência de *L. monocytogenes* da lâmina do fatiador comercial contaminada artificialmente, para queijo mussarela não contaminado, durante fatiamento mecânico.

2.2.3 Objetivo específico 3

Avaliar se a transferência de *L. monocytogenes* varia ao longo do fatiamento mecânico de queijo mussarela;

2.2.4 Objetivo específico 4

Avaliar o comportamento de *L. monocytogenes* em fatias de queijo armazenadas em refrigeração, comparando estes resultados com os obtidos em *software* de microbiologia preditiva.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Listeria monocytogenes*

A ordem Bacillales contém organismos geralmente quimiorganotróficos, aeróbios e anaeróbios facultativos. Poucos patógenos humanos são encontrados neste grupo, porém o gênero *Listeria* spp. é uma exceção. *Listeria* são cocobacilos gram-positivos, catalase positivos, aeróbios estritos, que tendem a formar cadeias de 3 a 5 células. Embora sejam conhecidas várias espécies de *Listeria*, a espécie *L. monocytogenes* é a mais notável, por causar uma das principais doenças transmissíveis por alimentos, a listeriose (MADIGAN *et al.*, 2016).

O gênero *Listeria* spp. pertence à família Listeriaceae e é dividido em 19 espécies, dentre as quais *L. monocytogenes* é a principal associada às listerioses alimentares humanas, uma vez que as listerioses causadas por *L. ivanovii*, *L. welshimeri* ou *L. seeligeri* são extremamente raras (TONDO; BARTZ, 2019). Recentemente foram relatadas 5 novas espécies de *Listeria* spp., todas consideradas não patogênicas. Entretanto, destas 5 novas espécies, 3 espécies estão mais estreitamente relacionadas a *L. monocytogenes* (CARLIN *et al.*, 2021)

A espécie *L. monocytogenes* é subdividida em 15 sorovares (DOUMITH *et al.*, 2004) (LIU, 2006) (HEIMAN *et al.*, 2016) (CHEN, J. Q. *et al.*, 2017a). Destes, apenas 4 sorovares estão envolvidos na maioria dos casos humanos de listeriose, são eles: 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b (MARTINS; LEAL GERMANO, 2011b). Em um estudo de caracterização fenotípica e molecular de 100 amostras de alimentos (57) e amostras clínicas de humanos (43), no Brasil, entre os anos de 1975 a 2013, foi verificado que quase 50% dos isolados pertenciam ao sorovar 4b, seguidos dos sorovares 1/2b (28%), 1/2c (14%), 1/2a (8%) e 3b (1%) (ALMEIDA *et al.*, 2017).

L. monocytogenes é uma bactéria que não forma endósporos. É móvel por meio de flagelos e multiplica-se entre 0 a 42 °C. *L. monocytogenes* pode multiplicar-se vagarosamente sob temperaturas de refrigeração, ao contrário da maioria dos outros patógenos de origem alimentar, os quais não se multiplicam em temperaturas abaixo de 5 °C. Essas bactérias são menos sensíveis ao calor, quando comparadas a *Salmonella* sp., sendo que a pasteurização é suficiente para destruir ambos microrganismos (FORSYTHE, 2013).

Segundo a IN 60 (2019a), os alimentos prontos para o consumo devem atender aos padrões microbiológicos para *Listeria monocytogenes*, com exceção

dos alimentos que apresentem, pelo menos, uma das seguintes situações: aqueles com vida útil menor que 5 dias; alimentos com pH menor ou igual a 4,4; alimentos com atividade de água menor ou igual a 0,92; alimentos com combinação de pH menor ou igual a 5,0 e atividade de água menor ou igual a 0,94; alimentos que tenham recebido tratamento térmico efetivo ou outro processo equivalente para eliminação de *Listeria monocytogenes* e cuja recontaminação após este tratamento não seja possível, tais como os produtos tratados termicamente em sua embalagem final; frutas e hortaliças frescas, inteiras e não processadas, excluindo sementes germinadas; pães, biscoitos e produtos similares; águas envasadas, águas carbonatadas, refrigerantes, cervejas, cidras, vinhos e produtos similares; açúcares e produtos para adoçar; mel; chocolate e produtos de cacau; balas, bombons e gomas de mascar ou moluscos bivalves vivos.

L. monocytogenes pode persistir no ambiente de processamento de alimentos por muitos anos, mesmo havendo medidas de higiene adequadas. Esse microrganismo possui potencial de contaminar alimentos prontos para o consumo e pode formar biofilmes em superfícies, o que contribui para sua persistência no ambiente (TEIXEIRA; ALVES; MARTINIS, 2017).

Os biofilmes são estruturas biológicas, compostas por microrganismos viáveis e não viáveis, os quais se fixam a superfícies por meio de substâncias poliméricas extracelulares, compostas por polissacarídeos, proteínas, fosfolipídeos, ácido teicóico e nucléicos. Tais substâncias protegem os microrganismos dentro da estrutura do biofilme, além de contribuir para a sua persistência. Os biofilmes podem ser formados em qualquer superfície, seguindo uma sequência de etapas: adsorção dos nutrientes na superfície, dando condição à colonização microbiana - adesão inicial dos microrganismos, a qual, nesta etapa, é reversível e mais tarde irreversível – multiplicação das bactérias irreversivelmente aderidas, com produção de polímeros adicionais, aumentando sua fixação e dando estabilidade às colônias – adesão contínua e multiplicação de células de microrganismos junto com a formação de exopolissacarídeos – descamação de partículas, quando o biofilme começa a desfazer-se, podendo contaminar alimentos ou iniciar um novo biofilme, na linha de produção (FORSYTHE, 2013).

A *Listeria monocytogenes* possui capacidade de formação de biofilmes em muitos materiais, dificultando a sua inativação pela higienização e, conseqüentemente, a sua remoção em indústrias de alimentos e serviços de

alimentação. *L. monocytogenes* persistentes em ambientes industriais formam biofilmes mais espessos que cepas planctônicas (dispersas em líquidos e não aderidas a superfícies), indicando que a formação de biofilmes é uma importante estratégia de sobrevivência para esses microrganismos. Além disso, sabe-se que células em biofilmes são mais resistentes aos detergentes, desinfetantes e antimicrobianos (TIFFANY VICARIO, 2015).

O organismo é transmitido por alimentos contaminados, geralmente aqueles prontos para consumo, como queijos e salsichas, podendo causar desde uma enfermidade branda até uma forma fatal de meningite. *L. monocytogenes* é encontrada no solo e água e, embora não tenha alta frequência em alimentos, praticamente nenhuma fonte alimentar é considerada segura em relação à possível contaminação pela bactéria. Os alimentos podem ser contaminados em qualquer fase da produção ou processamento, mesmo quando são armazenados adequadamente em temperatura de refrigeração (4°C). A conservação dos alimentos por refrigeração é ineficaz na limitação do crescimento de *Listeria* spp., uma vez que esta é psicotrófica. As células do patógeno produzem uma série de ácidos graxos de cadeia ramificada que mantêm a membrana citoplasmática funcional em temperaturas mais baixas. Evidências obtidas a partir de estudos em animais e de casos de listeriose em humanos, além da elevada frequência de contaminação por *Listeria monocytogenes* em alimentos, sugerem que o organismo não seja altamente invasivo e que, provavelmente, seja necessário um grande inóculo para iniciar os sintomas da doença. A listeriose acomete principalmente idosos, mulheres grávidas, recém-nascidos e adultos com o sistema imunológico debilitado (MADIGAN *et al.*, 2016).

A determinação da dose infectante é de importância crucial para a avaliação e gestão de riscos, mas são complicadas pela considerável variabilidade entre subgrupos populacionais e cepas de *L. monocytogenes*. Um estudo que propôs um modelo de dose infectante, considerando variabilidade na virulência da cepa de *L. monocytogenes* e susceptibilidade do hospedeiro, sugere que a maioria dos casos de listeriose está ligada à ingestão de alimentos contaminados com concentrações médias a altas de *L. monocytogenes* (doses entre 3,5 e 7,5 log UFC/porção) (POUILLLOT *et al.*, 2015)

Nos alimentos, o microrganismo geralmente está presente em números relativamente baixos (<100UFC/g). Por causa dos longos períodos de incubação (1

a 90 dias) mostrados por alguns casos humanos, os alimentos incriminados raramente estão disponíveis para análise, em casos de listeriose. Naqueles casos em que estão disponíveis, em geral, os níveis de *L. monocytogenes* nos alimentos envolvidos foram maiores do que 10^3 UFC/g, mas houve casos em que o nível observado de *L. monocytogenes* no alimento envolvido foi substancialmente menor (EUROPEAN COMMISSION, 1999).

Regulamentos da União Europeia determinam que, em alimentos prontos para o consumo (tais como queijos feitos com leite cru e pasteurizado), *L. monocytogenes* não deve exceder o limite de 100 UFC/g, ao longo do prazo de validade (COMISSÃO EUROPEIA, 2005; EUROPEIAS, 2007).

O regulamento brasileiro, recentemente publicado, determina que durante todo o prazo de validade deva ser assegurado que os alimentos cumpram com os padrões microbiológicos estabelecidos, sendo que, para alimentos prontos para o consumo, o padrão para *L. monocytogenes* não deve ser superior a 10^2 UFC/g ou mL, num plano amostral de cinco unidades amostrais coletadas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente. Alimentos prontos para o consumo destinados a lactentes ou para fins especiais, o padrão para *L. monocytogenes* é ausência num plano amostral de dez amostras coletadas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente (BRASIL, 2019b, 2019a).

3.2 Queijo mussarela

O Queijo Mussarela é aquele que se obtém por filagem de uma massa acidificada (produto intermediário obtido por coagulação de leite por meio de coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas), complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas. Os ingredientes obrigatórios do queijo mussarela são: leite e/ou leite reconstituído padronizados ou não no seu conteúdo de matéria gorda, coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas e cloreto de sódio (BRASIL, 1997). Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda (BRASIL, 2017).

O mercado de queijos tem sido um dos segmentos de alimentos mais dinâmicos nos últimos 20 anos, com crescimento constante na produção, consumo e comércio internacional. Em 2009, a produção mundial de queijo ultrapassou a marca

de 20 milhões de toneladas e aproximadamente 1/3 da produção mundial de leite de vaca é processada em uma ampla variedade de queijos diferentes. Isso é mais do que a produção anual de grãos de café, folhas de chá, grãos de cacau e tabaco combinados. O maior produtor de queijos são os EUA, responsáveis por 30% da produção mundial, seguidos da Alemanha e da França. O maior exportador de queijo em valor monetário é a França; seguida pela Alemanha (embora seja a primeira em quantidade). Entre os dez maiores exportadores, apenas Irlanda, Nova Zelândia, Dinamarca, Holanda e Austrália têm uma produção de queijo que é principalmente voltada para exportação: respectivamente 95%, 90%, 77%, 72% e 65% de sua produção de queijo é exportada. A Alemanha é o maior importador de queijo e o Reino Unido e a Itália são o segundo e o terceiro maiores importadores. A Grécia é o maior consumidor (*per capita*) de queijo do mundo, com 27,3 kg (o feta representa $\frac{3}{4}$ desse consumo). A França é o segundo maior consumidor de queijo, contando com 24 kg *per capita*, sendo que o emmental e o camembert são os queijos mais comuns, na França. Itália é a terceira maior consumidora, com 23 kg *per capita* (PM FOOD & DAIRY CONSULTING, 2014).

