UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DRUCILA CRISTINA FACTOR CARANDINA

Avaliação de biofilmes formados por isolados de *Listeria monocytogenes* provenientes de laticínios e perfil de resistência a agentes sanitizantes

Pirassununga

2013

DRUCILA CRISTINA FACTOR CARANDINA

Avaliação de biofilmes formados por isolados de *Listeria monocytogenes* provenientes de laticínios e perfil de resistência a agentes sanitizantes

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

Pirassununga

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

C261a	<p>Carandina, Drucila Cristina Factor</p> <p>Avaliação de biofilmes formados por isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> provenientes de laticínios e perfil de resistência a agentes sanitizantes / Drucila Cristina Factor Carandina. -- Pirassununga, 2013. 64 f.</p> <p>Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Alimentos.</p> <p>Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira.</p> <p>1. <i>L. monocytogenes</i> 2. Biofilme 3. Sanitizantes 4. CIM. I. Título.</p>
-------	--

A minha família, em especial aos meus pais, Luiza e Noélei.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus por iluminar meu caminho e guiar meus passos.

Ao Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira pela orientação e oportunidade.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Campus Pirassununga - USP pela oportunidade oferecida para realização deste trabalho.

À toda minha família, principalmente aos meus pais Noelei e Luiza e aos meus irmãos Marcelo e Rafael.

À Sarah, pela ajuda no ingresso no mestrado na FZEA/USP, pela ajuda em várias etapas deste trabalho e sua imensa disponibilidade em ajudar quando precisei.

A todas minhas colegas de Pós-Graduação do Laboratório de Microbiologia e Micotoxina de Alimentos – LMMA/FZEA/USP, Alessandra, Diane, Fernanda, Keliane, Lígia, Mayra, Susane.

À Pollyana, pela amizade mais do que sincera e disponibilidade em ajudar.

Ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos da FZEA/USP, especialmente ao Rodrigo, pela atenção e disponibilidade do microscópio eletrônico de varredura (MEV).

Ao meu colega Juliano, pela ajuda na execução da estatística deste trabalho.

À Roice, técnica de laboratório, pela amizade e disponibilidade em ajudar.

Ao Professor Carlos Corassin, sempre prestativo.

À CAPES pelo apoio financeiro incentivando este trabalho.

Aos demais colegas que não foram citados, mas que merecem igual respeito e agradecimento.

E todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização do trabalho.

Muito Obrigada!

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

Carandina, D. C. F. **Avaliação de biofilmes formados por isolados de *Listeria monocytogenes* provenientes de laticínios e perfil de resistência a agentes sanitizantes.** 2013. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade de isolados de *Listeria monocytogenes* em formar biofilmes em superfícies inertes, bem como sua resistência a agentes sanitizantes. Foram utilizados 37 isolados provenientes de ambiente de laticínios, amostras de queijos e salmoura, pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia e Micotoxilogia de Alimentos (LMMA) do Departamento de Engenharia de Alimentos da FZEA/USP. Dos 37 isolados avaliados, 67,6% eram pertencentes ao sorotipo 4b. Três isolados de *L. monocytogenes* foram obtidos de salmoura, 5 foram obtidos de caixas plásticas, 1 de queijo Prato, 1 da mão de manipulador de embalagens, e 27 foram isolados de superfícies sem contato com alimentos (piso da sala de pasteurização, piso da câmara fria, ralo da câmara fria ou estrado da câmara fria). Os isolados de *L. monocytogenes* apresentaram maior capacidade de produzir biofilme nos ensaios com cupons de aço inox (43,2% dos isolados), seguido dos ensaios em microplaca de poliestireno (16,2%), cupons de borracha (13,5%) e discos de silicone (2,7%). As células de *L. monocytogenes* aderidas nas superfícies do aço inox foram visualizadas sob microscopia eletrônica de varredura após 48 horas de incubação a 37°C. Dezenove isolados de *L. monocytogenes*, os quais produziram biofilmes nos ensaios com aço inox, borracha ou silicone, foram testados para determinação da eficiência de sanitizantes pelo método de concentração inibitória mínima (CIM), utilizando-se ácido peracético (2%), cloreto de benzalcônio (1%), digluconato de clorexidina (2%), hipoclorito de sódio (2%) e tintura de iodo (2%). Os isolados de *L. monocytogenes* analisados apresentaram resistência a ácido peracético, hipoclorito de sódio e tintura de iodo, cujos valores de CIM foram 3,12%, 6,25% e 6,25%, respectivamente. Nenhum isolado apresentou resistência a cloreto de benzalcônio e digluconato de clorexidina, os quais foram eficientes para inibição de isolados de *L. monocytogenes* provenientes de amostras de queijos e ambientes de laticínios. A *L. monocytogenes* apresenta capacidade de persistir em ambiente de laticínios sob a forma de biofilme em várias superfícies inertes como aço inox, borracha e silicone, o que pode representar uma fonte permanente de contaminação para produtos e processos de obtenção de leite e derivados.

Palavras chave: *L. monocytogenes*, biofilme, sanitizantes, CIM.

ABSTRACT

Carandina, D. C. F. **Evaluation of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* isolated from dairy plants and resistance to sanitizing agents.** 64 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

The objective of the present study was to evaluate the ability of isolates of *Listeria monocytogenes* to form biofilms and their resistance to sanitizers. Thirty seven strains belonging to the collection of the Laboratory of Microbiology and Food Mycotoxicology (LMMA), Department of Food Engineering of FZEA / USP, were used. Of the 37 isolates, 67.6% belonged to serotype 4b. Three isolates of *L. monocytogenes* were obtained from brine, 5 were obtained from plastic boxes, one of Prato cheese, one from the packaging handler's hand, and 27 were isolated from non-food contact surfaces (pasteurization room floor, the floor of the cold room, the drain cold or pallet from the cold chamber). The isolates of *L. monocytogenes* showed greater ability to produce biofilm in the assays with stainless steel coupons (43.2% of isolates), followed by polystyrene micro plate (16.2%), rubber coupons (13.5%) and silicone disks (2.7%) assays. Cells of *L. monocytogenes* attached to stainless steel surfaces were viewed under scanning electron microscopy after 48 hours incubation at 37°C. Nineteen strains of *L. monocytogenes*, which were considered biofilms producers in the assays with stainless steel, rubber or silicone, have been tested to evaluate the efficiency of the sanitizing method by means of the minimum inhibitory concentration (MIC), using peracetic acid (2%), sodium chloride benzalkonium (1%), chlorhexidine digluconate (2%), sodium hypochlorite (2%) and iodine solution (2%). The isolates of *L. monocytogenes* analyzed showed resistance to peracetic acid, sodium hypochlorite and iodine tincture, with MIC values of 3.12%, 6.25% and 6.25%, respectively. No isolate showed resistance to benzalkonium chloride and chlorhexidine digluconate, which were effective for inhibiting the isolates of *L. monocytogenes* from samples of cheeses and dairy environments. In conclusion, *L. monocytogenes* has the ability to persist in the environment of dairy products by forming biofilms in several inert surfaces such as stainless steel, rubber and silicone, which may represent a continuing source of contamination to manufacture processes of dairy products

Keywords: *L. monocytogenes*, biofilm, sanitizers, MIC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática das etapas de formação do biofilme e fotomicrografias que exemplificam as etapas de adesão inicial (a e b), proliferação (c), maturação (d) e biofilme maduro (e).....	15
Figura 2 - Placa de Petri contendo exemplo típico de colônias típicas de <i>L. monocytogenes</i> no meio Oxford.....	24
Figura 3 – Esquema do método de diluição em caldo – Série composta por doze tubos.....	25
Figura 4 - Fluxograma da metodologia experimental para o estudo de biofilmes por isolados de <i>Listeria monocytogenes</i>	27
Figura 5 - Ilustração de microplaca de fundo chato com o biofilme formado pelos isolados, visualizados após coloração pelo corante violeta cristal (1%).	31
Figura 6 - Fotomicrografias do cupom de aço inox sob microscopia de epifluorescência. A) Controle positivo contendo biofilme formado por <i>S. epidermidis</i> ATCC 35983. B) Controle negativo para crescimento de biofilme. C) Células de <i>L. monocytogenes</i> aderidas no cupom de aço inox. A) ,B) e C) Aumento: 20X.....	34
Figura 7 - Células de <i>L. monocytogenes</i> aderidas sobre a superfície do aço inoxidável (A e B) após 48 horas de incubação. (C) mostra a formação de biofilme por <i>L. monocytogenes</i> após 72 horas de incubação a 35° C. Aumento: A) 2.500x, B) 5.000x, C) 4.000x	39
Figura 8 – Séries de 12 tubos contendo caldo BHI com diferentes graus de turvação em função da multiplicação bacteriana e resistência aos agentes sanitizantes. A) Ácido peracético 2%; B) Hipoclorito de sódio 2%; C) Tintura de iodo 2%.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diluição e conteúdo dos tubos de ensaio para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	26
Tabela 2 - Características dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> utilizados no estudo.	30
Tabela 3 - Densidade óptica (DO) obtida nos ensaios de biofilmes dos 37 isolados de <i>L. monocytogenes</i> em placa de poliestireno, classificados de acordo com a capacidade de formação de biofilme.....	33
Tabela 4 - Isolados de <i>L. monocytogenes</i> positivos nos ensaios de produção de biofilme em aço inox nos pontos de isolamento e sorotipos.....	36
Tabela 5 - Isolados de <i>L. monocytogenes</i> positivos nos ensaios de produção de biofilme em borracha nos pontos de isolamento e sorotipos.	36
Tabela 6 - Número e percentual de isolados de <i>L. monocytogenes</i> formadores e não formadores de biofilme em placas de poliestireno, aço inox, borracha e silicone	37
Tabela 7 - Isolados de <i>L. monocytogenes</i> produtores de biofilmes em mais de um ensaio (microplaca, aço inox e borracha).	37
Tabela 8 – Resultado do teste do sanitizante ácido peracético (2%) testado em isolados de <i>L.monocytogenes</i> em série de doze tubos.....	41
Tabela 9 – Resultado do teste do sanitizante cloreto de benzalcônio (1%) testado em isolados de <i>L.monocytogenes</i> em série de doze tubos.	42
Tabela 10 – Resultado do teste do sanitizante digluconato de clorexidina (2%) testado em isolados de <i>L.monocytogenes</i> em série de doze tubos.....	43
Tabela 11 – Resultado do teste do sanitizante hipoclorito de sódio (2%) testado em isolados de <i>L.monocytogenes</i> em série de doze tubos.	44
Tabela 12 – Resultado do teste do sanitizante tintura de iodo (2%) testado em isolados de <i>L.monocytogenes</i> em série de doze tubos.....	45
Tabela 13 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos sanitizantes avaliados para isolados de <i>L. monocytogenes</i>	46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	13
2.2 LISTERIOSE	14
2.3 FORMAÇÃO DE BIOFILME POR <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	15
2.4 RESISTÊNCIA DE BIOFILMES A SANITIZANTES	17
2.5 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO	18
2.6 MICROSCOPIA PARA VISUALIZAÇÃO DE BIOFILME	19
3 OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GERAL:	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 ORIGEM DOS ISOLADOS:	22
4.2 ENSAIOS DE PRODUÇÃO DE BIOFILME POR <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> :.....	22
4.2.1 Microplaca de poliestireno	22
4.2.2 Microscopia de epifluorescência	23
4.2.3 Avaliação da formação de biofilme por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	24
4.3 PERFIL DE RESISTÊNCIA A SANITIZANTES POR DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	24
4.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>L. MONOCYTOGENES</i>	29
5.2 PRODUÇÃO DE BIOFILMES DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> EM MICROPLACA E SUPERFÍCIE DE AÇO INOX, SILICONE E BORRACHA	31
5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	38
5.4 PERFIL DE RESISTÊNCIA A SANITIZANTES POR DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) ATRAVÉS DA TÉCNICA DE DILUIÇÃO EM TUBOS	40
6 CONCLUSÕES	48
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1 INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é um bastonete Gram-positivo pequeno, anaeróbio facultativo, móvel, não esporulado, capaz de sobreviver em uma ampla faixa de temperatura (0 a 45 ° C) e pH (4,5 a 9,0), elevada concentração de sal (10%), além de baixos valores de atividade de água (a_w) (0,92) (RYSER; MARTH, 2007). *L. monocytogenes* é encontrada em inúmeros ambientes, incluindo solo, água, esgoto, vegetação, fezes de animais selvagens, bem como em fazenda e em instalações de processamento de alimentos (SAUDERS; WIEDMANN, 2007; TODD, NOTERMANS, 2011). A pasteurização do leite cru destrói *L. monocytogenes*, porém, em laticínios, há riscos de contaminação de produtos lácteos após o tratamento térmico (ROSSI et al., 2008). A presença de *L. monocytogenes* em queijos é preocupante, pois os mesmos são usualmente armazenados por longos períodos sob refrigeração, o que pode permitir a multiplicação da bactéria, além do fato de serem consumidos sem aquecimento prévio (BARANCELLI, 2010). *L. monocytogenes* é o causador da listeriose humana e animal. Inicialmente, a listeriose era tratada como uma doença de animais, e somente na década de 1980 a *L. monocytogenes* foi reconhecida como patógeno de origem alimentar para humanos (LOW; DONACHIE, 1997). *L. monocytogenes* é considerada um patógeno oportunista (RANGON et al., 2008), apesar de haver registros de casos em pessoas imunocompetentes (HOFER; NASCIMENTO; OLIVEIRA, 1998).