Queijo mussarela é um dos queijos frescos mais vendidos na Itália, representando 25% do mercado de queijos. É um queijo de “pasta filata” (massa filada) macio e não curado fabricado a partir de leite pasteurizado ou não pasteurizado. Leite bovino ou de búfala são os mais usados. Dois diferentes métodos de acidificação podem ser aplicados durante sua fabricação: acidificação direta por adição de ácidos orgânicos de qualidade alimentar (normalmente, ácido cítrico é adicionado ao leite pasteurizado, antes da inclusão de coalho) ou acidificação microbiana resultante do crescimento de culturas termofílicas iniciais (TIRLONI *et al.*, 2019).

Desde o ano de 2010, as importações de queijo na China triplicaram, o que envolve queijo fresco e tipo coalhada, incluindo mussarela; tal tipo de queijo respondeu por 58% das importações de queijo, em 2014 (HOOGWEGT GROEP B.V., 2015).

Mussarela é o queijo preferido da América e responde por quase um terço do consumo, principalmente por ser um dos principais ingredientes da pizza. Na Argentina, tipos macios/frescos (Mozzarella, Cremoso, Saint Paulin) dominam as categorias de queijos e abrangem 50% do mercado (PM FOOD & DAIRY CONSULTING, 2014).

Os EUA lideram o consumo global de queijos de massa filada em 54,5% do volume, seguido por Brasil (6,6%), Itália (5,2%), Alemanha (5,2%) e Canadá (3,7%) (GEA, 2016).

O consumo *per capita* de queijo mussarela vem crescendo nos Estados Unidos, desde 1995. A partir de 2010 até 2019, o queijo do tipo mussarela ultrapassou definitivamente o consumo do queijo cheddar, que era até então o tipo de queijo mais consumido nos Estados Unidos (USDA, 2020).

No Brasil, assim como no sul do país, o queijo mussarela é um dos queijos mais adquiridos, conforme dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019).

Contaminação do leite por *L. monocytogenes* usado para a produção de queijo pode ocorrer durante a ordenha. Contudo, se o patógeno estiver presente no leite, é provavelmente inativado durante o processo de produção de mussarela, devido ao tratamento térmico aplicado durante a etapa de filagem, onde as temperaturas podem chegar a 90 a 95°C. Contaminação também pode ocorrer durante ou após o processo de fabricação de queijo (TIRLONI et al., 2019). Esta contaminação foi confirmada em um estudo que revelou uma alta prevalência de *L. monocytogenes* (24,4%) em queijo mussarela com os mesmos sorotipos encontrados em amostras ambientais do seu local de produção, sugerindo contaminação após tratamento térmico, caracterizando contaminação cruzada (GRECO et al., 2014).

Não é nenhuma surpresa que alguns produtos lácteos tenham sido envolvidos em surtos de listeriose, porque todos os queijos frescos e macios, incluindo mussarela, podem potencialmente representar um ambiente de crescimento adequado para *L. monocytogenes*, devido às suas características físico-químicas (umidade elevada e pH próximo da neutralidade) (TIRLONI et al., 2019).

Vários alertas também foram emitidos pelo *Rapid Alert System* para Alimentos quanto à presença de *L. monocytogenes*, em diversos tipos de queijo, incluindo o queijo mussarela, durante o período de 2009 a 2018 (RASFF, 2021).

3.3 Surto de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) envolvendo *Listeria monocytogenes*

As DTA são definidas como doenças causadas pela ingestão de alimentos contaminados por agentes químicos ou biológicos. As doenças de origem

alimentar podem ser provocadas por bactérias, fungos, protozoários, vírus e agentes químicos, sendo as bactérias, por sua diversidade e patogenicidade, o maior causador de DTA, no Brasil (BRASIL, 2016). Para ser considerado um surto de DTA, duas ou mais pessoas devem apresentar sinais e sintomas semelhantes, após ingerirem alimentos e ou água contaminados em um determinado período de tempo. Em casos de contaminação por *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli* O157:H7 e *L. monocytogenes*, devido à alta severidade, a ocorrência de apenas um caso já é considerado surto (GERMANO; GERMANO, 2011).

Infecções por *L. monocytogenes* podem resultar em gastroenterite leve com febre, em indivíduos saudáveis. No entanto, doenças invasivas caracterizadas por bacteremia, meningite, pneumonia, endocardite e septicemia podem ocorrer, principalmente em grupos enquadrados na categoria de alto risco (FERREIRA *et al.*, 2014).

Apesar das altas taxas de contaminação de certos alimentos com *L. monocytogenes*, a listeriose é uma doença relativamente rara em comparação com outras doenças de origem alimentar, como campilobacteriose ou salmonelose. No entanto, devido à sua alta taxa de letalidade, a listeriose é, após a salmonelose, a segunda causa mais frequente de mortes relacionadas a infecções transmitidas por alimentos na Europa (ALLERBERGER; WAGNER, 2010).

A listeriose é uma infecção grave geralmente causada pelo consumo de alimentos contaminados com a bactéria *L. monocytogenes*. Nos Estados Unidos, estima-se que 1600 pessoas contraem listeriose a cada ano e que aproximadamente 250 morrem por essa enfermidade (CDC, 2017). Em um estudo realizado na Espanha, baseado em registros de hospitalização entre 1997 e 2015, foram relatados 5.696 casos de listeriose, envolvendo idosos, mulheres grávidas e recém nascidos, a maioria em condições imunocomprometidas, com 17% de mortalidade, retratando a listeriose como um grande problema de saúde pública emergente naquele país (HERRADOR *et al.*, 2019).

Há vários relatos internacionais recentes de surtos de DTA associados a *L. monocytogenes*, envolvendo uma grande variedade de alimentos, incluindo sorvete (CHEN, Y. *et al.*, 2017b; LI *et al.*, 2017), produtos prontos para consumo à base de carnes, patês (ALTHAUS *et al.*, 2017; JENSEN *et al.*, 2016), peixes prontos para consumo (LYYTIKÄINEN *et al.*, 2006; SCHJØRRING *et al.*, 2017), frutas com caroço (CHEN, Y. *et al.*, 2016), queijos (CHEN, Y. *et al.*, 2017c) e maçã

caramelizada (ANGELO *et al.*, 2017).

Em dezembro de 2018, foi relatado um surto de listeriose na Áustria, envolvendo 32 pessoas, após o consumo de um patê de fígado contaminado, resultando em 11 doentes, com um caso grave de septicemia (CABAL *et al.*, 2019).

Na República Tcheca, entre os anos de 2012 a 2016, foi observado um aumento no número de casos de listeriose. Neste período foram relatados 26 doentes, sendo 3 casos fatais, envolvendo consumo de carne de peru de uma *delicatessen*. As cepas de *L. monocytogenes* isoladas nestes casos foram idênticas nos alimentos embalados pelo mesmo produtor entre 2012 a 2016, indicando que o patógeno persistiu no ambiente de produção ao longo dos anos (GELBÍČOVÁ *et al.*, 2018).

Entre os anos 2017 e 2018, o Departamento de Saúde da África do Sul reportou o maior surto de listeriose alimentar do mundo, até o momento, envolvendo o consumo de um alimento embutido à base de carne (denominado “*Polony*”) produzido por uma empresa da região. O surto ocasionou mais de 1000 casos, resultando em mais de 200 mortes, mobilizando os serviços de saúde daquele país, bem como das autoridades internacionais (WHO | LISTERIOSIS – SOUTH AFRICA, 2018).

Recentemente, as autoridades regionais de saúde da cidade de Andaluzia, no sul da Espanha, reportaram à Organização Mundial de Saúde (OMS) um grande surto de listeriose alimentar desencadeado pelo consumo de carne suína assada refrigerada, fabricada naquele país. De julho a setembro de 2019, foram confirmados 222 casos envolvendo 5 regiões da Espanha. Dentre os casos, foram reportados 3 mortes e 6 abortos (WHO | LISTERIOSIS– SPAIN, 2019).

Nos Estados Unidos, dos 58 surtos de listeriose notificados, entre 1998 e 2014, 30% foram associados ao consumo de queijos úmidos, resultando em 180 doentes, 14 abortos e 17 óbitos (JACKSON *et al.*, 2018).

Um estudo realizado no norte da Itália revelou um grande surto de listeriose relacionado ao consumo de um queijo macio denominado Taleggio, entre os anos 2009 a 2011, envolvendo 36 casos. Neste surto, o mesmo perfil molecular foi identificado nos isolados oriundos da amostra de queijo, ambiente de processamento do queijo e amostras clínicas dos casos, sinalizando que a provável fonte de contaminação do alimento localizava-se no seu ambiente de produção (AMATO *et al.*, 2017). Na mesma região da Itália, 50% dos casos de listeriose

humana foram atribuídos a produtos lácteos, seguidos por aves e suínos (15% cada) e alimentos mistos (15%), sugerindo que o controle do patógeno na produção primária poderia reduzir o risco de contaminação cruzada em nível de consumidor (FILIPELLO *et al.*, 2020)

Um surto de listeriose na Noruega envolvendo 17 pacientes internados em um hospital, foi relacionado ao consumo de queijo tipo camembert altamente contaminado ($3,6 \times 10^8$ UFC/porção), resultando em 3 mortes. Dos 17 pacientes envolvidos, 15 deles encontravam-se no grupo de risco para listeriose (JOHNSEN *et al.*, 2010).

Numa visão geral mundial de surtos de listeriose ocasionados pelo consumo de queijo, entre 1983 e 2016 (MARTINEZ-RIOS; DALGAARD, 2018), vários casos ocorreram pelo consumo de queijos frescos. Neste mesmo estudo de revisão, um total de 130.604 amostras oriundas da literatura científica e dados das autoridades europeias foram analisadas, mostrando prevalências diferentes de *L. monocytogenes* para cada tipo de queijo, entre os anos de 2005 a 2015: queijo fresco 0,8%, maturado 2,0%, queijo cremoso 5,1% e queijo curados em salmoura 11,8%.

No Brasil, embora ainda não haja registros oficiais de surtos de listeriose alimentar, *L. monocytogenes* tem sido frequentemente isolada de alimentos e de seus ambientes de produção. O frequente isolamento deste patógeno nos alimentos indica que a doença pode estar ocorrendo no país, mesmo não sendo identificada (DESTRO, 2013)

3.4 Contaminação cruzada em fatiadores

Produtos processados, como carnes e queijos que passaram por uma etapa de cozimento adequada para inativar *L. monocytogenes*, podem ser recontaminados quando abertos, fatiados e reembalados em varejo. Assim, uma simples operação de embalagem ou reembalagem pode apresentar uma oportunidade para a recontaminação com patógenos se não houver salvaguardas sanitárias rigorosas (FDA, 2017).

Em uma revisão que associou *L. monocytogenes* em ambiente de varejo e fiambrias, onde vários produtos alimentícios foram fatiados, verificou-se que *L. monocytogenes* isoladas deste ambiente possuíam prevalência maior de fatores de virulência em comparação com os isolados dos alimentos ali fatiados. Entretanto, esta prevalência assemelha-se muito com os isolados clínicos, sugerindo que o

ambiente de varejo e fiambrias, é a principal fonte de casos de listeriose clinicamente reconhecidos. O mesmo estudo enfatizou que para combater o patógeno e prevenir a contaminação cruzada neste local deve haver intervenção diária no ambiente, no que refere-se ao programa de limpeza (FORAUER; WU; ETTER, 2021).

Com relação a *L. monocytogenes*, as fatiadoras de *delicatessens* costumam ser a principal fonte de contaminação cruzada. Em um estudo que rastreou a contaminação em um ambiente de *delicatessen*, foi verificado que várias áreas do fatiador tinham o maior risco de contaminação cruzada (SIRSAT *et al.*, 2014).

Lin *et al.* (2006) avaliaram a contaminação cruzada por *L. monocytogenes* entre fatiador e produtos cárneos (peru assado, salame e mortadela), indicando que *L. monocytogenes* pode ser transferida de um fatiador contaminado (10^1 a 10^3 UFC/lâmina) para carnes e pode sobreviver ou crescer melhor em peru assado do que em salame ou mortadela com conservantes. Contagens superiores de células de *L. monocytogenes* inoculadas na lâmina do fatiador resultaram em mais amostras de carne fatiada positivas para *L. monocytogenes*.

O fatiador possui fundamental importância no processo de contaminação cruzada durante fatiamento de produtos cárneos, o que pôde ser observado por Chen, Zhao e Doyle (2014) ao fatiar produtos cárneos inoculados superficialmente com *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *E. coli* O157:H7. Todos os patógenos foram recuperados de todos os locais de contato do fatiador que foram testados, após fatiar os referidos alimentos inoculados.

A contaminação cruzada microbiana, seja em casa ou no local de produção, é um dos principais fatores causais de contaminação microbiana de alimentos, podendo ocasionar DTA. O estudo de Sheen e Hwang (2010) demonstra a importância acerca do conhecimento sobre a transferência de *E. coli* O157:H7 entre carnes de *delicatessen* pronta para consumo e o fatiador usado para fatiar diferentes alimentos, a fim de garantir a segurança do alimento pronto para consumo.

Segundo Hoelzer *et al.* (2012) a *L. monocytogenes* é facilmente encontrada no ambiente de estabelecimentos de *delicatessen* e pode ocasionalmente contaminar os alimentos manipulados nesses estabelecimentos. Este estudo sintetizou os modelos matemáticos de transferência de *L.*

monocytogenes entre superfícies ambientais e alimentos, incluindo aqueles durante o fatiamento de alimentos. Em geral, os coeficientes de transferência são baixos, embora a contaminação cruzada possa ser extremamente eficaz, sob certas condições. Conseqüentemente, dezenas de itens alimentares podem ser contaminados a partir de uma única fatiadora, mesmo que em baixas concentrações. A higienização realizada corretamente reduz de forma eficaz a contaminação por *L. monocytogenes* do ambiente e, portanto, limita a contaminação cruzada, embora seja apenas realizada algumas vezes por dia.

Com base nos modelos matemáticos resultantes da transferência de *L. monocytogenes* durante fatiamento de salmão Gravlax, foi estimado que se o nível de contaminação inicial da lâmina foi alto (5,9 log UFC/ lâmina, ou aproximadamente $2,1 \times 10^3$ UFC/cm², com 10 min. tempo de fixação), a quantidade de *L. monocytogenes* nas fatias apresenta grande redução na contagem somente após o fatiamento de 127 fatias, e quando o fatiamento é realizado em temperatura ambiente. Quando o nível de inóculo foi menor (3,0 log UFC/lâmina, ou seja, aproximadamente 2,6 log UFC/cm²), o patógeno foi detectado esporadicamente, sendo mais detectado no início do fatiamento (exceto na primeira fatia). Para minimizar a ocorrência de *L. monocytogenes* sendo transferida para fatias de salmão, uma abordagem sugerida seria descartar as primeiras fatias no início da operação. A lâmina, a proteção da lâmina e a placa de suporte devem ser periodicamente desmontadas, limpas e desinfetadas para evitar contaminação prolongada do produto com *L. monocytogenes* (AARNISALO *et al.*, 2007).

Em julho de 2012, foi isolada *L. monocytogenes* de seis pacientes e duas amostras de cortes diferentes de queijos reembalados, em virtude de uma investigação de surto de listeriose envolvendo 22 casos, incluindo 4 mortes e um aborto. Nesta investigação foi verificado que o queijo contaminado (ricota) com a cepa causadora do surto contaminou outros tipos de queijos envolvidos no surto, provavelmente cortados no mesmo equipamento utilizado para cortar a ricota contaminada, configurando a contaminação cruzada como o fator causal do surto. A contaminação cruzada do queijo destaca a importância do uso de protocolos de limpeza e desinfecção efetivos, após o corte de cada produto (HEIMAN *et al.*, 2016)

L. monocytogenes tem sido implicada em vários surtos de DTA ligados ao consumo de carnes prontas para consumo, o que atraiu considerável atenção em relação à possível contaminação cruzada durante a operação de fatiamento em

ambientes de varejo. Salame com 15% de gordura foi utilizado para investigar a transferência de *L. monocytogenes* entre fatiador e salame. Os resultados mostraram que os modelos empíricos desenvolvidos neste estudo foram razoavelmente precisos na descrição do padrão de transferência de *L. monocytogenes* entre a lâmina e as fatias de salame se o nível de inóculo for maior que 5 log UFC/100cm² no salame ou maior do que 5 log UFC/cm² da lâmina. Com um inóculo inicial menor que 5 log UFC, os dados experimentais sugerem um padrão bastante aleatório de transferência bacteriana entre a lâmina e o salame, (SHEEN, S., 2008).

Existem vários fatores que podem afetar a transferência de *L. monocytogenes* durante o fatiamento, muitos já descritos em literatura: (1) as composições da carne de delicatessen (umidade, teor de gordura e formulação), (2) as características da superfície de corte (textura, homogeneidade) da carne deli, (VORST; TODD; RYSER, 2006), (3) RPM da lâmina de corte, (4) o diâmetro de lâmina, (5) material da lâmina, (ARNOLD; BAILEY, 2000), (6) força de peso exercida para entrar em contato com a superfície da lâmina, (7) a velocidade de fatiamento, (8) o ângulo de contato, área e espessura da fatia (ATKINS; XU, 2005), (9) o microrganismo (idade, cepa, tamanho do inóculo, capacidade de adaptar a diferentes tensões e adesão a superfícies) (MAFU *et al.*, 1991) (KESKINEN; TODD; RYSER, 2008), (10) condição ambiental (por exemplo: temperatura) (AARNISALO *et al.*, 2007). Os dois primeiros fatores estão relacionados a fatores físicos do alimento, enquanto que os fatores de 3 a 8 são operacionais. Embora nem todos os fatores físicos tenham impacto significativo sobre *L. monocytogenes*, o estudo de sua transferência no sentido de identificar e quantificar esses fatores continua sendo um desafio (SHEEN, S., 2008).

3.5 Comportamento de *L. monocytogenes* durante armazenamento em refrigeração

Em um estudo de sobrevivência de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo, foram avaliadas diversas categorias de alimentos comercializados no varejo, incluindo carnes, saladas, queijos frescos e suaves de “estilo hispânico”, queijos maturados com mofo, frutos do mar defumados e saladas com frutos do mar. Foram testadas 31.705 amostras, onde a prevalência geral foi de 1,82%, com prevalências variando de 0,17 a 4,7% entre as categorias de produtos. Foram verificadas prevalências mais altas em carnes e saladas embalados na loja

do que para estes alimentos embalados pelo fabricante. Esta tendência foi atribuída ao manuseio adicional em lojas de varejo, resultando em mais amostras contaminadas, bem como manutenção em diferentes temperaturas de refrigeração no varejo, resultando em crescimento em níveis detectáveis nos alimentos embalados na loja (GOMBAS et al., 2003).

Segundo o código alimentar estabelecido pela FDA (2017), a *L. monocytogenes* é um dos perigos encontrados em queijos comercializados no varejo e requerem algumas medidas de controle importantes como: cozimento, identificação de data de validade, conservação a frio, lavagem das mãos e prevenção de contaminação cruzada. É indicado o uso de embalagem com oxigênio reduzido (Reduced oxygen packaging - ROP) apenas para queijos duros (aqueles com até 39% de umidade) e semi *softs* (umidade entre 39 e 50%). Os processadores de produtos que usam ROP devem incluir precauções extras se planejam confiar na refrigeração como única barreira que garante a segurança do produto. Esta abordagem requer controles de temperatura muito rigorosos de produtos e equipamentos de refrigeração. Se o prazo de validade for estendido, uma temperatura de 3,3°C ou inferior deve ser mantida para evitar o crescimento de *C. botulinum* e a subsequente produção de toxina. *Listeria monocytogenes* pode crescer em temperaturas ainda mais baixas; conseqüentemente, devem ser estabelecidas datas de validade adequadas. Barreiras de crescimento são fornecidas pelo baixo pH, aW, vida útil curta e monitoramento constante da temperatura do produto. Qualquer obstáculo, ou uma combinação de vários, pode ser usado com refrigeração para controlar o crescimento do patógeno.

No estudo desenvolvido por Leong et al. (2014), foram analisados 67 queijos adquiridos no varejo para avaliar, além de outros patógenos, o crescimento de *Listeria monocytogenes*, durante 15 dias, a 25°C. Fatias de queijo de diferentes marcas e tipo foram inoculados com um *pool* composto por 10 cepas de *L. monocytogenes* na concentração de aproximadamente 10⁵ UFC/g. Foi avaliado também a concentração de sal, porcentagem de acidez titulável, pH e aW, além do nível de bactérias inativas/iniciadoras. *Listeria monocytogenes* cresceu em 4 queijos, os quais sustentaram seu crescimento na faixa de 0,60 a 2,68 log UFC/g (média 1,60 log UFC/g). O crescimento do patógeno variou dentro de tipos ou lotes de queijo e foi influenciado pelo pH e porcentagem de sal. Esses dois fatores foram usados para estabelecer condições de limite de crescimento/não crescimento para

armazenamento seguro e prolongado (<25°C) de queijos de leite pasteurizado.

Tirloni et al. (2019) avaliaram o potencial de crescimento de *L. monocytogenes* em 33 marcas de queijo mussarela, em termos de características físico-químicas e microbiológicas que influenciam no crescimento do patógeno (populações microbianas, umidade, pH, e ácidos orgânicos). Quase todos os queijos foram classificados como mussarela de alta umidade (> 52%) e com pH variando de 5,32 a 6,43, dependendo da metodologia de fabricação aplicada. As concentrações de ácido orgânico detectadas em todas os produtos eram inferiores a concentração inibitória mínima (CIM) relatado na literatura para *L. monocytogenes*. Portanto, as concentrações de ácido orgânico foram insuficientes para prevenir o crescimento de *Listeria*, o que foi confirmado pela simulação de contaminação pós produção (2 a 3 log UFC/g) com crescimento muito rápido em todas as temperaturas de armazenamento aplicadas (de 4°C a 20°C – aprox. 4 a 16 dias). A *Listeria monocytogenes* não foi inibida pela microflora presente ou pelas condições ambientais (ácidos orgânicos, pH) presente na matriz alimentar. Boas práticas de higiene deve ser aplicadas, especialmente com o objetivo de evitar contaminação pós-produção de mussarela. *L. monocytogenes* pode ser um risco para a segurança do queijo mussarela, uma vez que pode ocorrer contaminação quando a embalagem é aberta. O manuseio correto, especialmente durante o armazenamento doméstico, é sugerido para minimizar o potencial de replicação de bactérias patogênicas, como *L. monocytogenes* que foram capazes de crescer em diferentes condições de armazenamento.