O biofilme é um tipo de organização extremamente vantajoso a todas as espécies de microrganismos, por fornecer proteção contra adversidades como desidratação, colonização por bacteriófagos além de favorecer resistência a antimicrobianos (GILBERT et al., 2003). A habilidade da *L. monocytogenes* em aderir a superfícies e formar biofilmes foi demonstrada em inúmeros estudos (BLACKMAN; FRANK, 1996; SMOOT; PIERSON, 1998; BERESFORD et al., 2001; SOMERS; WONG, 2004; PALMER et al., 2007; ADRIAO et al., 2008; RIEU et al., 2008; TAKAHASHI et al., 2010).

Em média os sanitizantes reduzem 2 a 4 log UFC/cm² de *Listeria monocytogenes* em biofilme apesar da remoção do biofilme depender de fatores como o estágio do biofilme, da superfície em que o biofilme está aderido e o substrato (NORWOOD; GILMOUR, 2000; PAN; BREIDT; KATHARIOU, 2006; YANG et al., 2009). Levy (2001) afirma que a resistência pode ser considerada um fenômeno ecológico que ocorre como resposta da bactéria frente ao amplo uso de antibióticos e sua presença no meio ambiente. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite a visualização de substâncias poliméricas extracelulares e das bacterianas fixadas, permitindo o estudo estrutural de biofilmes que são

formados em superfícies de aço inoxidável, alumínio, vidro, borracha, teflon e nylon (HERALD e ZOTTOLA, 1988a; HERALD e ZOTTOLA, 1988b; NOTERMANS et al., 1991; ZOTTOLA, 1991; LINDSAY e Von HOLY, 1997).

Tendo em vista o exposto, delineou-se o presente estudo com o objetivo de avaliar a capacidade de isolados de *L. monocytogenes*, provenientes do ambiente de laticínios, em formar biofilmes e caracterizá-los por MEV, bem como sua resistência a agentes sanitizantes comumente utilizados em indústrias de alimentos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é um bastonete Gram-positivo pequeno, anaeróbio facultativo, móvel, não esporulado. A bactéria é capaz de sobreviver em uma ampla faixa de temperatura (a partir de 0 a 45 ° C) e pH (4,5 a 9,0), elevada concentração de sal (10%) e baixos valores de atividade de água (aw) (0,92) (RYSER; MARTH, 2007).

L. monocytogenes é encontrada em vários ambientes, incluindo solo, água, esgoto, vegetação, fezes de animais selvagens, bem como em a fazenda e em instalações de processamento de alimentos (SAUDERS; WIEDMANN, 2007; TODD, NOTERMANS, 2011). Uma vez introduzida em plantas de processamento, a bactéria é capaz de sobreviver por longos períodos de tempo sob condições ambientais adversas, persistindo em locais como drenos, paredes, tetos, tanques de armazenamento, mãos de manipuladores, caminhões e correias transportadoras, nos quais podem-se acumular resíduos de alimentos (GANDHI; CHIKINDAS, 2007; POIMENIDOU et al., 2009; TODD, NOTERMANS, 2011).

Produtos lácteos são frequentemente envolvidos na transmissão de *L. monocytogenes*, pois, além de ricos em nutrientes há diversas possibilidades de contaminação ao longo da cadeia leiteira (BARANCELLI, 2010). A contaminação do leite cru por *L. monocytogenes* pode ser proveniente de fontes ambientais como durante a ordenha (MEYER-BROSETA et al., 2003). O leite cru pode ser uma fonte de introdução de *L. monocytogenes* na indústria (WAAK; THAM; DANIELSSON-THAM, 2002), nas solas de calçados (KOZAK et al., 1996), vestuário e, possivelmente, portadores humanos saudáveis (WAGNER et al., 2006) podem também ser fontes. A presença de *Listeria* no solo e em instalações de laticínios é provavelmente a causa mais frequente da contaminação de queijos (MENENDEZ et al., 1997). A pasteurização do leite cru destrói *L. monocytogenes*, porém não elimina o risco de contaminação de produtos lácteos após o tratamento térmico (ROSSI et al., 2008). A presença de *L. monocytogenes* em queijos é preocupante, pois os mesmos são usualmente armazenados por longos períodos sob refrigeração, o que pode permitir a multiplicação da bactéria, além do fato de serem consumidos sem aquecimento prévio (BARANCELLI, 2010).

Apenas as espécies *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são consideradas patogênicas para o ser humano (LIU, 2008), dentre as seis espécies pertencentes ao gênero *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* e *L. grayi*). Entretanto, as outras espécies são importantes por apresentarem ecologia semelhante ao patógeno, podendo

ser consideradas indicadoras da presença do mesmo (VITAS, AGUADO; GARCIA-JALON 2004). Para investigações epidemiológicas a sorotipagem é de grande utilidade (BUCHOLZ; MASCOLA, 2001), já que mais de 95% dos surtos e casos esporádicos de listeriose que ocorrem no mundo são causados por cepas de três sorotipos: 4b, 1/2a e 1/2b (JACQUET et al., 2002; JESÚS; WHITING, 2003; LIANOU et al., 2006).

2.2 Listeriose

A *Listeria monocytogenes* é o agente etiológico da listeriose humana e animal. Inicialmente a listeriose era tratada como uma doença de animais, e somente na década de 80 a *L. monocytogenes* foi reconhecida como patógeno de origem alimentar para humanos (LOW; DONACHIE, 1997). A forma invasiva da listeriose humana é uma doença que afeta predominantemente pessoas do grupo de risco para a doença como pessoas imunocomprometidas, idosos, recém-nascidos e mulheres grávidas (LUNDÉN; TOLVANEN; KORKEALA, 2004). É caracterizada por septicemia e/ou meningite em não grávidas, perda fetal, parto prematuro e septicemia ou meningite neonatal. Em casos associados com gravidez possui altas taxas de letalidade (20 -30%) (DATTA, 2003; WAGNER, 2006, GASCHIGNARD et al., 2011; LAMONT et al., 2011). *L. monocytogenes* é considerada um patógeno oportunista (RANGON et al., 2008) apesar de haver registros de casos em pessoas imunocompetentes (HOFER; NASCIMENTO; OLIVEIRA, 1998).

Existem relatos de surtos de gastroenterite febril causados por *L. monocytogenes* (AURELI et al., 2000; CARRIQUE-MAS et al, 2003), trata-se de uma listeriose não invasiva, com sintomas não específicos e, por isso subdiagnosticada (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007). No país não existe notificação obrigatória para casos de listeriose, no entanto, de acordo com a Portaria n° 2.472, de 31 de agosto de 2010 (SVS/MS), todo surto de DTA deve ser notificado às autoridades locais de saúde e investigado mediatamente. A dose infectante (DI) de *L. monocytogenes* para humanos não está estabelecida. Apesar do não estabelecimento do valor de DI para *L. monocytogenes*, considera-se o critério de “ausência em 25 ou 50g” adequado como limite de tolerância para o microrganismo em alimentos (FAO/WHO, 2004).

2.3 Formação de biofilme por *Listeria monocytogenes*

Os biofilmes são comumente definidos como comunidades de micro-organismos ligados a uma superfície que produz uma matriz extracelular na qual estes micro-organismos estão incorporados (BREMER; MONK; OSBORNE, 2001; STOODLEY et al., 2002). O desenvolvimento do biofilme começa com a aderência inicial (reversível e posteriormente irreversível) a uma superfície, com a ativação de genes envolvidos na expressão da proteína de aderência, de superfície e de produção de exopolissacarídeo (EPS) (NGUYEN et al., 2012). O biofilme é um tipo de organização extremamente vantajoso a todas as espécies de micro-organismos, por fornecer proteção contra adversidades como desidratação, colonização por bacteriófagos e favorecer resistência a antimicrobianos (GILBERT et al., 2003). O desenvolvimento de microcolônias pequenas em biofilmes maduros é tipicamente controlado por *quorum sensing* (RIEU et al., 2007; GARMYN et al., 2009; RIEDEL et al., 2009). Conforme apresentado na Figura 1.

Nature Reviews | Drug Discovery

Figura 1- Representação esquemática das etapas de formação do biofilme e fotomicrografias que exemplificam as etapas de adesão inicial (a e b), proliferação (c), maturação (d) e biofilme maduro (e) (adaptada de DAVIES, 2003).

Na indústria alimentícia, biofilmes bacterianos são considerados um problema principalmente em áreas de processamento de produtos frescos e lácteos, além de processamento de aves e carnes vermelhas (CHEN; ROSSMAN; PAWAR, 2007). Biofilmes patogênicos têm sido de considerável interesse no contexto da segurança alimentar por muitos grupos de pesquisa (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994; SHI; ZHU, 2009). A produção de biofilme pode aumentar a resistência dos microrganismos aos antimicrobianos (SIMÕES; VIEIRA, 2010). Quando células estão em biofilme, elas podem ser de 10 - 1.000 vezes mais resistentes aos efeitos de agentes antimicrobianos químicos, como os desinfetantes utilizados por indústrias processadoras de alimentos (BERESFORD et al., 2001; MAH; O'TOOLE, 2001; CABEÇA, 2006). A formação de biofilme é um importante fator de virulência (HENSEN et al., 2000; ALMEIDA; OLIVER, 2001), pois bactérias envoltas de biofilmes são difíceis de serem eliminadas comparadas em forma planctônica (MOSTELLER; BISHOP, 2003). Uma vez estabelecido o biofilme, este pode desencadear a colonização de superfícies de equipamentos e utensílios (UHITIL et al., 2004). A habilidade da *L. monocytogenes* em aderir a superfícies e formar biofilmes foi demonstrada em inúmeros estudos (BLACKMAN; FRANK, 1996; SMOOT; PIERSON, 1998; BERESFORD et al., 2001; SOMERS; WONG, 2004; PALMER et al., 2007; ADRIÃO et al., 2008; RIEU et al., 2008; TAKAHASHI et al., 2010).

Biofilmes formados por bactérias são altamente resistentes a desinfetantes e são, portanto, difícil de erradicar, o que representa um desafio para as indústrias de processamento de alimentos e departamento alimentar (OUYANG et al., 2012). A aderência de bactérias patogênicas em superfícies que entram em contato com alimentos e a subsequente formação de biofilme são indesejáveis uma vez que o desprendimento de bactérias a partir do biofilme pode levar a contaminação cruzada de alimentos e causar doenças de origem alimentar (BROOKS; FLINT, 2008)

A limpeza das superfícies é o primeiro e mais importante passo da sanitização de equipamentos (FORSYTHE; HAYES, 1998). A mesma é importante para eliminar os detritos de alimentos e outros resíduos que podem eventualmente conter microrganismos ou contribuir para o crescimento dos mesmos (SIMÕES et al., 2010). Superfícies como aço inox, vidro, borracha e polipropileno podem ser contaminados por microrganismos patogênicos, os quais podem se aderir, posteriormente se multiplicar e formar biofilme (POMPERMAYVER; GAYLARDE, 2000; ZACHEUS et al., 2000; RAY, 2004). Superfícies que mantêm contato com produtos alimentícios devem ser limpos várias vezes ao dia, já superfícies ambientais como paredes podem ser limpos somente uma vez por semana (GIBSON et al., 1999).

Limpeza e sanitização podem ser efetivas em reduzir a contaminação bacteriana no ambiente e, portanto, há baixa contaminação em alimentos, mas a eficiência dos sanitizantes em diminuir a contaminação por *L. monocytogenes* depende de fatores intrínsecos como o tipo do patógeno, temperatura ambiente, dureza da água, superfície de contato ou presença de proteínas residuais. (MARRIOTT; GRAVANI, 2006; NEW YORK STATE DEPARTMENT OF AGRICULTURE AND MARKETS, 2011). O desprendimento de células bacterianas do biofilme é de fundamental importância para a disseminação e colonização em outros locais (LAZZAROTTO, 2010). Biofilmes microbianos formados em equipamentos e instalações de indústrias alimentícias podem desprender-se e contaminar o alimento presente na superfície ou colonizar e iniciar um novo biofilme, proporcionando uma nova fonte de contaminação (NORWOOD; GILMOUR, 1999).