Diferentes características físico-químicas e microbiológicas dos queijos podem afetar o potencial de *Listeria monocytogenes* de crescer, sobreviver ou exibir uma resposta ácido adaptativa durante o armazenamento e sua digestão. Em um estudo que objetivou avaliar a sobrevivência ou potencial de crescimento de *L. monocytogenes* em vários tipos de queijos durante o armazenamento, bem como o efeito da microbiota normal do queijo no crescimento deste patógeno e sua resistência a digestão gástrica simulada, foram inoculados porções destes queijos com aprox. 100 UFC/g ou cm² de *L. monocytogenes* e armazenados sob vácuo ou condições aeróbias, a 7°C. Os queijos utilizados no experimento foram adquiridos com datas diferentes em relação à produção e data da validade, para verificar o impacto de níveis variáveis de cultura inicial ou microbiota de deterioração. A sobrevivência em fluido gástrico simulado (pH 1,5; HCl; máx. 120min.) foi avaliada

em três tempos, durante o armazenamento. Verificou-se que dentre os queijos avaliados, o tipo mussarela suportou o crescimento de *L. monocytogenes* de aproximadamente 7,0 – 8,0 log UFC/g ou cm² após 15–20 dias de armazenamento, a 7°C, e altos valores de pH (aprox. 6,23±0,01) e Aw (0,985±0,002-0,986±0,009). O crescimento de *L. monocytogenes* foi significativamente suprimido ($p < 0,05$) nas amostras adquiridas perto da data de validade (com altas contagens totais de células viáveis), em comparação com aquelas próximas à data de produção, independentemente do tipo de queijo. Os queijos que suportaram o crescimento de *L. monocytogenes* possibilitaram maior sobrevivência na acidez gástrica ao longo de sua vida útil em comparação com os queijos que não suportaram o crescimento (KAPETANAKOU *et al.*, 2017a).

Tal perfil de crescimento não foi verificado no estudo de Angelidis *et al.* (2010), o qual avaliou o comportamento de *L. monocytogenes* em um queijo fundido processado com as seguintes características físico químicas: umidade 41,9%, gordura 22%, pH 5,0 e Aw 0,9273. O crescimento do patógeno foi avaliado ao longo do tempo, inoculando o produto com três diferentes cepas de *L. monocytogenes*, em três diferentes níveis de inoculação (aprox. 10⁵, 10³ e 10² UFC/g de queijo ou menos) e após armazenamento dos produtos contaminados a 4°C, 12°C ou 22°C. O crescimento de *L. monocytogenes* não foi observado em nenhum dos ensaios experimentais ao longo do período de armazenamento (até 1 ano). As populações de *L. monocytogenes* diminuíram ao longo do tempo com uma taxa que foi dependente da cepa e da temperatura de armazenamento. No entanto, para queijos inoculados com o inóculo superior e armazenados a 4°C, populações viáveis de *L. monocytogenes* puderam ser detectadas por até nove meses, após a inoculação. Os resultados enfatizam que o tipo de queijo testado deve ser classificado como aquele que não suporta o crescimento do patógeno, condições de distribuição e armazenamento dentro do previsto no estudo. No entanto, a contaminação pós-processamento do produto deve ser evitada de forma rigorosa, uma vez que o patógeno pode sobreviver no produto por longos períodos, particularmente sob armazenamento refrigerado (4°C).

A capacidade do queijo (feta e queijo macio de leite de cabra) para permitir o crescimento de *L. monocytogenes* foi determinado usando um inóculo inicial de aproximadamente 100 UFC/g. O queijo foi incubado a 8°C, por 14 dias. Os resultados mostraram que o queijo não suportou o crescimento de *Listeria*

monocytogenes. A partir deste estudo, ficou evidente que existem outros fatores nos alimentos além do pH, aW e contagem bacteriana total que podem inibir a *L. monocytogenes* em alimentos (HUNT *et al.*, 2018).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparo do inóculo

Foi utilizado um *pool* composto por seis cepas de *L. monocytogenes*, das quais cinco foram isoladas de amostras de queijo mussarela, ambientes de fabricação de produtos lácteos e de serviços de alimentação. Tais cepas foram isoladas pelos órgãos de fiscalização municipais e estaduais do Rio Grande do Sul. A sexta cepa utilizada no *pool* foi isolada de produtos lácteos, pertencente ao Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS), identificada como 7459, proveniente de ambiente de laticínio. A identificação de cada cepa está descrita no Quadro 1.

Quadro 1: Identificação e fonte de isolamento das cepas que compuseram o *pool* de *Listeria monocytogenes* utilizado para avaliar a transferência do microrganismo durante o fatiamento de queijo mussarela.

Identificação da cepa	Fonte
LM1	Queijo mussarela fatiado
LM2	Queijo mussarela em pedaços
LM3	Queijo mussarela ralado
LM4	Queijo mussarela fatiado
LM5	Lâmina fatiador
7459	Ambiente de laticínio

Uma colônia de cada cepa de *L. monocytogenes* foi semeada separadamente em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI; Merck, Darsmtadt, Alemanha) adicionado de 0,6% de extrato de levedura (YE; Kasvi; modelo K25-611005, São José dos Pinhais, Brasil), incubados a 37°C, por 24h. Após incubação, uma alíquota de cada cultura foi novamente semeada em caldo (BHI+0,6%YE) e incubado novamente em estufa a 37°C, por 24h, a fim de obter culturas bacterianas fisiologicamente ativas. Para a formação do *pool*, foi transferido 1mL de caldo (BHI+0,6%YE) de cada cultura, para um tubo Falcon. Este *pool* foi centrifugado (1000g, 10min, 4°C) (CIENEC CT-5000R, Brasil), sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* lavado com água peptonada estéril 0,1% (m/m) (Merck, Darsmtadt, Alemanha). Esse procedimento foi repetido três vezes, sendo que na terceira repetição, as células foram ressuspensas em 10mL de água peptonada

estéril 0,1% (m/m), e a concentração final de 10^8 UFC/mL foi ajustada por meio de densidade óptica (DO630nm), utilizando equipamento Ultrospec 3100™ Pro (Amersham Biosciences, Reino Unido). O número de células foi confirmado por semeadura em placas com ágar seletivo para *Listeria Oxford* (Merck, Darsmtadt, Alemanha), adicionado de suplemento seletivo para *Listeria Oxford* (Merck, Darsmtadt, Alemanha). Em seguida, foram preparadas diluições decimais seriadas em água peptonada estéril 0,1% (m/m) até que o *pool* de *L. monocytogenes* atingisse uma concentração de aproximadamente 10^7 UFC/mL, o qual foi utilizado para a contaminação artificial do queijo, conforme descrito no subitem 4.2.

4.2 Preparo da amostra de queijo contaminada artificialmente

Uma peça de queijo mussarela, produzida em estabelecimento devidamente inspecionado (selo de inspeção federal – SIF 2977), foi adquirida em comércio local, na cidade de Canoas, Rio Grande do Sul, sul do Brasil. As dimensões da peça (padrão comercial) eram de aproximadamente 25 cm de comprimento, 10cm de altura e 9cm de largura, e 2Kg. A peça adquirida foi armazenada conforme temperatura contida em sua rotulagem (0°C a 10°C), até o momento de ser utilizada. De acordo com a rotulagem, a composição do queijo era: leite pasteurizado semidesnatado, fermento láctico, cloreto de cálcio (agente de firmeza), quimosina e sal (NaCl 0,7%). Os parâmetros físico-químicos declarados no rótulo eram: gordura (23%), umidade (48%) e proteína bruta (26,30% m/m). O pH foi medido em pHmetro modelo Q400A (Quimis®, São Paulo, Brasil), enquanto a atividade de água (aw) foi medida em Water Activity Analyzer (Decagon Devices, Washington, Estados Unidos), resultando em 5,36 e 0,981, respectivamente.

A amostra de queijo foi artificialmente contaminada com o *pool* de *L. monocytogenes* no Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS). Dentro de uma cabine de fluxo laminar e com o auxílio de uma faca previamente esterilizada, o queijo foi retirado de sua embalagem primária. Utilizando uma forma de plástico forrada com um filme plástico, o queijo foi preparado para a próxima etapa. A contaminação da amostra ocorreu conforme metodologia utilizada por Sheen e Hwang (2008) adaptada: 1 mL do *pool* de *L. monocytogenes* ($7 \log$ UFC/mL) foi espalhado superficialmente nas quatro faces do queijo (exceto a base e o topo da peça). Este método, segundo Sheen e Hwang

(2008), garante a máxima transferência de células de *L. monocytogenes* para a lâmina do fatiador, se comparado com a inoculação de todas as faces, incluindo o topo e a base, pois maximiza a transferência para o fatiamento subsequente do queijo não contaminado. Com o auxílio de uma pipeta, 250µL do *pool* foi disposto em cada face do queijo, (25x10x9cm). Em seguida, uma alça de Drigasliki foi utilizada para espalhar o inóculo em cada superfície do queijo, até absorção. Dessa forma, cada fatia de aproximadamente 2 mm de espessura e peso aproximado de 20gr, apresentou uma concentração final de aproximadamente 10⁵ UFC de *L. monocytogenes*.

A peça de queijo contaminada foi mantida na câmara de fluxo laminar por 20 minutos, a fim de promover a melhor adesão do inóculo na peça. Posteriormente, a peça foi coberta com um saco plástico estéril e mantida a 4°C, por uma hora, antes dos experimentos (VORST; TODD; RYSER, 2006), a fim de que o queijo ficasse o mais firme possível para o fatiamento.

4.3 Fatiador

Um fatiador de modelo comercial (HOBART 2712, United States of America) foi utilizado neste estudo, o qual é um dos modelos mais amplamente utilizados em fiambrias de supermercados. Este fatiador possui uma lâmina cuja área chanfrada é de 175,84 cm² (área que entra em contato com o alimento durante o fatiamento). A higienização do fatiador foi realizada antes e após cada experimento, em local específico e diferente da sala onde ocorria o fatiamento, com a finalidade de prevenir possível contaminação ambiental por *L. monocytogenes*. Primeiramente, procedeu-se a desmontagem do equipamento, conforme manual de instrução, e após a etapa de limpeza e retirada de resíduos aparentes, com detergente neutro e água potável, e posterior enxágue, a desinfecção foi realizada com ácido peracético a 1% (Kalykim S 360, Alvorada, Brasil), por 10 minutos. O fatiador foi seco naturalmente em temperatura ambiente, antes de cada uso. Após cada higienização do fatiador, 10cm² da área chanfrada da lâmina foi amostrada por meio de um *swab* (Labplas KSS-67310-BPW Sani-Stick, Quebec, Canadá) para verificação do processo de higienização. Para isso, cada *swab* foi imerso em 90mL de água peptonada estéril (m/m) 0,1% e homogeneizado por 10 segundos. Uma alíquota de 1mL foi semeada em placa contendo ágar seletivo para *Listeria* Oxford (Merck, Darsmtadt, Alemanha), adicionado de suplemento seletivo para *Listeria*

Oxford (Merck, Darsmtadt, Alemanha), em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C, por 48 horas, sendo então verificadas quanto a presença/ausência de colônias típicas. Não havendo colônias típicas de *L. monocytogenes*, os experimentos prosseguiram.

O equipamento foi ajustado de tal maneira a produzir fatias na dimensão mais utilizada comercialmente em varejos (aproximadamente 2 mm de espessura; peso de aproximadamente de 20g).

4.4 Avaliação da transferência de *L. monocytogenes* de queijo contaminado artificialmente para lâmina do fatiador

Para avaliar a transferência de *L. monocytogenes* presente na peça de queijo mussarela contaminada artificialmente para a lâmina do fatiador previamente higienizado (conforme descrito no subitem 4.3), foi realizado o fatiamento de determinadas quantias de fatias. Quantidades diferentes de fatias foram produzidas, a fim de verificar se a quantidade de fatias influenciava no nível de transferência de *L. monocytogenes* para a lâmina. A lâmina foi amostrada através de *swabs* após fatiar quantidades diferentes de fatias, em 4 etapas separadas: fatiando 1, 5, 50 e 100 fatias. A cada *swab* coletado, o fatiador foi novamente higienizado (conforme descrito no subitem 4.3), iniciando novo fatiamento de queijo contaminado artificialmente, em cada etapa. Além dos *swabs*, foram coletadas as seguintes fatias: 1^a, 2^a, 5^a, 25^a, 50^a, 75^a, 100^a.

O fatiamento ocorreu em temperatura ambiente. Após finalizar cada fatiamento, 10 cm² de área chanfrada da lâmina foi amostrada com o auxílio de um *swab* (Labplas KSS-67310-BPW Sani-Stick, Buffered Peptone Water). Cada *swab* foi colocado em saco plástico estéril e adicionado de 90mL de água peptonada estéril 0,1% (m/m) e homogeneizado por 10 segundos. Uma alíquota de 100µL foi semeada em placa contendo ágar seletivo para *Listeria* Oxford (Merck, Darsmtadt, Alemanha), adicionado de suplemento seletivo para *Listeria* Oxford (Merck, Darsmtadt, Alemanha). As placas foram incubadas a 37°C, por 48 horas, e as colônias típicas foram contadas.

Durante o fatiamento, cada fatia analisada foi coletada separadamente imediatamente após sair da lâmina e acondicionada em um saco plástico estéril transparente. Após, cada fatia foi diluída 1:9 em água peptonada estéril 0,1% (m/m) e homogeneizada em equipamento agitador específico (Stomacher ® 400, Seward,

England) por 2 minutos. Diluições decimais seriadas foram realizadas e alíquotas das diluições foram semeadas em placa contendo meio Oxford (Merck, Darsmtadt, Alemanha) adicionado de suplemento (Merck, Darsmtadt, Alemanha), em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas, e as colônias típicas foram contadas e expressas como log UFC/g. O limite de detecção foi de 100 UFC/g. Quando o aumento da sensibilidade foi necessário, 1000µL da primeira diluição foram colocados em três placas de ágar Oxford + Suplemento (300, 300 e 400µL por placa). Todas as contagens foram realizadas em duplicata e todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5 Avaliação da transferência de *L. monocytogenes* da lâmina contaminada para queijo não contaminado

Para avaliar a transferência de *L. monocytogenes* presente na lâmina do fatiador para o queijo não contaminado, procedeu-se o fatiamento de um queijo ausente de *L. monocytogenes* em uma lâmina contaminada artificialmente, conforme descrito nos itens 4.5.1 e 4.5.2 abaixo.

4.5.1 Contaminação da lâmina

Previamente à contaminação da lâmina, foi realizada a higienização do fatiador, conforme descrito no item 4.3. A contaminação da lâmina foi realizada fatiando-se 100 fatias de um queijo contaminado artificialmente (conforme descrito no item 4.2). O rendimento médio da peça de queijo contaminada artificialmente foi de 100 fatias. Portanto, assumiu-se o fatiamento total da peça de queijo como o pior cenário de contaminação da lâmina

4.5.2 Fatiamento de queijo mussarela não contaminado

Uma peça de queijo mussarela não contaminado (com as mesmas especificações descritas no item 4.2) foi utilizada nesta etapa. Previamente ao fatiamento, uma amostra de 25g deste queijo foi coletada com auxílio de uma faca estéril e acondicionada em um saco plástico estéril transparente. Em seguida, foi realizada a diluição em 1:9 em água peptonada estéril 0,1% (m/m) e homogeneizada em equipamento agitador específico (Stomacher ® 400, Seward, England), por 2 minutos. Diluições decimais seriadas foram realizadas e alíquotas das diluições foram semeadas em placa contendo meio Oxford (Merck, Darsmtadt, Alemanha) adicionado de suplemento (Merck, Darsmtadt, Alemanha), em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas, sendo então verificadas quanto a

presença/ausência de colônias típicas.

Imediatamente após a contaminação da lâmina, uma peça de queijo mussarela não contaminado artificialmente foi fatiada. Neste experimento, toda a peça de queijo foi fatiada (considerado o pior cenário de contaminação). Foram analisadas as seguintes fatias: 1^a, 2^a, 5^a, 25^a, 50^a, 75^a, 100^a.

Cada fatia foi coletada separadamente e acondicionada em saco plástico transparente estéril, diluída 1:9 em água peptonada estéril (w/w) a 0,1% e homogeneizada (Stomacher ® 400, Seward, England), por 2 minutos. Diluições decimais seriadas foram realizadas e alíquotas das amostras foram semeadas em placa contendo meio OXFORD (Merck, Darsmtadt, Alemanha), adicionado de suplemento (Merck, Darsmtadt, Alemanha), em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C, por 48 horas, e as colônias típicas foram contadas e expressas como log UFC/g. O limite de detecção foi de 100 CFU/g. Quando o aumento da sensibilidade foi necessário, 1000 µL da primeira diluição foram colocados em três placas de ágar Oxford + Suplemento (300, 300 e 400 µL por placa). Todas as contagens foram realizadas em duplicata e todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6 Predição do comportamento de *Listeria monocytogenes* em fatias de queijo mussarela durante armazenamento em refrigeração

Fatias de queijo mussarela (100^a) contaminadas conforme item 4.5.2 foram coletadas separadamente, imediatamente após saírem do fatiador, acondicionadas em sacos plásticos transparentes estéreis e submetidas ao armazenamento em refrigeração (BOD SL -200, Solab Científica, Piracicaba, Brasil), em dois cenários diferentes de tempo e temperatura. A determinação dos dois cenários de tempo e temperatura de armazenamento foram definidas após análise das informações de rotulagem de 10 marcas de queijo mussarela comercializadas no varejo, oriundas de estabelecimentos registrados em serviços de inspeção, conforme Tabela 01, abaixo.

Tabela 1: Indicação de rotulagem de tempo e temperatura de armazenamento, após abertura de embalagens, de diversos queijos mussarela coletados em varejo no sul do Brasil.

Marca	Tempo (dias)	Temperatura (°C)
	5	1 - 10
B	não informado	0 - 7
C	8	0 - 10
D	10	1 - 10
E	15	1 - 10
F	igual a validade do produto fechado	4 - 5
G	5	1 - 10
H	15	0 - 10
I	5	1 - 10
J	7	0 - 5

Para realizar a predição do comportamento de *L. monocytogenes* em fatias de queijo mussarela durante armazenamento em refrigeração, foram escolhidos os dois piores cenários de combinação de tempo e temperatura de armazenamento de queijos após abertos, indicados nas rotulagens analisadas: 10°C, por 10 dias e 10°C, por 15 dias.

Após o armazenamento pelo período e temperatura descritos nos dois cenários, as fatias foram analisadas conforme descrito no item 4.5.2. Todas as contagens foram realizadas em duplicata e todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados obtidos através destas análises laboratoriais foram comparados com os resultados obtidos em *software* de microbiologia preditiva (ComBase). Os dados experimentais foram ajustados, usando a ferramenta DMFit do *software* ComBase (browser.combase.cc/DMFit.aspx).

4.7 Análises estatísticas

As médias das contagens de *L. monocytogenes* foram transformadas em log de base 10 e, posteriormente, foram verificadas para diferenças significativas ($p \leq 0,05$), utilizando análise de variância univariada (ANOVA), seguida do teste de Tukey, utilizando o *software online* SAS Studio®.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Transferência de *Listeria monocytogenes* de queijo contaminado artificialmente para a lâmina do fatiador

Os resultados da transferência de *L. monocytogenes* do queijo contaminado artificialmente para a lâmina da fatiadora são mostrados na Tabela 02.

Tabela 2: Média das contagens de *L. monocytogenes* sobre a lâmina do fatiador (log UFC/10cm²), após fatiamento de queijo mussarela contaminado artificialmente.

	<i>L. monocytogenes</i> (log UFC/10cm ²) na lâmina			
	F1	F5	F50	F100
Antes do fatiamento	nd	nd	nd	nd
Depois do fatiamento	2,71 ^c ±0,02	3,22 ^b ±0,18	3,75 ^a ±0,03	3,67 ^a ±0,03

nd: não detectado; Teste de Tukey ≤0,05; F1= fatiando 1 fatia; F5= fatiando 5 fatias; F50= fatiando 50 fatias; F100= fatiando 100 fatias; Letras diferentes indicam diferença significativa.

O objetivo da análise de diferentes fatias foi verificar se esse número influenciaria na transferência do microrganismo. Assim, partindo de uma contaminação inicial de aproximadamente 5 log/fatia (ou convertido para 4 log UFC/cm² da fatia) de *L. monocytogenes* na superfície da peça de queijo mussarela, a contaminação inicial da lâmina foi de aproximadamente 2,71log UFC/10cm², a qual foi aumentando ao longo do fatiamento até tornar-se constante depois de fatiar 50 fatias.

Os resultados demonstraram que as contagens foram maiores entre a primeira e quinta fatia. Entretanto, verifica-se que nos dois últimos cenários (F50 e F100), onde mais fatias foram fatiadas, a transferência deixar e existir, ou seja, não houve diferença significativa (p≥0,05).

Os resultados do presente estudo diferem dos resultados obtidos em estudo semelhante realizado por Chen et al. (2014). No referido estudo, utilizou-se 5mL de um *pool* de *L. monocytogenes* com uma concentração de 5 log UFC/mL para contaminar uma peça de queijo tipo suíço, o que resultou em uma contaminação final de aproximadamente 3log UFC/cm². O queijo suíço foi fatiado, resultando em uma transferência de aproximadamente 1,7log UFC/10cm² para a lâmina, após fatiar 10 fatias. No presente estudo, foi utilizado um nível de

contaminação ligeiramente superior no queijo mussarela (1mL do *pool* de *L. monocytogenes* com concentração de aproximadamente 7 log UFC/mL), resultando em uma contaminação final de aproximadamente 5 log UFC/fatia (ou convertido para 4 log UFC/cm²). Este nível mais alto de contaminação no queijo pode ter gerado maior transferência de *L. monocytogenes* para a lâmina, o que foi demonstrado na Tabela 2. A maior transferência observada no presente experimento pode ser explicada pela maior contaminação inicial do queijo, bem como pelo tipo de queijo utilizado no experimento. O queijo mussarela apresenta menor teor de gordura (23%) do que o queijo suíço (29%). Este perfil físico-químico pode possibilitar maior transferência entre o queijo e a lâmina, durante o fatiamento, conforme já verificado por Vorst et al. (2006) que analisaram diversos produtos cárneos e constataram que aqueles com menor teor de gordura e maior teor de umidade possuíam maior transferência.

Aarnisalo et al. (2007) também realizaram estudo semelhante usando filés de salmão Gravlax, os quais têm maior umidade e menor gordura (umidade 60% e gordura 16,1%) que o queijo mussarela. Os filés foram inoculados com 7,6 log UFC/peça e os resultados mostraram que, após o processamento da primeira fatia contaminada, a transferência de *L. monocytogenes* para a lâmina foi de aproximadamente 3,9 log UFC/10cm². No presente estudo, o queijo inoculado (umidade 48% e gordura 23%) com nível de contaminação semelhante, apresentou menor transferência para a lâmina já na primeira fatia (2,71 log UFC/10cm²).