2.4 Resistência de biofilmes a sanitizantes

Biofilmes permitem transferência de substâncias químicas entre as células e o ambiente externo e proporciona proteção para os microrganismos nos mesmo em condições ambientais potencialmente prejudiciais, como por exemplo, desinfetantes (PAN et al., 2006). Trata-se de um problema para as indústrias de alimentos pelas particularidades de equipamentos e operações o que pode significar em doses de desinfecção inferiores a ótima em locais de difícil acesso (NILSSON; ROSS; BOWMAN, 2011). Além disso, a exposição a doses não letais de desinfecção pode aumentar resistência do organismo a seguinte, de outro modo letal, desinfetante. As concentrações e resistência stress têm sido associadas com virulência certas estirpes de *L. monocytogenes* (GRAY et al, 2006.; KALLIPOLITIS; INGMER, 2006; PAN et al., 2006.; VAN der VEEN et al., 2010).

O controle de biofilme em laticínios geralmente envolve o processo *clean-in-place* (CIP). Esse processo de limpeza é caracterizado pela limpeza completa de itens da planta processadora ou de tubulações sem a necessidade de desmonta ou abertura dos equipamentos com o envolvimento mínimo de operadores humanos (BREMER et al., 2006). Tradicionalmente sanitizantes a base de cloro (hipoclorito de sódio) são utilizados, mas existe uma série de sanitizantes que incluem os compostos de quaternário de amônio, ácidos aniônicos, compostos de iodo e à base de cloro que são utilizados em sistemas CIP (JOSEPH et al., 2001; PARKAR et al., 2004; BREMER et al., 2006).

Cloro, compostos de quaternário de amônio, peróxido de hidrogênio, água alcalina e eletrizada e hipoclorito de sódio são alguma dos compostos químicos utilizados para

sanitização em plantas processadoras de alimentos em geral. (NORWOOD; GILMOUR, 2000; PAN et al., 2006). Grinsteas (2009) afirma que nos Estados Unidos os agentes químicos mais utilizados para sanitização são ácido hipocloroso, cloro, iodeto, ozônio, peróxido de hidrogênio, ácido peroxiacético compostos de quaternário de amônio e ácidos amoníacos. Em média os sanitizantes reduzem 2 a 4 log UFC/cm² de *Listeria monocytogenes* em biofilme apesar da remoção do biofilme depender de fatores como o estágio do biofilme, da superfície e o substrato em que o biofilme foi produzido. (NORWOOD; GILMOUR, 2000; PAN et al., 2006; YANG et al., 2009). Algumas preocupações com o uso destes compostos tradicionais incluem a seleção de bactérias resistentes e reações químicas entre os sanitizantes e a superfície dos equipamentos (MEREGHETTI et al., 2000; LUNDÉN et al., 2003; GANDHI; CHIKINDAS, 2007) e reações químicas entre os sanitizantes e a superfície dos equipamentos.

2.5 Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*

É possível medir a susceptibilidade *in vitro* de bactérias a antimicrobianos em diversos métodos laboratoriais como o método de difusão e diluição (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). A realização destes testes tem como objetivo avaliar a sensibilidade como também a investigação de novos antimicrobianos (CORREA, 2011). Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (WALSH, 2003). O teste de difusão em ágar é considerado uma prova qualitativa rápida e um dos mais utilizados (VERMA, 2007). O método é geralmente feito em placa de Petri em meio de cultura sólido. A aplicação da substância antimicrobiana pode ser em forma de discos de papel, cilindros de porcelana, aço inoxidável ou em orifícios feitos no meio de cultura (OSTROSKY et al., 2008; TAVARES, 2009). O resultado é obtido entre 18 às 24h após a incubação através da determinação da zona de inibição criada ao redor da substância antimicrobiana.

O método de diluição em caldo ou ágar é considerado quantitativo (NCCLS, 2003). Os compostos antimicrobianos são testados em concentrações de diluições seriadas contendo a cultura do microrganismo a ser testado. Entre 18 às 24h a menor concentração do composto capaz de impedir o crescimento visível (OSTROSKY et al., 2008) é conhecido como concentração inibitória mínima (CIM) (GOODMAN; GILMAN, 2010) que corresponde à concentração bacteriostática (TAVARES, 2009). O teste de concentração bactericida mínima

(CBM) é constituído pela menor concentração do antimicrobiano que elimina 99,9% do inóculo bacteriano (MAGALHÃES, 2012). A determinação da CBM permite avaliar a atividade bacteriostática ou bactericida do antimicrobiano (VERMA, 2007).

Levy (2001) afirma que a resistência pode ser considerada um fenômeno ecológico que ocorre como resposta da bactéria frente ao amplo uso de antimicrobianos e sua presença no meio ambiente. A primeira cepa multirresistente foi isolada de um paciente com meningoencefalite na França em 1988 (POYART-SALMERON et al., 1990). Desde então outras cepas de *L. monocytogenes* isoladas de alimentos, ambiente ou em casos esporádicos de listeriose em humanos ou animais foram descritas como resistente a um ou mais antibióticos (CHARPENTIER; COURVALIN, 1999; VELA et al., 2001; WALSH et al., 2001; PRAZAK et al., 2000; SAFDAR; ARMSTRONG, 2003; SRINIVASAN et al., 2005; RODAS-SUÁREZ et al., 2006; LI et al., 2007; ZHANG et al., 2007; CONTER et al., 2009; MORVAN et al., 2010; YAN et al., 2010; GRANIER et al., 2011).

O conhecimento dos mecanismos bioquímicos e genéticos envolvidos na resistência bacteriana é importante para se compreender como a bactéria pode desenvolver a resistência (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Apesar dos mecanismos variarem de patógeno para patógeno, a resistência é causada por alguns fatores básicos: inativação do agente antimicrobiano por alterações químicas, geralmente promovidas por enzimas bacterianas (WRIGHT, 2005), modificação do alvo que leva à perda de sensibilidade ao agente (LAMBERT, 2005), mudanças na bomba de efluxo e permeabilidade externa da membrana que promovem a redução da concentração do antimicrobiano sem sua modificação química (ALLINGTON; RIVEY, 2001).

2.6 Microscopia para visualização de biofilme

Para estudo laboratorial de biofilmes, podem ser utilizadas técnicas de microscopia e outros métodos como reação da polimerase de cadeia (PCR), bioimpedância, hibridização *in situ*, enumeração em placas e ensaios de biofilme em placas de microtitulação utilizando o corante cristal violeta (GUILBAUD et al., 2005; MOLTZ e MARTIN, 2005). Dentre os métodos microscópicos podemos citar a microscopia de contraste de fase, de epifluorescência, de transmissão e a MEV. Esta última técnica permite a visualização de substância polimérica extracelular e das bacterianas fixadas, permitindo o estudo estrutural de biofilmes que são formados em superfícies de aço inoxidável, alumínio, vidro, borracha, teflon e nylon

(HERALD e ZOTTOLA, 1988a; HERALD e ZOTTOLA, 1988b; NOTERMANS et al., 1991; ZOTTOLA, 1991; LINDSAY e Von HOLY, 1997).

A microscopia de epifluorescência (EPF) é uma escolha quando se quer quantificar a células aderidas às superfícies. Já a microscopia eletrônica é mais indicada para a avaliação da interação microbiana na matriz do biofilme (TRAVAGIN, 2010). O microscópio eletrônico possibilitou a observação direta de aspectos estruturais das células que até então eram desconhecidas (GALLETI, 2003). Na microscopia eletrônica é utilizado um feixe de elétrons que são refratados por meio de lentes eletrônicas. O aumento de até 400.000 vezes. De acordo com Pizzolitto (1997) o MEV mostra uma imagem tridimensional, e a superfície topográfica da amostra é revelada com nitidez. Mesmo com o fato das técnicas microscópicas trazerem grande quantidade de informação sobre o processo de adesão e formação de biofilme, as mesmas podem apresentar limitações. O exopolissacarídeos (EPS) pode desidratar e se apresentar como cordões finos que podem ser interpretados como estruturas fibrosas ao invés de uma matriz gelatinosa ao redor das bactérias (ANDRADE, 2008). Apesar das limitações, como o processo de desidratação que prejudica a visualização real da amostra (SURMAN et al., 1996). O MEV apresenta consideráveis vantagens e tem sido usado em diversos trabalhos sobre biofilmes bacterianos (HERALD e ZOTTOLA, 1988 a; HERALD e ZOTTOLA, 1988 b; NOTERMANS et al., 1991; ZOTTOLA, 1991; LINDSAY e Von HOLY, 1997)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

- Avaliar os biofilmes formados por isolados de *L. monocytogenes* e verificar o perfil de resistência dos isolados a agentes sanitizantes.

3.2 Objetivos Específicos:

- Realizar ensaios de produção de biofilmes utilizando isolados de *L. monocytogenes* previamente obtidas de ambiente de laticínios, amostras de queijos e salmoura;
- Comparar a capacidade de produção de biofilmes pelos isolados de *L. monocytogenes* em placas de poliestireno e cupons de aço inox, borracha e discos de silicone;
- Caracterizar os biofilmes formados por *L. monocytogenes* por microscopia de epifluorescência e microscopia eletrônica de varredura;
- Verificar ao perfil de sensibilidade dos isolados de *L. monocytogenes* frente a agentes sanitizantes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem dos isolados de *L.monocytogenes*

Foram utilizados 37 isolados de *L. monocytogenes* pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia e Micotoxilogia de Alimentos (LMMA) do Departamento de Engenharia de Alimentos da FZEA/USP.

A coleção possui, ao todo, 85 isolados de *L. monocytogenes* mantidas em ultra-freezer a -80°C, os quais foram obtidos de amostras coletadas em dois laticínios localizados no Estado de São Paulo, no período de outubro/2008 a setembro/2009. Esses isolados foram provenientes de salmoura de salga dos queijos, queijos prontos e diversos pontos do interior das indústrias (BARANCELLI, 2010). Os isolados da coleção, previamente confirmados como *L. monocytogenes*, foram analisados através da técnica de *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) com as enzimas *Apal* e *Ascl*, resultando em 37 perfis de PFGE, os quais foram utilizados no presente estudo.

4.2 Ensaios de produção de biofilme por *L.monocytogenes*

4.2.1 Microplaca de poliestireno

A capacidade de produção de biofilme dos 85 isolados de *L. monocytogenes*, distribuídos em 37 pulsotipos pela técnica de PFGE, foi avaliada de acordo com o procedimento descrito por Stepanovic et al. (2003). Cada cepa mantida congelada (-80°C) foi reativada em caldo tripticase soja (TSB) (Merck, Alemanha), incubado a 37°C por 24h, sendo, a seguir, diluída até 10⁸ UFC. A densidade da suspensão foi ajustada a um padrão de 0,5 de MacFarland, utilizando-se TSB como branco. Uma alíquota de 200µl foi pipetada, em triplicata, nos poços de uma microplaca de 96 poços, com fundo chato (TPP, Suíça). Os isolados de *L. monocytogenes* foram incubados por 48 horas sem agitação. Após o período de incubação, a placa foi lavada três vezes, com solução salina tamponada (PBS, pH 7,4, Laborclin®), secada à temperatura ambiente e corada com cristal violeta 1%, por 15 minutos. Após três lavagens com água destilada, a placa foi deixada para secar em temperatura ambiente. Em seguida, as bactérias coradas que aderiram na microplaca foram resolubilizadas adicionando-se 200µL ácido acético glacial (30%) e deixando em repouso por 15 minutos. Posteriormente, o conteúdo foi transferido de uma microplaca para outra e a

mesma foi colocada em um leitor de ELISA (Labsystems, MultiSkan, software Genesis), com leitura a 620 nm. De acordo com Stepanovic et al. (2003) o controle negativo (OD) é usado com base para os cálculos para a determinação dos parâmetros para considerar um isolado produtor ou não de biofilme (OD_c). Deste modo, os isolados foram classificados de acordo com a seguinte regra: $OD \leq OD_c$ = não produtor, $OD_c < OD \leq (2 \times OD_c)$ = fraco produtor, $(2 \times OD_c) < OD \leq (4 \times OD_c)$ = moderado produtor, $(4 \times OD_c) < OD$ = forte produtor. Em todas as análises, foram utilizados controles positivo (*S. epidermidis* ATCC 35.983) e negativo (*S. epidermidis* ATCC 12.228).

4.2.2 Avaliação da formação de biofilme por Microscopia de epifluorescência

Para a verificação da produção de biofilme em aço inox, borracha e silicone, foram analisados de acordo com os protocolos de Shanks et al. (2005) e Chandra; Mukherjee; Ghannoum (2008).

Para a avaliação da formação de biofilme em aço inox, a cepa guardada a -80°C foram reativadas em caldo BHI com incubação a 35°C por 24 horas posteriormente o inóculo dos tubos com crescimento foi estriado em placas preparadas em Ágar-Sangue (Merck, Alemanha). Depois do tempo de incubação respectivo de cada meio de cultura, Foram selecionadas colônias isoladas (Figura 2) e semeada em 2 mL de caldo BHI dentro de um poço de microplaca de poliestireno de 24 poços (TPP, Suíça) contendo no fundo um cupom de aço inox (1x1 cm), outro com cupom de borracha (1x1 cm) e outro com disco de silicone (diâmetro de 1 cm). As microplacas foram colocadas em estufa de 35°C por 48h sem agitação. Os materiais utilizados (aço inox, borracha e silicone) foram previamente higienizados da seguinte maneira, de acordo com o protocolo de Marques (2005): limpos com acetona 100%; deixados por 1 hora em água destilada autoclavada com sabão neutro; enxague com água destilada autoclavada; imersão em álcool 70%; enxágue em água destilada e autoclavagem a 121°C por 15 minutos.

Os cupons de aço inox, borracha e discos de silicone foram retirados dos poços com pinças esterilizadas, após as 48 horas de incubação. Foram lavados com água Mili-Q, colocados em lâmina de vidro. Após a secagem em temperatura ambiente, acrescentou-se uma gota de solução de calcofluor (concentração final 0,05% Sigma Aldrich, EUA; *fluorescent brighter* 28) em cada cupom (aço inox, borracha e silicone).

Os biofilmes foram visualizados em um microscópio óptico de epifluorescência MC80 DX (para cupons de aço inox, silicone e borracha), com câmera Axioplan 2 e software Axio

Vision 4, localizado no Laboratório de Imunologia e Parasitas da FZEA/USP. O comprimento de onda utilizado foi de 620 nm. *S. epidermidis* 35.983 e *S. epidermidis* 12.228 foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente, e serviram como base para a análise das imagens. Após a visualização, os materiais foram autoclavados e descartados.

Figura 2 - Placa de Petri contendo exemplo típico de colônias típicas de *L. monocytogenes* no meio Oxford.

4.2.3 Avaliação da formação de biofilme por microscopia eletrônica de varredura

O preparo das amostras selecionadas foi avaliado de acordo com o protocolo de Shanks et al. (2005) e Chandra; Mukherjee; Ghannoum, (2008), empregando-se microscópio eletrônico de varredura (HITACHI, TM300), localizado no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da FZEA/USP.

Os cupons de aço inox (1x1) foram preparados de acordo com a técnica descrita no item 4.2.2, com observação dos cupons de aço inox após 48 h e 72 h de incubação a 35° C. Os cupons de aço inox contendo os biofilmes foram fixados por cinco horas em solução de Karnovsky glutaraldeído.

4.3 Perfil de resistência a sanitizantes por determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

O perfil de resistência a agentes sanitizantes foi realizado utilizando-se os isolados de *L. monocytogenes* que apresentaram capacidade de produção de biofilmes nos ensaios em cupons de aço inox, ou borracha ou silicone (N=19). Foram utilizados cinco princípios ativos distintos de sanitizantes. São eles: tintura de iodo a 2%; hipoclorito de sódio a 2%;

digluconato de clorexidina a 2%, um composto de amônia quaternária, o cloreto de benzalcônio, a 1%, e ácido peracético 2%.

O perfil de resistência a sanitizantes foi determinado através da técnica de CIM, utilizando-se o método de diluição em caldo, que mede quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano. Para realização do teste foram preparadas tubos de ensaio com meio de cultura (BHI) aos quais são acrescentadas diversas concentrações dos agentes antimicrobianos. A seguir, os tubos foram inoculados com uma suspensão padrão do organismo a ser testado e após incubação de 24 horas, foi feita a comparação visual dos tubos. A CIM, neste caso, é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo (NCCLS, 2003).

Seguiu-se o procedimento para determinação da CIM, utilizando as séries de tubos (1 a 12) de ensaio, conforme a Figura 3.

Figura 3 – Esquema do método de diluição em caldo – Série composta por doze tubos

Distribuiu-se 5 ml de meio de cultura (BHI) para cada tubo, exceto para o primeiro. Todos os tubos foram autoclavados com o meio de cultura a 121°C por 15 minutos. No primeiro tubo foi adicionado 10 mL de sanitizante, sendo 5 mL transferidos para o segundo tubo e assim sucessivamente até o tubo 11. Todos os tubos foram homogeneizados com agitador de tubos.

A Tabela 1 demonstra as concentrações de solução de sanitizantes nos tubos e os controles.

Em uma série de 12 tubos, um volume de 0,1 mL, foi transferido para todos os tubos, exceto para o de número 11. O tubo de número 11 é considerado o controle negativo (BHI+ antimicrobiano) e o tubo de número 12 o controle positivo (BHI+ inóculo). O conteúdo foi homogeneizado e os tubos incubados em estufa a 30°C por 24 horas, para comparação visual. A CIM do antimicrobiano testado é considerada como a concentração do tubo de maior diluição onde se verificou a ausência de crescimento bacteriano (PACHECO, 2003). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Tabela 1 - Diluição e conteúdo dos tubos de ensaio para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

TUBO	DILUIÇÃO	CONTEÚDO
1	1:1 ou 100%	10 mL de sanitizantes
2	1:2 ou 50%	5 mL de BHI e 5 mL de sanitizante do tubo 1
3	1:4 ou 25%	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 2
4	1:8 ou 12,5%	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 3
5	1:16 ou 6,25%	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 4
6	1:32 ou 3,12%	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 5
7	1:64 ou 1,56%	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 6
8	1:128 ou 0,78%	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 7
9	1,256 ou 0,39%	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 8
10	1:512 ou 0,19%	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 9
11	-	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 10 (controle -)
12	-	5 mL de BHI + inóculo (controle +)

O fluxograma dos procedimentos metodológicos empregados neste estudo está esquematizado na Figura 4.

Figura 4 - Fluxograma da metodologia experimental para o estudo de biofilmes por isolados de *Listeria monocytogenes*.

4.4 Análise dos resultados

As amostras de biofilmes dos isolados de *L. monocytogenes* foram realizadas em triplicatas. Estas forneceram densidades ópticas (DO) que foram seguidas do cálculo de médias com o objetivo de fornecer média aritmética, as quais foram avaliadas estatisticamente pelo proc ANOVA ($P < 0.05$). A diferença entre as médias foram avaliadas pelo teste de Tukey estudentizado e representadas na tabela 3 por letras diferentes.

Baseado na densidade óptica pelos filmes de bactérias de filmes de *L. monocytogenes* isolados de diversos materiais e locais de amostragem (p. ex. leite, queijo e ambiente de produção), foram avaliados quanto à produção de biofilmes e classificados nas seguintes categorias: fraco, moderado e forte (STEPANOVIC et al., 2000). Brevemente, esta classificação foi baseada nos valores de desvio padrão (s) baseados na densidade óptica dos pulsotipos produtores de biofilme ($sDO_n > DO^{CN}$) em relação ao valor do controle negativo (DO^{CN}). Assim como, foram considerados biofilmes fracos quando $DO^{CN} < sDO_n \leq (2 \times DO^{CN})$; moderados $(2 \times DO^{CN}) < sDO_n \leq (4 \times DO^{CN})$ e fortes $(4 \times DO^{CN}) < sDO_n$.

Diferenças do grau de formação de isolados em triplicata de cada isolado de *L. monocytogenes* foram avaliadas por meio do teste de Friedman com posterior ranqueamento pelo teste de Wilcoxon. Os valores de $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes (STEPANOVIC et al., 2004).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características dos isolados de *L. monocytogenes*

A Tabela 2 apresenta as principais características dos 37 isolados de *L. monocytogenes* utilizados no estudo, provenientes de pontos amostrais coletados de diversos locais do interior dos laticínios.

Os locais são considerados de maior ou menor risco para a contaminação de produtos, dependendo da localização de *L. monocytogenes* no ambiente. Superfícies sem contato direto com alimentos obviamente são consideradas de menor risco para contaminação dos produtos do que superfícies com contato direto com os alimentos. Dessa forma, algumas áreas são consideradas de maior risco para contaminação de alimentos do que outras áreas (BARACELLI, 2010).

Devido à presença contínua de umidade e substratos orgânicos, pisos e ralos servem como nichos de *Listeria* spp em indústrias de laticínios (D'AMICO; DONNELLY, 2009). A amostragem de ralos foi considerada boa indicadora da presença de *L. monocytogenes* em indústrias de laticínios (CHARLTON; KINDE; JENSEN, 1990) Segundo Kabuki et al. (2004) altas taxas de contaminação foram encontrados em pisos e caixas plásticas, que podem ser considerados locais importantes por *L. monocytogenes*.

No presente estudo, entre os 37 isolados de *L. monocytogenes*, observou-se alto número de isolados do sorotipo 4b (67,57%), o qual não é esperado em laticínios, pois esse sorotipo não é dominante em alimentos (KATHARIOU, 2002). Os sorotipos 1/2a (2,70%), 1/2b (13,51%) e 1/2c (5,40%) são os mais frequentemente isolados de alimentos e indústrias de alimentos (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007; THÉVENOT et al., 2006), sendo que certos isolados são mais patogênicos ao homem do que outros, e esses três sorotipos são responsáveis aproximadamente 89 a 96% dos casos de listeriose humana (KATHARIOU, 2002).

O sorotipo 4b é mais prevalente entre isolados de humanos portadores assintomáticos da bactéria. A prevalência desse sorotipo pode ser explicada pela higiene pessoal inadequada (HOFER; REIS; HOFER, 2006; BARACELLI, 2010).

Tabela 2 - Características dos isolados de *L. monocytogenes* utilizados no estudo

Código de isolamento	Local de origem	Sorotipo
34AP3	Salmoura	1/2c
14CJ1	Piso sala pasteurização	1/2b
32BJ2	Piso câmara fria	1/2b
31AJ3	Piso câmara fria 1	1/2b
14BJ4	Piso sala pasteurização	1/2c
322J4	Piso câmara fria 2	4b
323J4	Piso câmara fria 2	4b
14AJ1	Piso sala pasteurização	4b
31AP3	Piso câmara fria	4b
23AP4	Caixas plásticas	4b
23GP4	Caixas plásticas	4b
172P2	Manipulador embalagem	4b
132J2	Ralo câmara fria	4b
231J4	Caixas plásticas	1/2b
31CJ3	Piso câmara fria 1	4b
13BJ2	Ralo câmara fria	4b
31AJ2	Piso câmara fria 1	4b
31CJ2	Piso câmara fria 1	4b
13AJ4	Ralo câmara fria	4b
13BJ4	Ralo câmara fria	1/2b
13CJ3	Ralo câmara fria	4b
31DJ3	Piso câmara fria 1	4b
31CP4	Piso câmara fria	4b
14BJ2	Piso sala pasteurização	4b
233P4	Caixas plásticas	1/2 ^a
32AJ2	Piso câmara fria 2	4b
34CP4	Salmoura	4b
24AP4	Estrado câmara fria	4b
15AP1	Piso câmara fria	4b
23CP4	Caixas Plásticas	4b
31BP3	Piso câmara fria	4b
51BP4	Queijo Prato	4b
313P4	Piso câmara fria	4b
31GP4	Piso câmara fria	4b
31ZP4	Piso câmara fria	4b
342P4	Salmoura	4b
24AJ3	Estrado câmara fria	4b

5.2 Produção de biofilmes de *Listeria monocytogenes* em microplaca e superfícies de aço inox, silicone e borracha

Inúmeros estudos avaliaram a adesão e formação de biofilme por de *Listeria* spp. em aço inox, borracha, plástico, polietileno de alto peso molecular e vidro (MAFU et al., 1990; HOOD; ZOTOLLA 1997; SINDE; CARBALLO 2000; STEPANOVIC et al., 2004; CHAE et al., 2006). O presente estudo utilizou três métodos fenotípicos, ensaio de microplaca de poliestireno, visualização da produção de biofilme em microscópio de epifluorescência e por MEV, para avaliar a capacidade da produção de biofilme dos isolados. A Figura 5 representa a produção de biofilme em microplaca de poliestireno. Para a visualização em microscópio de fluorescência foram escolhidos os materiais: aço inox, silicone e borracha. O calcofluor é uma substância que torna fluorescente a matriz extracelular com composição polissacarídica ou de celulose. Os cupons de aço inox, silicone e borracha foram escolhidos por serem componentes de equipamentos no ambiente em laticínios. De acordo com Maukonen et al. (2003) o aço inox é o material mais comum usado na indústria de alimentos. Os ensaios da produção de biofilme em peças de silicone borracha e aço inox foram realizados também com o intuito de comparar esses dois tipos de material, hidrofóbico e hidrofílico respectivamente.