Um padrão semelhante foi verificado nos resultados das contagens das fatias do queijo contaminado artificialmente, após serem processadas no fatiador, como mostrado na Tabela 3. Nesta etapa, toda a peça de queijo contaminada foi fatiada, resultando em 100 fatias (F100). Desta forma, assumiu-se o processo F100 como o pior cenário (maior contaminação e maior número de fatias) com maior número de fatias processadas, comparando com outras situações com menor número de fatias (F1, F5, F50).

Tabela 3: Contagens médias de *Listeria monocytogenes* em fatias de queijo contaminadas artificialmente durante o processo de fatiamento de 100 fatias (F100).

Fatia	(log UFC/g)
inicial	3,70 ^a ±0,00
1 ^a	3,80 ^a ±0,79
2 ^a	3,83 ^a ±0,36
5 ^a	4,15 ^a ±0,22
25 ^a	3,53 ^a ±0,17
50 ^a	4,23 ^a ±0,15
75 ^a	4,27 ^a ±0,07
100 ^a	4,23 ^a ±0,26

Teste de Tukey $\leq 0,05$; Letras diferentes indicam diferença significativa. Contaminação inicial da fatia: 5log UFC/fatia ou convertido para 3,70log UFC/g.

Após fatiar toda a peça de queijo contaminado artificialmente, foram analisadas as seguintes fatias: 1^a, 2^a, 5^a, 25^a, 50^a, 75^a, 100^a. Considerando que a contaminação inicial de cada fatia foi cerca de 3,70 log UFC/g os resultados indicaram um ligeiro aumento das contagens, ainda que esse aumento não tenha sido significativo ($p \geq 0,05$). Ou seja, o queijo contaminado, ao ser fatiado, além de contaminar a lâmina, pode ter aderido mais células de *L. monocytogenes* proveniente do contato com a lâmina.

Os resultados das Tabelas 2 e 3 são complementares e indicam um padrão de transferência de *L. monocytogenes* para a lâmina. À medida que mais fatias foram processadas, a transferência de células bacterianas tornou-se constante e em quantidades reduzidas. Os resultados do presente estudo são similares aos resultados de Lin et al. (2006) e Vorst et al. (2006), os quais relatam que a gordura depositada na lâmina durante o fatiamento de produtos cárneos pode ajudar *L. monocytogenes* a permanecer no equipamento por mais tempo, propiciando uma transferência contínua de algumas células. É possível que a gordura do queijo fatiado no presente estudo tenha agido da mesma forma, uma vez que houve deposição visível de resíduos gordurosos durante o fatiamento.

Sheen et al. (2010) e Sheen e Hwang (2011) relataram que muitas células bacterianas são mortas ou se tornam inviáveis pela ação da lâmina de corte, devido ao impacto da força de cisalhamento na superfície e pelo aumento da

temperatura produzida instantaneamente, durante a operação de corte. No entanto, esse mecanismo de letalidade não foi claramente elucidado. No presente estudo, acredita-se que esse mecanismo de letalidade tenha sido atenuado pela gordura depositada na lâmina. Esta deposição pode ter envolvido as células de *L. monocytogenes* e atuado como fator protetor contra atrito mecânico, bem como como isolante térmico. Este mecanismo pode ter favorecido um padrão de troca de células de *L. monocytogenes* entre a lâmina e o queijo, tornando a transferência de um nível baixo de células e contínua.

5.2 Transferência de *L. monocytogenes* da lâmina contaminada para o queijo mussarela

Os resultados médios das contagens de *L. monocytogenes* nas fatias analisadas, após a passagem pela lâmina contaminada são mostrados na Tabela 04.

Tabela 4: Resultados médios das contagens de *L. monocytogenes* nas fatias de queijo mussarela não contaminado, após o fatiamento de 100 fatias por lâmina contaminada.

Fatia	(log UFC/g)
1 ^a	2,19 ^{ab} ±0,17
2 ^a	2,66 ^a ±0,05
5 ^a	2,31 ^{ab} ±0,25
25 ^a	2,16 ^{ab} ±0,10
50 ^a	2,00 ^{ab} ±0,03
75 ^a	1,92 ^{abc} ±0,18
100 ^a	1,69 ^{bc} ±0,21

Teste de Tukey $\leq 0,05$; Resultados com letras diferentes indicam diferença significativa; Swab antes de iniciar o fatiamento = lâmina previamente contaminada após fatiar 100 fatias de queijo contaminado artificialmente, conforme os resultados mostrados na Tabela 03, porém expresso em log/cm² (2,68±0,03 log/UFC/cm²); Swab ao final do fatiamento: 1,21±0,30 log/UFC/cm².

Após o fatiamento de todo o queijo não contaminado ocorreu uma diminuição significativa ($p \leq 0,05$) da contagem de *L. monocytogenes* na lâmina contaminada. A contagem inicial da lâmina foi de 2,68±0,03 log UFC/cm², enquanto a contagem da lâmina após o fatiamento de 100 fatias foi de 1,21±0,30 log UFC/cm², resultando em uma diminuição na contaminação da lâmina de aproximadamente 1,47 log UFC/g. Os resultados da Tabela 05 também demonstram que a contaminação das fatias 1^a à 75^a não variou significativamente ($p \geq 0,05$), sendo

semelhante a contaminação inicial da lâmina. O mesmo foi observado nas últimas fatias (75^a e 100^a), que apresentam contaminação semelhante a contaminação final da lâmina. Esses resultados demonstraram que durante o processo de fatiamento de toda peça de queijo mussarela, a transferência de *L. monocytogenes* da lâmina para o queijo foi semelhante ao longo do processo, o que foi ocasionado pela troca de microrganismos entre a lâmina e queijo.

Em estudo realizado por Sheen e Hwang (2008), a contaminação da lâmina foi realizada fatiando presunto com contaminação inicial de 6 log UFC/peça de *L. monocytogenes*, resultando em uma contaminação final da lâmina estimada por modelos matemáticos de aproximadamente 3,65 log UFC/lâmina. A contaminação da lâmina transferida para o presunto fatiado não contaminado foi de 4 log UFC/fatia, na primeira fatia, até 1,5 log UFC/fatia aproximadamente na 110^a fatia. Considerando que nem todas as células de *Listeria* conseguem aderir à lâmina durante o fatiamento do presunto contaminado, foi observado que a transferência do patógeno para a lâmina foi elevada, com base nas contagens de *L. monocytogenes* transferidas para o presunto fatiado não contaminado. A contaminação inicial da lâmina utilizada no presente estudo foi maior (2,68 log UFC/cm² conforme descrito no rodapé da Tabela 04, convertido em 4,87 log UFC/lâmina) do que o estudo de Sheen e Hwang (2008), mas a transferência de *L. monocytogenes* para as fatias de queijo (1^a fatia: 2,19 log UFC/g ou 3,26 log UFC/fatia e 100^a fatia: 1,69 log UFC/g ou 3,11 log UFC/fatia) foi inferior ao observado na fatias de presunto. Mais uma vez, a matriz alimentar do produto fatiado pode ter interferido no padrão de transferência do patógeno durante o fatiamento, visto que o queijo possui mais gordura (23%) do que o presunto (2%), podendo gerar uma camada de gordura na lâmina, a qual mantém a transferência de células bacterianas em um nível menor, em comparação com o fatiamento do presunto. Por outro lado, a alta umidade do presunto pode ter a função de "lavar" a lâmina a cada corte, podendo arrastar mais células de *Listeria* da lâmina para o presunto. Vorst et al. (2006) relataram um baixo nível de transferência de *L. monocytogenes* em salame em comparação com peru ou mortadela, ambos com mais umidade e menos gordura que o salame.

No estudo de Aarnisalo et al. (2007), um filé de salmão Gravlox (umidade: 60%, gordura: 16,1%) foi inoculado com *L. monocytogenes* (inóculo de superfície total do filé de 7,6±0,1log UFC/peça) e fatiado, para a contaminação artificial da lâmina. Um filé de salmão Gravlox não inoculado foi fatiado na lâmina previamente

contaminada. Uma contaminação de $3,0 \pm 1,1$ log UFC/g foi inicialmente transferida para a primeira fatia do filé não inoculado, e a transferência foi de 1,5 log UFC/g, após 39 fatias. Este mesmo estudo concluiu que outras investigações devem incluir o efeito da variabilidade da cepa, composição do produto e fatiadores em grande escala. Comparando os resultados do presente estudo realizado com queijo mussarela (umidade: 48%, gordura: 23%), pode-se sugerir que a composição do produto interferiu na transferência de células bacterianas durante o fatiamento. A transferência da lâmina (contaminada com queijo inoculado com um nível semelhante ao usado no filé de salmão Gravlax, de aproximadamente 7 log UFC/peça) para o queijo não inoculado foi menor desde a primeira fatia (2,19 log UFC/g), e a transferência foi de 1,69 log UFC/g após 100 fatias. Portanto, foi observada uma transferência em menor nível, porém mais prolongada.

5.3 Predição do comportamento de *Listeria monocytogenes* em fatias de queijo mussarela armazenadas sob refrigeração

A partir dos resultados encontrados, houve o interesse em investigar o possível comportamento de *L. monocytogenes* presente em queijos processados durante sua exposição no varejo ou na residência do consumidor, sob temperatura refrigerada. Para isso, foi utilizada a última fatia contaminada artificialmente (100^a), a qual foi armazenada sob refrigeração a 10°C, por 10 e 15 dias. Além disso, também foi utilizado o *software* Combase para prever o comportamento da *Listeria* em caldos contendo os mesmos parâmetros do queijo utilizado no presente experimento, nas mesmas condições de armazenamento mencionadas (dados apresentados na Tabela 5).

Tabela 5: Média das contagens laboratoriais e valores preditos no software Combase da contaminação das fatias de queijo mussarela contaminadas artificialmente com *L. monocytogenes* armazenadas a 10°C, por 10 e 15 dias.

	Contagem (log UFC/g)	ComBase (log UFC/g)
1 dia (contagem inicial)*	$1,39^b \pm 0,09$	$1,39^c$
10 dias	$1,51^{abB} \pm 0,17$	$3,03^{bA}$
15 dias	$1,69^{aB} \pm 0,26$	$4,68^{aA}$

*1 dia (contagem inicial): 100^a fatia contaminada antes do armazenamento; Teste de Tukey $\leq 0,05$; Resultados com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa; Resultados com letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa.

Foi observado que não houve crescimento significativo ($p \geq 0,05$) de *L.*

monocytogenes após 10 dias de armazenamento, mas em 15 dias o crescimento foi significativo ($p \leq 0,05$). Os resultados do Combase demonstram que o crescimento de *L. monocytogenes* foi significativo ($p \leq 0,05$) já em 10 dias de refrigeração, a 10°C. As densidades populacionais máximas de todos os valores previstos no Combase foram muito maiores do que as encontradas nos dados experimentais. Geralmente, os dados do ComBase apresentam taxas de crescimento semelhantes ou superiores às obtidas em matrizes alimentares experimentais, uma vez que esses dados são gerados em estudos que utilizam caldos de meios de cultura, os quais podem promover maior crescimento de microrganismos que matrizes alimentares. Os diferentes resultados obtidos no presente trabalho podem ser explicados pela complexa estrutura do queijo mussarela, o que poderia afetar a distribuição espacial dos nutrientes e dificultar a disponibilidade desses nutrientes para as células bacterianas. Os resultados encontrados por Nyhan et al. (2018) corroboram os resultados do presente estudo, o qual verificou que as taxas de crescimento de *L. monocytogenes* foram maiores no caldo do que nas matrizes alimentares avaliadas, resultando em um modelo preditivo que superestimou o crescimento microbiano em matrizes alimentares ajustadas. Além disso, no presente experimento foi utilizado um *pool* de seis cepas diferentes de *L. monocytogenes* para inocular queijos, enquanto os estudos em ComBase usaram outras cepas de *Listeria*, ou até mesmo uma somente, o que também pode ter contribuído para as diferenças encontradas.

Tirloni et al. (2019) analisaram 33 marcas de queijo mussarela e concluíram que as concentrações de ácido orgânico detectadas em todas as marcas foram insuficientes para inibir o crescimento de *L. monocytogenes*. Esses resultados foram confirmados pela simulação de contaminação pós-produção pelo patógeno. O crescimento muito rápido foi evidente em todas as temperaturas de armazenamento aplicadas (de 4 a 20°C) e não foi inibido pela microbiota presente ou pelas condições ambientais (ácidos orgânicos, pH) presentes na matriz alimentar. Os resultados obtidos no presente experimento diferem parcialmente dos resultados de Tirloni et al. (2019), pois em até 10 dias o crescimento de *L. monocytogenes* não foi significativo ($p \geq 0,05$). No estudo citado foram utilizados 2,92 a 3,06 log UFC/g para simular a contaminação pós-produção por *L. monocytogenes*, o que pode ter favorecido o rápido crescimento observado, simulando alta contaminação após o processamento e abertura das embalagens. Portanto, o presente estudo complementa a conclusão já relatada por Tirloni et al. (2019) de que *L.*

monocytogenes pode ser um risco quando o alimento é processado sem observar as boas práticas de manuseio, podendo resultar em altos níveis de contaminação, associada a vida útil prolongada.

Em outro estudo (KAPETANAKOU *et al.*, 2017a) foi verificado que o queijo mussarela, após inoculação inicial de 2 log UFC/g e armazenado a 7°C, suportou o crescimento de *L. monocytogenes* de 0,5–0,8 log UFC/g ou cm² por dia. Este crescimento foi atribuído ao valor de pH inicial (6,23±0,01) durante o armazenamento. Os resultados encontrados no presente experimento não demonstram um elevado crescimento de *L. monocytogenes* mesmo com uma temperatura de armazenamento mais elevada (10°C), o que pode ser atribuído ao pH mais ácido do queijo utilizado (5,36), retardando o crescimento do patógeno durante o armazenamento. A levedura adicionada durante a produção do queijo mussarela é essencial para dar as suas características finais. Além disso, durante a fermentação, é produzido ácido láctico, que pode reduzir o crescimento de microrganismos indesejáveis e patogênicos, o que pode ter contribuído para o crescimento lento da *L. monocytogenes* durante o período de armazenamento.

Portanto, pode-se concluir que o pH ácido do queijo utilizado no presente experimento e a menor contaminação inicial pode ter sido um fator retardador para o crescimento de *L. monocytogenes* durante o período de armazenamento, após o processo de fatiamento.

Além disso, a contaminação inicial utilizada no presente estudo não está de acordo com a legislação federal (BRASIL, 2019a) nos dois cenários analisados, que estabelece um limite máximo de 10² UFC/25g de *L. monocytogenes* na categoria de alimentos prontos para o consumo. Se for considerado o peso médio de 20g das fatias utilizadas no presente estudo, os valores das contagens laboratoriais mostrados na Tabela 05 convertidos para log UFC/fatia serão: 2,71, 2,84 e 2,99log UFC/fatia. Portanto, considera-se elevada a contaminação inicial gerada pelo processo de fatiamento, uma vez que uma fatia pesa aproximadamente 20g. Considerando o aumento do consumo do queijo mussarela, o risco de contaminação cruzada durante o fatiamento, além de longos períodos de armazenamento, pode-se concluir que poderá haver exposição a um nível inseguro de *L. monocytogenes* nestas condições.

6. CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que o queijo mussarela foi capaz de transferir *L. monocytogenes* para a lâmina do fatiador, demonstrando inicialmente aumento nas contagens. À medida que mais fatias foram processadas, ocorreu uma estabilização deste aumento. Além disso, também houve transferência de *L. monocytogenes* da lâmina do fatiador comercial contaminada para fatias de queijo não contaminado, a qual transmitiu baixas contagens do microrganismo, mas de foram constante até o fatiamento da 100ª fatia.

O estudo demonstrou que *L. monocytogenes* presente em fatia contaminada por fatiador foi capaz de se multiplicar significativamente em 15 dias de armazenamento a 10°C. Tal condição pode representar riscos para os consumidores que adquirem o produto no varejo e realizam o consumo imediato, sem tratamento térmico prévio. Nesta situação, evidencia-se a importância da validação dos prazos de validade e temperaturas seguras durante o armazenamento pós-fatiamento do queijo mussarela no varejo. Além disso, outros métodos de conservação podem ser estudados e propostos, os quais sejam seguros e eficazes no controle de *Listeria monocytogenes* após o processamento.

Há indicação de que o teor de gordura e umidade do queijo mussarela contribuiu para o perfil estável e em baixo nível de transferência de células bacterianas entre o queijo e o fatiador, durante o processo de fatiamento. A correta e constante limpeza do fatiador devem ser reforçadas, principalmente devido à composição do queijo, a qual favorece deposição de gordura na lâmina, visivelmente perceptível no equipamento. Portanto, é importante que a frequência de limpeza seja definida de acordo com volume de processamento do estabelecimento, associada à rigorosa seleção de fornecedores.

7. REFERÊNCIAS

AARNISALO, K. *et al.* Modelling transfer of *Listeria monocytogenes* during slicing of “gravad” salmon. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 118, n. 1, p. 69–78, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.017>

ALLERBERGER, F.; WAGNER, M. **Listeriosis: A resurgent foodborne infection**. [S. l.]: Blackwell Publishing Ltd, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03109.x>. Acesso em: 13 mar. 2021.

ALMEIDA, R. M. de *et al.* Virulence genes and genetic relationship of *L. monocytogenes* isolated from human and food sources in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 282–289, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.01.004>

ALTHAUS, D. *et al.* Local Outbreak of *Listeria monocytogenes* Serotype 4b Sequence Type 6 Due to Contaminated Meat Pâté. **Foodborne Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 219–222, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2232>. Acesso em: 24 jan. 2021.

AMATO, E. *et al.* Identification of a major *Listeria monocytogenes* outbreak clone linked to soft cheese in Northern Italy - 2009-2011. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 1, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2441-6>

ANGELIDIS, A. S.; BOUTSIOUKI, P.; PAPAGEORGIOU, D. K. Loss of viability of *Listeria monocytogenes* in contaminated processed cheese during storage at 4, 12 and 22°C. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 809–818, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.017>. Acesso em: 25 abr. 2021.

ANGELO, K. M. *et al.* Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infections linked to whole apples used in commercially produced, prepackaged caramel apples: United States, 2014-2015. **Epidemiology and Infection**, [s. l.], v. 145, n. 5, p. 848–856, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0950268816003083>. Acesso em: 24 jan. 2021.

ARNOLD, J. W.; BAILEY, G. W. Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: Scanning electron and atomic force microscopy study. **Poultry Science**, [s. l.], v. 79, n. 12, p. 1839–1845, 2000. Available at: <https://doi.org/10.1093/ps/79.12.1839>. Acesso em: 11 maio 2021.

ATANU, J. Mozzarella cheese and pizza - the compatible partners.

Beverage Food World, [s. l.], v. 28, p. 14–19, 2001.

ATKINS, A. G.; XU, X. Slicing of soft flexible solids with industrial applications. **International Journal of Mechanical Sciences**, [s. l.], v. 47, n. 4-5 SPEC. ISS., p. 479–492, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijmecsci.2005.01.013>

BRASIL. **Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017** Brasil: Presidência da República - Casa Civil, 2017. p. 1–77.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 60 de 23 de Dezembro de 2019**. Brazil: [s. n.], 2019a. Available at: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356>. Acesso em: 22 fev. 2021.

BRASIL. **RDC 364 - Aprovar o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Mozzarella (Muzzarella ou Mussarela)**. Brasil: [s. n.], 1997.

BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 331, de 23 de Dezembro 2019**. [S. l.], 2019b. Available at: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-331-de-23-de-dezembro-de-2019-235332272>. Acesso em: 24 jan. 2021.

CABAL, A. *et al.* **Listeriosis outbreak likely due to contaminated liver pâté consumed in a tavern, Austria, December 2018**. [S. l.]: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2019. Available at: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.39.1900274>. Acesso em: 13 mar. 2021.

CARLIN, C. R. *et al.* *Listeria cossartiae* sp. nov., *Listeria immobilis* sp. nov., *Listeria portnoyi* sp. nov. and *Listeria rustica* sp. nov., isolated from agricultural water and natural environments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 71, n. 5, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004795>

CARVALHO, J. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em produtos de carne de peru comercializados na cidade de Niterói-RJ- Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 19–25, 2002. Available at: <https://seer.ufrgs.br/ActaScientiaeVeterinariae/article/view/17179>. Acesso em: 5 mar. 2021.

CDC. **Listeria (Listeriosis) | Listeria | CDC**. [S. l.], 2017. Available at: <https://www.cdc.gov/listeria/index.html>. Acesso em: 24 jan. 2021.

CHEN, D.; ZHAO, T.; DOYLE, M. P. Transfer of foodborne pathogens

during mechanical slicing and their inactivation by levulinic acid-based sanitizer on slicers. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 38, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.10.004>

CHEN, J. Q. *et al.* **Prevalence and methodologies for detection, characterization and subtyping of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii* in foods and environmental sources.** [S. l.]: Elsevier B.V., 2017a. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2017.06.002>

CHEN, Y. *et al.* Assessing the genome level diversity of *Listeria monocytogenes* from contaminated ice cream and environmental samples linked to a listeriosis outbreak in the United States. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 1–19, 2017b. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171389>

CHEN, Y. *et al.* *Listeria monocytogenes* in stone fruits linked to a multistate outbreak: Enumeration of cells and whole-genome sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 82, n. 24, p. 7030–7040, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1128/AEM.01486-16>. Acesso em: 24 jan. 2021.

CHEN, Y. *et al.* Whole genome and core genome multilocus sequence typing and single nucleotide polymorphism analyses of *Listeria monocytogenes* isolates associated with an outbreak linked to cheese, United States, 2013. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 83, n. 15, 2017c. Available at: <https://doi.org/10.1128/AEM.00633-17>. Acesso em: 24 jan. 2021.

COMISSÃO EUROPEIA. Regulamento (CE) N.º 2073/2005 - Relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Europeia**, [s. l.], v. 338, p. 1–26, 2005.

DESTRO, M. T. **Listeria e E.coli não atormentam os brasileiros? - Food Safety Brazil.** [S. l.], 2013. Available at: <https://foodsafetybrazil.org/listeria-e-e-coli-nao-atormentam-aos-brasileiros/>. Acesso em: 14 ago. 2021.

DOUMITH, M. *et al.* Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 42, n. 8, p. 3819–3822, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004>. Acesso em: 7 fev. 2021.

EUROPEAN COMMISSION. **OPINION OF THE SCIENTIFIC COMMITTEE ON VETERINARY MEASURES RELATING TO PUBLIC HEALTH on *Listeria monocytogenes*.** [S. l.]: s. n., 1999. Available at: <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.0965>.

EUROPEIAS, D. A. S. C. L 322/12. [s. l.], n. 7, p. 12–29, 2007.