Figura 5 - Ilustração de microplaca de fundo chato com o biofilme formado pelos isolados, visualizados após coloração pelo corante cristal violeta (1%).

Os locais mais comuns de isolamento de *L. monocytogenes* em um laticínio são os equipamentos de enchimento e embalagem, paredes, tubagens de arrefecimento e congeladores, nas transportadoras e prateleiras para transporte de produtos e até nas ferramentas e nas luvas do pessoal (PURKRTOVÁ et al., 2010). A *L. monocytogenes* é capaz de crescer em biofilme aderida a superfícies em plantas de indústrias de alimentos. (ARIZCUN; VASSEUR; LABADIE, 1998; ROBERTS; WIEDMANN, 2003) e em ambiente

de ordenha. Biofilmes de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* O157:H7 formados em superfície constituem em ameaças para a indústria de alimentos (DOYLE, 1991; FARBER; PETERKIN, 1991; DEWANTI; WONG, 1995).

A Tabela 3 apresenta as médias obtidas de produção de biofilme dos isolados de *L. monocytogenes* realizadas em microplaca de poliestireno de fundo chato. Diferenças do grau de formação de biofilme em triplicata de cada isolado de *L. monocytogenes* foram avaliadas por meio do teste de Friedman com posterior ranqueamento pelo teste de Wilcoxon.

As amostras de biofilmes dos isolados de *L. monocytogenes* foram realizadas em triplicatas. Estas forneceram densidades ópticas (DO) que foram seguidas do cálculo de médias com o objetivo de fornecer média aritmética, as quais foram avaliadas estatisticamente pelo proc ANOVA ($P < 0.05$).

Com base na densidade óptica dos biofilmes de bactérias de isolados de *Listeria monocytogenes* de diversos materiais e locais de amostragem em laticínios, os mesmos foram classificados nas seguintes categorias: não produtor, fraco, moderado e forte produtor (STEPANOVIC et al., 2000). Esta classificação foi baseada nos valores de desvio padrão (s) baseados na densidade óptica dos isolados produtores de biofilme ($sDO_n > DO^{CN}$) em relação ao valor do controle negativo (DO^{CN}). Assim como, foram considerados biofilmes fracos quando $DO^{CN} < sDO_n \leq (2 \times DO^{CN})$; moderados $(2 \times DO^{CN}) < sDO_n \leq (4 \times DO^{CN})$ e fortes $(4 \times DO^{CN}) < sDO_n$.

Não houve diferença estatística entre as triplicatas de cada isolado de *L. monocytogenes* avaliado ($P = 0.0999$). Entretanto, houve diferença estatística entre as médias de densidade óptica dos biofilmes de cada isolado de *L. monocytogenes* estudado ($P < 0.0001$). O teste de Tukey estudatizado para diferenciação de médias demonstrou resultados similares à classificação proposta por Stepanovic et al. (2000).

Tabela 3 - Densidade óptica (DO) obtida nos ensaios de biofilmes dos 37 isolados de *L. monocytogenes* em placa de poliestireno, classificados de acordo com a capacidade de formação de biofilme

Código de Isolamento	Local de Origem	DO	Classificações
CP	—	1,87±0,99 ^A	Controle Positivo
31AP3	Piso câmara fria	0,29±0,12 ^{BC}	Fraco
23CP4	Caixas plásticas	0,27±0,02 ^{BC}	Fraco
31GP4	Piso câmara fria	0,48±0,06 ^{BC}	Fraco
31BP3	Piso câmara fria	0,48±0,07 ^{BC}	Fraco
31ZP4	Piso câmara fria	0,48±0,07 ^{BC}	Fraco
31AJ3	Piso câmara fria 1	0,26±0,05 ^{BC}	Fraco
CN	—	0,40±0,13 ^{BC}	Controle Negativo
34AP3	Salmoura	0,22 ±0,04 ^C	Não Produtor
14BJ4	Piso sala pasteurização	0,22 ±0,04 ^C	Não Produtor
132J2	Piso câmara fria	0,14 ±0,01 ^C	Não Produtor
31AJ2	Piso câmara fria 1	0,14 ±0,01 ^C	Não Produtor
13CJ3	Ralo câmara fria	0,14 ±0,01 ^C	Não Produtor
233P4	Caixas plásticas	0,14 ±0,01 ^C	Não Produtor
15AP1	Piso câmara fria	0,17 ±0,03 ^C	Não Produtor
313P4	Piso câmara fria	0,14 ±0,01 ^C	Não Produtor
24AJ3	Estrado câmara fria 1	0,13 ±0,023 ^C	Não Produtor
14CJ1	Piso sala pasteurização	0,24 ±0,029 ^C	Não Produtor
322J4	Piso câmara fria 2	0,18 ±0,01 ^C	Não Produtor
23AP4	Caixas plásticas	0,20 ±0,04 ^C	Não Produtor
231J4	Caixas plásticas	0,14 ±0,01 ^C	Não Produtor
31CJ2	Piso câmara fria	0,14 ±0,01 ^C	Não Produtor
31DJ3	Piso câmara fria 1	0,14 ±0,02 ^C	Não Produtor
32AJ2	Piso câmara fria 2	0,12 ±0,00 ^C	Não Produtor
32BJ2	Piso câmara fria 2	0,18 ±0,04 ^C	Não Produtor
323J4	Piso câmara fria 2	0,15 ±0,00 ^C	Não Produtor
23GP4	Caixas plásticas	0,14 ±0,00 ^C	Não Produtor
31CJ3	Piso câmara fria 1	0,14 ±0,02 ^C	Não Produtor
13AJ4	Ralo câmara fria	0,13 ±0,01 ^C	Não Produtor
31CP4	Piso câmara fria	0,13 ±0,00 ^C	Não Produtor
34CP4	Salmoura	0,13 ±0,01 ^C	Não Produtor
14AJ1	Piso sala pasteurização	0,18 ±0,02 ^C	Não Produtor
172P2	Manipulador embalagem	0,16 ±0,02 ^C	Não Produtor
13BJ2	Ralo câmara fria	0,14 ±0,02 ^C	Não Produtor
13BJ4	Ralo câmara fria	0,13 ±0,02 ^C	Não Produtor
14BJ2	Piso sala pasteurização	0,16 ±0,01 ^C	Não Produtor
24AP4	Estrado câmara fria	0,23 ±0,03 ^C	Não Produtor
51BP4	Queijo prato	0,17 ±0,06 ^C	Não Produtor
342P4	Salmoura	0,18 ±0,04 ^C	Não Produtor

CP: *S. epidermidis* ATCC 35.983. CN *S. epidermidis* ATCC 12.228. Não produtor de biofilme: $sDO_n < DO^{CN}$. FRACO: $DO^{CN} < sDO_n \leq (2X DO^{CN})$.

Médias calculadas a partir de análises em triplicata.

^{A-C} Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey estudatizado (P<0,05).

De acordo com estudo realizado por Stephanovic et al. (2004) *Salmonella* spp. e possuem grande capacidade de produção de biofilme em superfícies plásticas. No presente estudo apenas 6 isolados (16,2%) de *L. monocytogenes* foram capazes de produzir biofilme em poliestireno, sendo 5 isoladas de piso da câmara fria e uma de caixas plásticas (Tabela 3).

Nos últimos anos houve um aumento no uso de materiais plásticos em indústrias de alimentos como na construção de acessórios, encanamento de tanques e superfícies para corte (POMPERMAYER; GAYLARDE 2000), por esses motivos a capacidade de produção de biofilme em material plástico indica um importante fator para a persistência da bactéria no ambiente. Outros trabalhos como de Romling; Rohde (1999); Joseph et al. (2001); Mireles et al. (2001); Djordjevic et al.(2002); Stepanovic et al. (2003a) também avaliaram a produção de biofilme por *Salmonella* e *L. monocytogenes* em superfícies plásticas.

Os resultados obtidos nos ensaios em microplaca foram considerados quantitativos. Já os ensaios de produção em superfície inertes são considerados qualitativos. A Figura 6 apresenta as fotomicrografias do biofilme formado em aço inox (controle positivo) e do aço inox sem biofilme (controle negativo), observados ao microscópio ótico de epifluorescência, os quais serviram como padrões para a determinação da produção ou não de biofilme pelos pulstotipos em cupom de aço inox. Devido a problemas técnicos na captação da imagem, as fotomicrografias não ficaram nítidas, porém foi possível observar crescimento de biofilme e células aderidas.

Figura 6 - Fotomicrografias do cupom de aço inox sob microscopia de epifluorescência. A) Controle positivo contendo biofilme formado por *S. epidermidis* ATCC 35983. B) Controle negativo para crescimento de biofilme. C) Células de *L. monocytogenes* aderidas no cupom de aço inox. A), B) e C) Aumento: 20X.

A maior vantagem da análise em microscopia é a observação direta dos biofilmes. Este método, porém, consome muito tempo comparado com o método da microplaca (DJORDJEVIC et al., 2002). Blackman; Frank (1996) reportaram que outra desvantagem da microscopia de epifluorescência é a superestimação dos biofilmes, uma vez que polímeros extracelular podem também ser corados. Já o ensaio de microplaca tem a vantagem de ser um método rápido de análise da adesão bacteriana por vários isolados. Porém sua desvantagem é ser um método indireto da quantidade de biofilme produzido pela absorção do corante cristal violeta (DJORDJEVIC et al., 2002)

As Tabelas 4 e 5 apresentam os isolados de *L. monocytogenes* considerados produtores de biofilme em aço inox e borracha, respectivamente. Todos os isolados positivos em cupons de aço inox eram do sorotipo 4b, exceto 2 isolados, sendo um do sorotipo 1/2c e outro 1/2a. Ainda, desses isolados (N=17), 13 eram provenientes de locais sem contato com alimentos (ralos e pisos de sala de pasteurização ou de câmara fria), enquanto que 2 eram originários de superfícies com contato com alimentos (caixas plásticas) e 2 de salmoura. Nos ensaios de produção de biofilmes realizados em cupons de borracha (Tabela 5), observou-se a prevalência do sorotipo 4b, exceto o sorotipo 1/2b (ralo câmara fria). Esses dados representam um risco de contaminação permanente de *L. monocytogenes* de produtos lácteos, sob a forma de biofilme, pois indica capacidade de persistência da bactéria no ambiente de laticínios.

Com relação aos ensaios de produção de biofilmes em discos de silicone, somente um isolado de *L. monocytogenes* foi positivo (código de isolamento: 14AJ1, sorotipo 4b, proveniente do piso da sala de pasteurização).

Não foi possível encontrar, na literatura, dados sobre a capacidade de produção de biofilmes por isolados de *L. monocytogenes* em superfícies tais como as utilizadas no presente estudo (microplaca de poliestireno, aço inox, borracha e silicone), avaliados através de microscopia de epifluorescência. No entanto, a título de comparação, em um estudo com isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de ambiente de ordenha de fazendas leiteiras no Estado de São Paulo, Lee (2012) observou que 63,3% dos isolados (N=30) apresentou capacidade de produzir biofilmes em microplaca de poliestireno. Na superfície de aço inox, 43,3% dos isolados (N=30) foram positivos e, para o silicone, não houve produção de biofilme, similarmente ao observado no presente estudo para isolados de *L. monocytogenes*.

A Tabela 6 apresenta uma compilação dos de isolados de *L. monocytogenes* formadores e não formadores de biofilme em placas de poliestireno, aço inox, borracha e silicone.

Tabela 4 - Isolados de *L. monocytogenes* positivos nos ensaios de produção de biofilme em aço inox nos pontos de isolamento e sorotipos

Código de isolamento	Local de origem	Sorotipo
14BJ4	Piso sala pasteurização	1/2c
322JA	Piso câmara fria 2	4b
132J2	Piso sala pasteurização	4b
31CJ2	Piso câmara fria 1	4b
13AJ4	Ralo câmara fria	4b
13CJ3	Ralo câmara fria	4b
31DJ3	Piso câmara fria A	4b
31CP4	Piso câmara fria	4b
14BJ2	Piso sala pasteurização	4b
233P4	Caixas plásticas	1/2a
32AJ2	Piso câmara fria 2	4b
34CP4	Salmoura	4b
23CP4	Caixas plásticas	4b
24AP4	Estrado câmara fria	4b
31GP4	Piso câmara fria	4b
31ZP4	Piso câmara fria	4b
342P4	Salmoura	4b

Tabela 5 - Isolados de *L. monocytogenes* positivos nos ensaios de produção de biofilme em borracha nos pontos de isolamento e sorotipos

Código de isolamento	Local de origem	Sorotipo
13BJ4	Ralo câmara fria	1/2b
31CP4	Piso câmara fria	4b
32AJ2	Piso câmara fria 2	4b
24AP4	Estrado câmara fria	4b
31ZP4	Piso câmara fria	4b

Tabela 6 - Número e percentual de isolados de *L. monocytogenes* formadores e não formadores de biofilme em placas de poliestireno, aço inox, borracha e silicone

Tipo de Ensaio	Formadores		Não Formadores	
	Nº	%	Nº	%
Placa de poliestireno	6	16,2	31	83,8
Aço inox	17	45,9	20	54,0
Borracha	5	13,5	32	86,5
Silicone	1	2,70	36	97,3

Do total de isolados de *L. monocytogenes* avaliados quanto à produção de biofilme (N=37), 83,8% não apresentaram produção de biofilme (N=31) e 16,2% foram classificados como fracos produtores de biofilme (N=6) nos ensaios em placas de poliestireno (Tabela 6). Nos ensaios de produção de biofilmes em aço inox, 17 (45,9%) dos 37 isolados avaliados foram produtores de biofilme. Nos ensaios de borracha, 5 (43,3%, N=37) isolados foram positivos (formadores de biofilmes) e, para a superfície de silicone, apenas um isolado foi produtor de biofilme (2,70%).

A Tabela 7 apresenta os isolados de *L. monocytogenes* que foram positivos em dois ou mais ensaios de produção de biofilmes.

Tabela 7 - Isolados de *L. monocytogenes* produtores de biofilmes em mais de um ensaio (microplaca, aço inox e borracha)

Código de isolamento	Local de origem	Sorotipo	Produção de biofilme
31CP4	Piso câmara fria	4b	Aço inox e borracha
32AJ2	Piso câmara fria	4b	Aço inox e borracha
24AP4	Estrado câmara fria	4b	Aço inox e borracha
31ZP4	Piso câmara fria	4b	Microplaca, aço inox e borracha
31GP4	Piso câmara fria	4b	Microplaca e aço inox
23CP4	Caixas plásticas	4b	Microplaca e aço inox

Pode-se observar que todos os isolados produtores de mais de um ensaio de biofilme são provenientes do sorotipo 4b. No presente estudo podem-se observar diferentes respostas à produção de biofilme em diferentes materiais. Houve grande diversidade nas respostas, mas

pode-se observar que a maior parte dos isolados produtores de biofilme era proveniente de piso de câmara fria e sorotipo 4b. Os dados de sorotipo contrastam com os resultados de Borucki et al. (2003), uma vez que os autores encontraram a maior produção de biofilme por isolados do sorotipo 1/2a. Existe uma grande associação desde sorotipo com alimentos (GILMOUR et al., 2010). Já Djordjevic et al. (2002) utilizaram o método da microplaca, e reportaram maior habilidade na produção de biofilme por linhagens dos sorotipos 1/2b e 4b do que linhagens dos sorotipos 1/2a e 1/2c.

A formação de biofilme por *L. monocytogenes* varia entre os diferentes isolados e as razões para estas variações ainda se mantêm desconhecidas (CHAE; SCHRAFT, 2000; BORUCKI et al., 2003). Porém a variação entre o crescimento de *L. monocytogenes* em forma plactônica e em biofilme já foi descrito por Begot et al. (1997) e Borucki et al. (2003), e a seleção de algumas cepas capazes de crescer em ambiente hostil foram reportados (BEGOT et al., 1997). O aumento da produção de biofilme em ambiente hostil pode representar uma resposta à sobrevivência e esta atribuída a ajustes fisiológicos das bactérias o que resulta em aumento da habilidade de se aderir a superfícies (BRIANDET et al., 1999a, b; GIOVANNACCI et al., 2000; TRESSE et al., 2006; TRESSE et al., 2009).

5.3 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

Os resultados dos biofilmes de *L. monocytogenes* formado sobre os cupons do aço inoxidável visualizados por MEV (TM300-HITACHI) estão apresentados na Figura 7.

Diversos estudos têm demonstrado que as propriedades de superfície das células de *L. monocytogenes* podem ser afetadas pela temperatura de incubação (BRIANDET et al., 1999a, BRIANDET et al., 1999b, CHAVANT et al., 2002 e DiBONAVENTURA et al., 2008). No presente estudo visualizou-se células de *L. monocytogenes* (Figura 7A e 7B) aderidas nos cupons nas superfícies do aço inox após 48 horas de incubação, a 35°C. Estudo conduzido por DiBonaventura et al. (2008) analisou a formação de biofilme por *L. monocytogenes* aderidas em aço inox, utilizando a MEV, após 24 horas, tanto a 4 e 12°C, independente do substrato, *L. monocytogenes* produziu biofilme consistindo de poucas células. Isolados de *L. monocytogenes* podem aderir e formar biofilme em uma grande variedade de superfícies (MAFU et al 1990; HELKE e WONG, 1994), como aço inox, silicone, alumínio, polipropileno, borracha, poliuretano e policarbonato. O processo de adesão ocorreu a 30°C (BERESFORD et al., 2001). Santos (2009) observou células aderidas a 35°C após 10 horas de adesão, diversos estudos (MARSH; LUO; WANG, 2003; RATTI, 2006) utilizaram a

mesma superfície, aço inox, observaram que células de *L.monocytogenes* aderiram a 35° C após 1 hora de contato e a 37°C após 3 horas de incubação, respectivamente.

Figura 7 - Células de *L. monocytogenes* aderidas sobre a superfície do aço inoxidável (A e B) após 48 horas de incubação. (C) mostra a formação de biofilme por *L. monocytogenes* após 72 horas de incubação a 35° C. Aumento: A) 2.500x, B) 5.000x, C) 4.000x.

Na Figura 7C é possível verificar a formação de biofilme de isolados de *L. monocytogenes* na superfície de aço inox após 72 horas de incubação, a 35°C em caldo BHI. Ratti (2006) observou a formação de biofilme por *L.monocytogenes* após 3 horas de incubação, sendo verificado um número máximo de células aderidas após 24 horas de incubação. A maioria dos isolados de *L. monocytogenes* não formou biofilme na superfície de aço inox, cultivadas em caldo BHI, após 72 horas à temperatura ambiente (KALMOKOFF et al., 2001).

5.4 Perfil de resistência a agentes sanitizantes por determinação da concentração inibitória mínima (CIM) através da técnica de diluição em tubos

Dezenove isolados de *L. monocytogenes* provenientes de salmoura de salga dos queijos e diversos pontos do interior de laticínios do Estado de São Paulo foram testados para determinação da eficiência de sanitizantes pelo método CIM, utilizando-se a série composta por doze tubos pelo método de diluição (com diluição 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, C- e C+) em caldo: ácido peracético (2%), cloreto de benzalcônio (1%), digluconato de clorexidina (2%), Hipoclorito de sódio (2%) e tintura de iodo (2%) de acordo com protocolo da NCCLS. A Figura 8 apresenta o aspecto dos tubos contendo caldo BHI nos ensaios de resistência aos agentes sanitizantes avaliados. As Tabelas 8 a 12 apresentam os resultados dos sanitizantes testados em isolados de *L. monocytogenes*.

Figura 8 – Séries de 12 tubos contendo caldo BHI com diferentes graus de turvação em função da multiplicação bacteriana e resistência aos agentes sanitizantes. A) Ácido peracético 2%; B) Hipoclorito de sódio 2%; C) Tintura de iodo 2%.

Tabela 8 – Resultado do teste do sanitizante ácido peracético (2%) testado em isolados de *L.monocytogenes* em série de doze tubos

Ponto de isolamento	Sorotipo	Concentração Inibitória Mínima (CIM)											
		Ácido peracético (2%)										11 ^{C-}	12 ^{C+}
Piso sala pasteurização	1/2c	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
Piso da câmara fria	4b	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
Piso da câmara fria 1	4b	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
Ralo da câmara fria	4b	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
Ralo da câmara fria	4b	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
Piso da câmara fria A	4b	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
Piso da câmara fria	4b	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
Piso sala pasteurização	1/2c	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
Caixas plásticas	1/2a	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
Piso câmara fria 2	4b	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
Salmoura	4b	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
Estrado câmara fria	4b	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
Caixas plásticas	4b	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
Piso câmara fria	4b	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
Piso câmara fria	4b	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
Salmoura	4b	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
Piso sala pasteurização	4b	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
Piso câmara fria	1/2b	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+

– Sem crescimento visível; + Com crescimento visível; ^{C-} Controle negativo (BHI + sanitizante); ^{C+} Controle positivo (BHI + inóculo)

Tabela 9 – Resultado do teste do sanitizante cloreto de benzalcônio (1%) testado em isolados de *L.monocytogenes* em série de doze tubos

Ponto de isolamento	Sorotipo	Concentração Inibitória Mínima (CIM)											
		Cloreto de benzalcônio (1%)										11 ^{C-}	12 ^{C+}
Piso sala pasteurização	1/2c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Piso da câmara fria	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Piso da câmara fria 1	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ralo da câmara fria	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ralo da câmara fria	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Piso da câmara fria A	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Piso da câmara fria	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Piso sala pasteurização	1/2c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Caixas plásticas	1/2a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Piso câmara fria 2	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Salmoura	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Estrado câmara fria	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Caixas plásticas	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Piso câmara fria	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Piso câmara fria	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Salmoura	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Piso sala pasteurização	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Piso câmara fria	1/2b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

- Sem crescimento visível; + Com crescimento visível; ^{C-} Controle negativo (BHI + sanitizante); ^{C+} Controle positivo (BHI + inóculo)

Tabela 10 – Resultado do teste do sanitizante digluconato de clorexidina (2%) testado em isolados de *L.monocytogenes* em série de doze tubos

Ponto de isolamento	Sorotipo	Concentração Inibitória Mínima (CIM)											
		Digluconato de clorexidina (2%)										11 ^{C-}	12 ^{C+}
Piso sala pasteurização	1/2c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Piso da câmara fria	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Piso da câmara fria 1	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ralo da câmara fria	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ralo da câmara fria	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Piso da câmara fria A	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Piso da câmara fria	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Piso sala pasteurização	1/2c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Caixas plásticas	1/2a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Piso câmara fria 2	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Salmoura	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Estrado câmara fria	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Caixas plásticas	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Piso câmara fria	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Piso câmara fria	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Salmoura	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Piso sala pasteurização	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Piso câmara fria	1/2b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

- Sem crescimento visível; + Com crescimento visível; ^{C-} Controle negativo (BHI + sanitizante); ^{C+} Controle positivo (BHI + inoculo)

Tabela 11 – Resultado do teste do sanitizante hipoclorito de sódio (2%) testado em isolados de *L.monocytogenes* em série de doze tubos

Ponto de isolamento	Sorotipo	Concentração Inibitória Mínima (CIM)											
		Hipoclorito de sódio (2%)										11 ^{C-}	12 ^{C+}
Piso sala pasteurização	1/2c	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	+
Piso da câmara fria	4b	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	+
Piso da câmara fria 1	4b	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	+
Ralo da câmara fria	4b	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	+
Ralo da câmara fria	4b	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	+
Piso da câmara fria A	4b	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	+
Piso da câmara fria	4b	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	+
Piso sala pasteurização	1/2c	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	+
Caixas plásticas	1/2a	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	+
Piso câmara fria 2	4b	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	+
Salmoura	4b	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	+
Estrado câmara fria	4b	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	+
Caixas plásticas	4b	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	+
Piso câmara fria	4b	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	+
Piso câmara fria	4b	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	+
Salmoura	4b	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	+
Piso sala pasteurização	4b	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	+
Piso câmara fria	1/2b	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	+

— Sem crescimento visível; + Com crescimento visível; ^{C-} Controle negativo (BHI + sanitizante); ^{C+} Controle positivo (BHI + inóculo)

Tabela 12 – Resultado do teste do sanitizante tintura de iodo (2%) testado em isolados de *L.monocytogenes* em série de doze tubos