FDA. Food Code. **US Public health service**, [s. l.], v. 0001, n. 1, p. 237–304, 2017.

FDA. **Quantitative Assessment of Relative Risk to Public Health from Foodborne *Listeria monocytogenes* Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods**. [S. l.: s. n.], 2003. Available at: http://www.persee.fr/web/revues/home/prescript/article/perch_1021-9013_2000_num_57_1_2161.

FERREIRA, V. *et al.* ***Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: Epidemiology, strain characteristics, and implications for public health**. [S. l.: s. n.], 2014. Available at: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-150>

FILIPELLO, V. *et al.* Attribution of *Listeria monocytogenes* human infections to food and animal sources in Northern Italy. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 89, p. 103433, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103433>

FORAUER, E.; WU, S. T.; ETTER, A. J. ***Listeria monocytogenes* in the retail deli environment: A review**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107443>

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2^a edição. Porto Alegre: [s. n.], 2013.

GEA. **Global Pasta Filata Cheese Market Trends**. Bardolino - Italy: [s. n.], 2016.

GELBÍČOVÁ, T. *et al.* An outbreak of listeriosis linked to Turkey meat products in the Czech Republic, 2012-2016. **Epidemiology and Infection**, [s. l.], v. 146, n. 11, p. 1407–1412, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0950268818001565>. Acesso em: 13 mar. 2021.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 4^o edição. [S. l.: s. n.], 2011.

GOMBAS, D. E. *et al.* Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 66, n. 4, p. 559–569, 2003. Available at: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.4.559>

GRECO, S. *et al.* Case of contamination by *Listeria monocytogenes* in mozzarella cheese. **Italian Journal of Food Safety**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 51–58, 2014. Available at: <https://doi.org/10.4081/ijfs.2014.1708>

HEIMAN, K. E. *et al.* Multistate outbreak of listeriosis caused by imported cheese and evidence of cross-contamination of other cheeses, USA, 2012. **Epidemiology and Infection**, [s. l.], v. 144, n. 13, p. 2698–2708, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1017/S095026881500117X>

HERRADOR, Z. *et al.* Listeriosis in Spain based on hospitalisation records, 1997 to 2015: Need for greater awareness. **Eurosurveillance**, [s. l.], v. 24, n. 21, 2019. Available at: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.21.1800271>. Acesso em: 13 mar. 2021.

HOELZER, K. *et al.* Estimation of *Listeria monocytogenes* transfer coefficients and efficacy of bacterial removal through cleaning and sanitation. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 157, n. 2, p. 267–277, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.019>

HOOGWEGT GROEP B.V. HOOGWEGT HORIZONS. [s. l.], v. 12, n. 7, p. 2, 2015.

HUNT, K. *et al.* Challenge Studies to Determine the Ability of Foods to Support the Growth of *Listeria monocytogenes*. [s. l.], 2018. Available at: <https://doi.org/10.3390/pathogens7040080>. Acesso em: 25 abr. 2021.

IBGE. **Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF | IBGE**. [S. l.], 2019. Available at: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao/24786-pesquisa-de-orcamentos-familiares-2.html?edicao=27139&t=resultados>. Acesso em: 24 jan. 2021.

JACKSON, K. A. *et al.* Listeriosis outbreaks associated with soft cheeses, United States, 1998–2014. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 1116–1118, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3201/eid2406.171051>. Acesso em: 13 mar. 2021.

JENSEN, A. K. *et al.* Whole-genome sequencing used to investigate a nationwide outbreak of listeriosis caused by ready-to-eat delicatessen meat, Denmark, 2014. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 64–70, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1093/cid/ciw192>. Acesso em: 5 mar. 2021.

JOHNSEN, B. O. *et al.* A large outbreak of *Listeria monocytogenes* infection with short incubation period in a tertiary care hospital. **Journal of Infection**, [s. l.], v. 61, n. 6, p. 465–470, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.08.007>. Acesso em: 14 mar. 2021.

KAPETANAKOU, A. E. *et al.* Assessing the capacity of growth, survival,

and acid adaptive response of *Listeria monocytogenes* during storage of various cheeses and subsequent simulated gastric digestion. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 246, p. 50–63, 2017a. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.015>

KAPETANAKOU, A. E. *et al.* Assessing the capacity of growth, survival, and acid adaptive response of *Listeria monocytogenes* during storage of various cheeses and subsequent simulated gastric digestion. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 246, p. 50–63, 2017b. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.015>. Acesso em: 25 abr. 2021.

KESKINEN, L. A.; TODD, E. C. D.; RYSER, E. T. Transfer of surface-dried *Listeria monocytogenes* from stainless steel knife blades to roast Turkey breast. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 176–181, 2008. Available at: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.1.176>. Acesso em: 11 maio 2021.

LEONG, W. M. *et al.* Growth of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Staphylococcus aureus* on cheese during extended storage at 25°C. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 77, n. 8, p. 1275–1288, 2014. Available at: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-047>

LI, Z. *et al.* Whole genome sequencing analyses of *Listeria monocytogenes* that persisted in a milkshake machine for a year and caused illnesses in Washington State. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 17, n. 1, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1043-1>. Acesso em: 5 mar. 2021.

LIN, C. M. *et al.* Cross-contamination between processing equipment and deli meats by *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 69, n. 1, 2006. Available at: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.1.71>

LIU, D. **Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen.** [S. l.]: J Med Microbiol, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46495-0>. Acesso em: 7 fev. 2021.

LYYTIKÄINEN, O. *et al.* Surveillance of listeriosis in Finland during 1995–2004. **Eurosurveillance**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 5–6, 2006. Available at: <https://doi.org/10.2807/esm.11.06.00630-en>. Acesso em: 5 mar. 2021.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock.** 14^aed. Porto Alegre: [s. n.], 2016.

MAFU, A. A. *et al.* Characterization of physicochemical forces involved in

adhesion of *Listeria monocytogenes* to surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 57, n. 7, p. 1969–1973, 1991. Available at: <https://doi.org/10.1128/aem.57.7.1969-1973.1991>. Acesso em: 11 maio 2021.

MARTINEZ-RIOS, V.; DALGAARD, P. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in European cheeses: A systematic review and meta-analysis. **Food Control**, [s. l.], v. 84, p. 205–214, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.020>

MARTINS, E. A.; LEAL GERMANO, P. M. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of São Paulo, Brazil: Occurrence, quantification, and serotyping. **Food Control**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 297–302, 2011a. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.07.026>

MARTINS, E. A.; LEAL GERMANO, P. M. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of São Paulo, Brazil: Occurrence, quantification, and serotyping. **Food Control**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 297–302, 2011b. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.07.026>

MIKKELSEN, P. **World cheese market 2000-2020Pm Food & Dairy Consulting**. [S. l.: s. n.], 2014. Available at: <http://pmfood.dk/upl/9735/WCMINFORMATION.pdf>. Acesso em: 24 jan. 2021.

NYHAN, L. *et al.* Predicting the combinatorial effects of water activity, pH and organic acids on *Listeria* growth in media and complex food matrices. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 74, p. 75–85, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.002>

PM FOOD & DAIRY CONSULTING. **World cheese market 2000-2020**. [S. l.: s. n.], 2014. Available at: <http://pmfood.dk/upl/9735/WCMINFORMATION.pdf>.

POUILLOT, R. *et al.* *Listeria monocytogenes* Dose Response Revisited-Incorporating Adjustments for Variability in Strain Virulence and Host Susceptibility. **Risk Analysis**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 90–108, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1111/risa.12235>. Acesso em: 21 fev. 2021.

PRADHAN, A. K. *et al.* Comparison of public health impact of *Listeria monocytogenes* product-to-product and environment-to-product contamination of deli meats at retail. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 74, n. 11, p. 1860–1868, 2011. Available at: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-351>. Acesso em: 5 mar. 2021.

RASFF. **Rapid Alert System for Food and Feed Portal**. [S. l.], 2021.

Available at: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/>. Acesso em: 24 fev. 2021.

SCHJØRRING, S. *et al.* Cross-border outbreak of listeriosis caused by cold-smoked salmon, revealed by integrated surveillance and whole genome sequencing (WGS), Denmark and France, 2015 to 2017. **Eurosurveillance**, [s. l.], v. 22, n. 50, 2017. Available at: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.50.17-00762>. Acesso em: 24 jan. 2021.

SES - RS. **Portaria SES Nº 749/2019- Regulamento técnico para as boas práticas na comercialização de produtos de origem animal em açougues e fiambrias**. Brasil: [s. n.], 2019.

SHEEN, S. Modeling surface transfer of *Listeria monocytogenes* on salami during slicing. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 73, n. 6, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00833.x>

SHEEN, Shiohshuh; COSTA, S.; COOKE, P. Impact of Mechanical Shear on the Survival of *Listeria monocytogenes* on Surfaces. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 75, n. 6, p. E387–E393, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01692.x>. Acesso em: 18 abr. 2021.

SHEEN, Shiohshuh; HWANG, C. A. Mathematical modeling the cross-contamination of *Escherichia coli* O157:H7 on the surface of ready-to-eat meat product while slicing. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 37–43, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.07.016>

SHEEN, Shiohshuh; HWANG, C.-A. Modeling the Surface Cross-Contamination of *Salmonella* spp. on Ready-to-Eat Meat via Slicing Operation. **Food and Nutrition Sciences**, [s. l.], v. 02, n. 09, p. 916–924, 2011. Available at: <https://doi.org/10.4236/fns.2011.29125>. Acesso em: 18 abr. 2021.

SHEEN, Shiohshuh; HWANG, C. A. Modeling transfer of *Listeria monocytogenes* from slicer to deli meat during mechanical slicing. **Foodborne Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 135–146, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1089/fpd.2007.0049>

SIRSAT, S. A. *et al.* Tracking microbial contamination in retail environments using fluorescent powder - A retail delicatessen environment example. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], n. 85, p. 1–5, 2014. Available at: <https://doi.org/10.3791/51402>

TEIXEIRA, F. B. dos R.; ALVES, V. F.; MARTINIS, E. C. P. de. Growth,

viability and architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 587–591, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.004>. Acesso em: 13 mar. 2021.

TIFFANY VICARIO. *Listeria monocytogenes: Incidence, Growth Behavior and Control*. [S. l.: s. n.], 2015. *E-book*.

TIRLONI, E. *et al.* Potential growth of *Listeria monocytogenes* in Italian mozzarella cheese as affected by microbiological and chemical-physical environment. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 102, n. 6, p. 4913–4924, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15991>

TONDO, E. C.; BARTZ, S. **Microbiologia e Sistemas de Gestão da Segurança de Alimentos**. 2^o edição. Porto Alegre: [s. n.], 2019.

USDA. **USDA ERS - Dairy Data**. [S. l.], 2020. Available at: <https://www.ers.usda.gov/data-products/dairy-data/>. Acesso em: 24 jan. 2021.

VORST, K. L.; TODD, E. C. D.; RYSER, E. T. Transfer of *Listeria monocytogenes* during slicing of turkey breast, bologna, and salami with simulated kitchen knives. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 69, n. 12, p. 2939–2946, 2006. Available at: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.12.2939>

WHO | LISTERIOSIS– SPAIN. [S. l.], 2019. Available at: <https://www.who.int/csr/don/16-september-2019-listeriosis-spain/en/>. Acesso em: 13 mar. 2021.

WHO | LISTERIOSIS – SOUTH AFRICA. [S. l.], 2018. Available at: <https://www.who.int/csr/don/02-may-2018-listeriosis-south-africa/en/>. Acesso em: 13 mar. 2021.