Ponto de isolamento	Sorotipo	Concentração Inibitória Mínima (CIM)											
		Tintura de iodo (2%)										11 ^{C-}	12 ^{C+}
Piso sala pasteurização	1/2c	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Piso da câmara fria	4b	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Piso da câmara fria 1	4b	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Ralo da câmara fria	4b	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Ralo da câmara fria	4b	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Piso da câmara fria A	4b	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Piso da câmara fria	4b	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Piso sala pasteurização	1/2c	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Caixas plásticas	1/2a	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Piso câmara fria 2	4b	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Salmoura	4b	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Estrado câmara fria	4b	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Caixas plásticas	4b	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Piso câmara fria	4b	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Piso câmara fria	4b	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Salmoura	4b	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Piso sala pasteurização	4b	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Piso câmara fria	1/2b	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+

- Sem crescimento visível; + Com crescimento visível; ^{C-} Controle negativo (BHI + sanitizante); ^{C+} Controle positivo (BHI + inóculo)

Os valores de CIM encontrados para os 5 tipos de sanitizantes: Hipoclorito de sódio, Ácido peracético, Tintura de iodo, Cloreto de benzalcônio e Digluconato de clorexidina estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos sanitizantes avaliados para isolados de *L. monocytogenes*

Sanitizantes	CIM (% de concentração inicial)
Hipoclorito de sódio (2g/100mL)	1:16 (6,25%) ¹
Ácido peracético (2g/100mL)	1:32 (3,12%) ²
Tintura de iodo (2g/100mL)	1:16 (6,25%) ¹
Cloreto de benzalcônio (1g/100mL)	< 1:512 (0,19%) ³
Digluconato de clorexidina (2g/100mL)	< 1:512 (0,19%) ⁴

¹ Concentração a 0,125g/100mL;

² Concentração a 0,0625g/100mL;

³ Concentração a 0,0019g/100mL;

⁴ Concentração a 0,0038g/100mL.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que os isolados de *L. monocytogenes* apresentaram diferentes respostas frente aos cinco sanitizantes testados. De acordo com a Tabela 13 é possível verificar que os 19 isolados de *L. monocytogenes* foram resistentes a 3 sanitizantes dos 5 testados. Os valores de CIM para todos os isolados de *L. monocytogenes* foram 0,0625 g/100 mL (ácido peracético), 0,125 g/100 mL (hipoclorito de sódio e tintura de iodo). Os isolados que apresentaram maior resistência (ácido peracético, hipoclorito de sódio e tintura de iodo) eram provenientes de piso de câmara fria, piso da sala de pasteurização, caixas plásticas, salmoura e ralo da câmara fria. Os isolados de *L. monocytogenes* não apresentaram resistência ao cloreto de benzalcônio e ao digluconato de clorexidina, cujos valores de CIM foram menores que 0,0019 g/100 mL e 0,0038 g/100 mL, respectivamente. Os sanitizantes utilizados são os principais usados em indústrias alimentícias brasileiras e autorizados pelo Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1988).

Estudo realizado por Somers e Wong (2004) verificou a formação de biofilme de *L. monocytogenes* em superfícies e analisaram a eficácia de sanitizantes como o hipoclorito, ácido peracético e compostos derivados de amônia quaternária. No presente estudo, isolados apresentaram resistência ao hipoclorito de sódio e ao ácido peracético. O hipoclorito de sódio

é muito utilizado em indústrias de alimentos, principalmente em laticínios. Por outro lado, Somers e Wong (2004) verificaram que o hipoclorito reduziu a população de *L. monocytogenes* no biofilme, e os outros sanitizantes não foram efetivos (ácido peracético, compostos de amônio quaternário).

A redução de células de *L. monocytogenes* aderidas sobre cupons de aço inox, foi analisada por Cabeça (2006), indicando que *L. monocytogenes* em biofilmes são resistentes à agentes químicos. O hipoclorito de sódio mostrou-se o melhor sanitizante para eliminar as células do biofilme formado na superfície do aço inox, enquanto o iodo foi ineficaz. Pain, et al. (2006), também estudaram a formação de biofilmes em cupons de aço inox e teflon, verificando a resistência dos mesmos aos sanitizantes: cloro, composto de amônia quartenária e um peróxido.

Biofilmes de *L. monocytogenes* podem sobreviver por muito tempo contra tratamento térmico e saneamento, dependendo da temperatura, concentração e tempo de aplicação do sanitizantes, bem como o estado fisiológico das células (NAÏTALI et al.,2009).

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- Os isolados de *L. monocytogenes* provenientes de ambiente de laticínios, amostras de queijos e salmoura apresentaram maior capacidade de produzir biofilme nos ensaios com cupons de aço inox (43,2% dos isolados), seguido dos ensaios em microplaca de poliestireno (16,2% dos isolados), cupons de borracha (13,5% dos isolados) e discos de silicone (2,7% dos isolados).
- Dos 6 (16,2%) isolados *L. monocytogenes* produtores de biofilme em mais de um ensaio, todos foram provenientes do sorotipo 4b.
- As células de *L. monocytogenes* aderidas nas superfícies do aço inox foram visualizadas sob microscopia eletrônica de varredura após 48 horas de incubação a 35°C.
- Os isolados de *L. monocytogenes* analisados apresentaram resistência a ácido peracético, hipoclorito de sódio e tintura de iodo, cujos valores de CIM foram 3,12%, 6,25% e 6,25%, respectivamente.
- Nenhum isolado apresentou resistência a cloreto de benzalcônio e digluconato de clorexidina, os quais foram eficientes para inibição de isolados de *L. monocytogenes* provenientes de amostras de salmoura e ambientes de laticínios.
- A *L. monocytogenes* apresenta capacidade de persistir em ambiente de laticínios sob a forma de biofilme em várias superfícies inertes como aço inox, borracha e silicone, o que pode representar uma fonte permanente de contaminação para produtos e processos de obtenção de leite e derivados.

7 REFERÊNCIAS

- ADRIÃO, A. et al. Marked intra-strain variation in response of *Listeria monocytogenes* dairy isolates to acid or salt stress and the effect of acid or salt adaptation on adherence to abiotic surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 123, p. 142-150, 2008.
- ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. O.; LIMA, J. C. Adesão e formação de biofilmes microbianos. In: ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008. 410 p.
- ALLINGTON, D. R.; RIVEY, M. P. Quinupristin/ dalfopristin: a therapeutic review. **Clinical therapeutics**, Princeton, v.23, n.1, p.24 - 44, 2001.
- ALMEIDA R.A, OLIVER S.P. Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. **Microbial Pathogenesis**, London, v.31, p.205-212, 2001.
- ARIZCUN, C.; VASSEUR, C.; LABADIE, J.C. Effect of several decontamination procedures on *Listeria monocytogenes* growing in biofilms. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61,n. 6, p.731–734, 1998.
- AURELI, P. et al. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v.342, n.17, p.1236-1241, 2000.
- BARANCELLI, G.V. **Ocorrência e caracterização sorológica e genotípica de *Listeria monocytogenes* em indústrias de queijo do Estado de São Paulo**. Pirassununga, 2010. 115f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- BEGOT, C.; LEBERT, I.; LEBERT, A. Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. **Food Microbiology**, London, v.14, n.5, p.403–412, 1997.
- BERESFORD, MA.R.; ANDREW, P.W.; SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.90, n.6, p. 1000-1005, 2001.

- BLACKMAN, I.C.; FRANK, J.F. Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, n. 8, p.827–831, 1996.
- BORUCKI, M. et al. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.69, p.7336–7342, 2003.
- BREMER, P.J.; MONK, I.; OSBORNE, C.M. Survival of *Listeria monocytogenes* attached to Stainless Steel Surface in the presence or absence of *Flavobacterium* ssp. **Journal of Food Protection**, Ames, v.64, n.9, p.1369–1376, 2001.
- BREMER P.J.; FILLERY S.; McQUILLAN A.J. Laboratory-scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.106, p.254–62, 2006.
- BRIANDET, R. et al. Effects of the growth procedure on the surface hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* cells and their adhesion to stainless steel. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.62, p.994–998, 1999a.
- BRIANDET, R. et al. *Listeria monocytogenes*: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.68, p.728–737, 1999b.
- BROOKS JD, FLINT SH. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v.43, p.2163–2176, 2008.
- BUCHOLZ, U.; MASCOLA, L. Transmission, pathogenesis, and epidemiology of *Listeria monocytogenes*. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, Philadelphia, v.10, p.34–41, 2001.
- CABEÇA, T. K. **Suscetibilidade de microrganismos relacionados com contaminação de alimentos em biofilme artificial e em suspensão frente desinfetantes**. 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2006.
- CARRIQUE-MASET J. J. I. et al. Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese an outbreak of listeriosis. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.130, n.1, p.79–86, 2003.

CHAE, M.S.; SCHRAFT, H. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.62, 103–111, 2000.

CHAE, M.S. et al. Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. **Food Microbiology**, London, v.23, p.250-259, 2006.

CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.K.; GHANNOUM, M.A. *In vitro* growth and analysis of *Candida* biofilms. **Nature Protocols**, London, v.3, p.1909-1924, 2008

CHARLTON, B. R., KINDE, H.; JENSEN, L.H. Environmental survey for *Listeria* species in California milk processing plants. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.53, n.3, p.198–201, 1990.

CHAVANT, P. et al. *Listeria monocytogenes* LO28: Surface physicochemical and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.68, n.2, p.729-727, 2002.

CHEN, J.; ROSSMAN, M. L.; PAWAR, D.M. Attachment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to the surface of beef and a culture medium. **LWT. Food Science and Technology**, Oxford, v.40, p.249–254, 2007.

CONTER, M. et al. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.128, p.497–500, 2009.

CORREA, C. B. **Potencial antimicrobiano de resíduos agroindustriais sobre *Listeria monocytogenes***. Piracicaba, 2011. 86f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

D’AMICO, D.J.; DONNELLY, C.W. Detection, Isolation, and Incidence of *Listeria* spp. in small-scale artisan cheese processing facilities: a methods comparison. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 72, n.12, p. 2499–2507, 2009.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v.2, p.114-122, 2003.

DEWANTI, R.; WONG, A.C.L.. Influence of culture conditions on biofilm formation of *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.26, p.147-164, 1995.

DiBONAVENTURA, G. et al. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.104, p.1552-1561, 2008.

DJORDJEVIC, D.; WIEDMANN, M.; MCLANDSBOROUGH, L.A. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.68, p. 2950–2958, 2002.

DOYLE, M. P. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.12, p.289-302, 1991.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P I. *Listeria monocytogenes*: a food borne pathogen. **Microbiology Reviews**, Washington, v.55, p.476-571, 1991.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization) Risk assessments of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: technical report. Geneva: FAO/WHO; 2004. 269p.

FORSYTHE, S. J.; HAYES, P.R., **Food hygiene, microbiology and HACCP**.3 ed. [S.l.] Aspen Publishers, 1998.

GALLET, S.R. Introdução a microscopia eletrônica. **Biológico**, São Paulo, v.65, n1/2, p.33-35, 2003.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M.L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.1, p.01-15, 2007.

GARMYN, D. et al. Communication and autoinduction in the species *Listeria monocytogenes*: a central role for the agr system. **Communicative & Integrative Biology**, v.2, p.371–374, 2009.

GASCHIGNARD, J. et al. Neonatal Bacterial Meningitis: 444 Cases in 7 Years. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v.30, p.212–217, 2011.

GIBSON, H.J. et al. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.87, p.41–48, 1999

GILMOUR, M. et al. High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* isolates during a large foodborne outbreak. **BMC Genomics**, v.11, p.120, 2010.

GIOVANNACCI, I. et al. Physicochemical surface properties of five *Listeria monocytogenes* strains from a pork-processing environment in relation to serotypes, genotypes and growth temperature. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.88, p.992–1000, 2000.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 11. Ed. Porto Alegre: AMGH, 2010, 1821p.

GRANIER, S.A. et al. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.77, p.2788–2790, 2011.

GRAY, M., FREITAG, N., BOOR, K. How the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* mediates the switch from environmental Dr. Jeckyll to pathogenic Mr. Hyde. **Infection and Immunity**, Washington, v.74, p. 2505–2512, 2006.

GILBERT, P.; MC BAIN, A.J.; RICKARD, A H. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Suitland, v. 51, n. 4, p.245-248, 2003.

GUILBAUD, M. et al. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in biofilmes by real-time PCR. **Applied and environmental Microbiology**, Baltimore, v.71, p.2190-2194, 2005.

GUIMARAES, D.O.; MOMESSO, L. da Silva.; PUPO, M.T.; Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, São Paulo, v.33, n.3, p. 667-679, 2010.

HELKE, D.M.; WONG, A.C.L. Survival and growth characteristics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 57, p. 963-968, 1994.

HENSEN, S.M. et al. Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.83, p.1966-1975, 2000.

HERALD, P.J.; ZOTTOLA, E.A. Scanning electron macroscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at elevated temperature and pH values. **Journal of Food Protection**, Ames, v.51, p.445-448, 1988a

HERALD, P.J.; ZOTTOLA, E.A. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, p. 1549-1552, 1988b.

HOOD, S.K.; ZOTTOLA, E.A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.37, p.145–153, 1997.

HOFER, E.; NASCIMENTO, R.S.; OLIVEIRA, M.A. Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.31, n.2, p.173-177, 1998.

HOFER, E.; REIS, C.M.F.; HOFER, C.B. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas isoladas de material clínico humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.39, n.1, p.32-37, 2006.

JACQUET, C. et al. Expression of ActA, Ami, InlB, and Listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, n. 2, p. 616-622, 2002.

JESÚS, A. J.; WHITING, R. C. Thermal inactivation, growth, and survival studies of *Listeria monocytogenes* strains belonging to three distinct genotypic lineages. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, p. 1611-1617, 2003.

JOSEPH, B. et al. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.64, p.367–72, 2001.

KABUKI, D.Y. et al. Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in latin-style fresh-cheese processing plants. **Journal of Dairy Science**. Lancaster. v.87, n.9, p.2803-2812, 2004.

KALLIPOLITIS, B.; INGMER, H. *Listeria monocytogenes* response regulators important for stress tolerance and pathogenesis. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.204, p.111–115, 2006.

KALMOKOFF, M.L. et al. Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.91, p. 725-734, 2001.

KATHARIOU, S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. **Journal of Food Protection**, Ames, v.65, n.11, p.1811-1829, 2002.

KOZAK, J. et al. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods: incidence in dairy products. **Food Control**, Guildford, v.7, p.215-221, 1996.

LAMBERT, P. A. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.1441-1485, 2005.

LAMONT R.F. et al. Listeriosis in human pregnancy: a systematic review. **Journal of Perinatal Medicine**, Berlin, v.39, p.227–236, 2011.

LAZZAROTTO, C. **Formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* isolado de cateter venoso central através de métodos fenotípicos e genotípicos**. Porto Alegre, 2010. 75f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

Lee, S. H. I. **Identificação molecular de *Staphylococcus aureus* formadores de biofilmes em ambiente de ordenha**. 2012.72 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

LEVY, S. B. Antibiotic Resistance: Consequences of Inaction. **Clinical Infections Diseases**, v.33, p.124, 2001.

LI, Q.; SHERWOOD, J.S.; LOGUE, C.M. Antimicrobial resistance of *Listeria* spp. recovered from processed bison. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.44, p.86–91, 2007.

LIANOU, A. et al. Growth and stress resistance variation in culture broth among *Listeria monocytogenes* strains of various serotypes and origins. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 69, p.2640-2647, 2006.

LINDSAY, D.; Von HOLY, A. Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. **Food Microbiology**, London, v.14, p.383-390, 1997.

LIU, D. **Handbook of *Listeria monocytogenes***. Boca Raton: Taylor & Francis, 2008, 540p.

LOW, J. C. & DONACHIE, W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. **The Veterinary Journal**, London, v.153, p.09–29, 1997.

LUNDÉN, J. et al. Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.82, p.265–272, 2003.

LUNDÉN, J.; TOLVANEN, R.; KORKEALA, H. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.87, p. E6-E11, 2004.

MAFU, A.A. et al. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, p.742–746, 1990.

MAGALHÃES, L. **Avaliação da atividade antimicrobiana de ramnolipídeos sobre *Listeria monocytogenes***. 2012. 73f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

MAH, T.F.; O' TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 9, n. 1, p.34-38, 2001.

MANTILLA, S. P. S.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; SANTOS, E. B.; GOUVÊA, R. Resistência antimicrobiana de bactérias do gênero *Listeria* spp. isoladas de carne moída bovina **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 116-121, 2008.

MARQUES, C. S. **Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos**. 2005. 64p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

MARSH, E.J.; LUO, H.; WANG, H. A three-tiered approach to differentiate *Listeria monocytogenes* biofilm-forming abilities. **FEM Microbiology Letters**, Amsterdam, v.228, n.2, p.203-210, 2003.

MARRIOTT, N.G., GRAVANI, R.B. **Principles of Food Sanitation**. New York: Springer Science and Business Media, 2006, 413p.

MAUKONEN, J. et al. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v.30, p.327-356, 2003.

MENENDEZ, S. et al. Removal of *Listeria* spp in a cheese factory. **Journal of Food Safety**, Westport, v.17, p.133-139, 1997.

MEREGHETTI, L. et al. Low sensitivity of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore,, v.66, p.5083–5086, 2000.

MEYER-BROSETA, S. et al. Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.80, p.01-15, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº15, de 23 de agosto de 1988. Determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentadas. Diário Oficial da União, Brasília, 05 de setembro de 1988.

MIRELES, J.R.; TOGUCHI, A.; HARSHEY, R.M. *Salmonella enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.183, p.5848–5854, 2001.

MOLTZ, A.G.; MARTIN, S.E. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions **Journal of Food Protection**, Ames, v.68, p. 92-97,2005

MORVAN, A. et al. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington v.54, p.2728–2731, 2010.

MOSTELLER, T.M.; BISHOP, J.R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.56, p.34-41, 2003.

NAÏTALI, M. et al. Effects of pH and oil-in-water emulsions on growth and physicochemical cell surface properties of *Listeria monocytogenes*: Impact on tolerance to the bactericidal activity of disinfectants. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.130, p.101-107.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS – NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically.** 6th ed. (M7-A6), Wayne, v.23, 2003. 81p.

New York State Department of Agriculture & Markets, 2011. Advantages and Disadvantages of Certain Sanitizers, 2011. Disponível em: <<http://www.agmkt.state.ny.us/fs/>>. Acesso em 17 nov.2012.

NGUYEN, U.T. et al. Small-Molecule Modulators of *Listeria monocytogenes* Biofilm Development. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.78, p. 1454–1465, 2012.

NILSSON, R.E.; ROSS, T.; BOWMAN, J.P. Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.150, p.14–24, 2011.

NORWOOD, D.E.; GILMOUR, A. Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. **Journal of Applied Microbiology**, Belfast, v. 86, n. 4, p.576- 582, 1999.

NORWOOD, D. E.; GILMOUR, A. The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.88 p.512–520, 2000.

NOTERMANS, S., DORMANS, J.A.M.A., MEAD, G.C. Contribution of surface attachment to the establishment of microorganisms in food processing plants: a review. **Biofouling**, Chur, v.5, p.1-6, 1991.

OSTROSKY, E.A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacologia**, São Paulo, v.18, p. 301-307, 2008.

OUYANG, Y. et al. Genome-wide screening of genes required for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Journal of Biotech Research**, v.4, p.13-25, 2012.

PACHECO, A.B.N.D. **Atividade antimicrobiana de desinfetantes comerciais para uso em odontologia**, 2003. 140p. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2003. Disponível em: <<http://www.unicamp.br>>. Acesso em 10 jan.2012.

PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, Hampshire, v.34, p.577-588, 2007.

PAN, Y., BREIDT JR., F., KATHARIOU, S. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v.72, p.7711-7717, 2006.

PARKAR, S.G.; FLINT, S.H.; BROOKS, J.D. Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.96, p.110-6, 2004.

PIZZOLITTO, E. L. **Contribuição ao estudo *in vitro* da corrosão induzida por microrganismos sobre liga-metálica a base de cobre, de uso na Odontologia – modelo experimental com as cepas cariogênicas *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus***. 1997. 118 f. Tese (Doutorado em biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1997.

POIMENIDOU, S, et al. *Listeria monocytogenes* attachment to and detachment from stainless steel surfaces in a simulated dairy processing environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.75, p. 7182-7188, 2009.

POMPERMAYER, D.M.C.; GAYLARDE, C.C. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. **Food Microbiology**, London, v.17, p.361-365, 2000.

POYART-SALMERON, C. et al. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. **Lancet**, London, v.335, p.1422-1426, 1990.

PRAZAK, M.A. et al. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from various cabbage farms and packing sheds in Texas. **Journal of Food Protection**, Ames, v.65, p.1796-1799, 2000.

PURKRTOVÁ, S. et al. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to disinfectants. **Czech Journal of Food Sciences**, v.28, p.326-332, 2010.

RAGON, M. et al., A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. **PLOS Pathogens**, v.4, p.01-14, 2008.

RATTI, R.P. **L.monocytogenes em alimentos fatiados e equipamentos: ocorrência, formação de biofilme e controle**. 2006. 131 p. Dissertação (Mestrado em Biociências

Aplicadas a Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

RAY, B. **Fundamental food microbiology**. Boca Raton: CRC Press, 2004, 608p.

RIEDEL CU, et al. AgrD-dependent quorum sensing affects biofilm formation, invasion, virulence and global gene expression profiles in *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, Salem, v.71, p.1177–1189, 2009.

RIEU A. et al. Agr system of *Listeria monocytogenes* EGD-e: role in adherence and differential expression pattern. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.73, p.6125– 6133, 2007.

ROBERTS A.J.; WIEDMANN, M. Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 60, p. 904–918, 2003.

RODAS-SUÁREZ, O.R. et al. Occurrence and antibiotic sensitivity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from oysters, fish, and estuarine water. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.72, p.7410–7412, 2006.

ROMLING, U.; ROHDE, M. Flagella modulate the multicellular behavior of *Salmonella typhimurium* on the community level. **FEMS Microbiology Letters**. Amsterdam, v.180, p.91–102, 1999.

ROSSI M.L. et al. *Listeria monocytogenes* outbreaks: a review of the routes that favor bacterial presence. **Revista Chilena de Infectologia**, Santiago, v.25, p.328-335, 2008.

RYSER ET, MARTH EH. **Listeria, listeriosis and Food Safety**. Boca Raton: CRC Press; 2007, 750p.

SAFDAR, A.; ARMSTRONG, D. Antimicrobial activities against 84 *Listeria monocytogenes* isolates from patients with systemic listeriosis at a comprehensive cancer center (1955–1997). **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, p.483–485, 2003.

SANTOS, M.G. **Eficiência do processo Clean in Place (CIP) na remoção de biofilmes formados por *Listeria monocytogenes* simulando diferentes condições encontradas em laticínios**. 2009. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

SAUDERS, B.D.; WIEDMANN, M. *Listeria*, listeriosis, and food safety - **Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment**. New York; CRC Press, 2007, 21-53p.

SHANKS, R.M.Q. et al. Heparin Stimulates *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. **Infection and Immunity**, Washington, v.73, p. 4596–4606, 2005.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, v.20, p.407– 413, 2009.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **Food Science and Technology**, Oxford, v.43, p.573–583, 2010.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, London, v.17, p.439-447, 2000.

SMOOT, L. M. AND PIERSON, M. D. Effect of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* Scott A to food contact surfaces. **Journal of Food Protection**, Ames, v.61, n.10, p.1293-1298, 1998.

SOOMERS, E.B.; WONG, A.C.L. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms forms at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. **Journal of Food Protection**, Ames, v.67, n.10, p.2218-2229, 2004.

SRINIVASAN, V. et al. Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms. **Foodborne Pathogens and Disease** v.2, p.201–211, 2005.

STEPANOVIC, S. et al. Influence of the incubation temperatur, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. **Food Microbiology**, Londres, v20, p.339-343, 2003a.

STEPANOVIC, S. et al. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surfaces. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.38, p.428-432, 2004.

STOODLEY P, SAUER K, DAVIES DG, COSTERTON JW. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.56, p.187–209, 2002.

SURMAN, S.B. et al. Comparison of microscope techniques for examination of biofilms. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.25, n.1, p.57-70, 1996.

SVS/MS Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da PORTARIA Nº 2.472, DE 31 DE AGOSTO DE 2010. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2010/prt2472_31_08_2010.html Acesso: 04 de novembro de 2012.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, Paris, v.9, n.10, p.1236-1243, 2007.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2009. 599p.

TAKAHASHI, H. et al. Cellular hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* involves initial attachment and biofilm formation on the surface of polyvinyl chloride. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.50, p.618-625, 2010

THÉVENOT, D.; et al. Serological and molecular ecology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from 13 French pork meat salting–curing plants and their products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.112, n.2, p.153–161, 2006.

TODD, E.C.D., NOTERMANS, S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v.22, p.1484-90, 2011.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**, 8ª ed Porto Alegre: Artmed, 2005, 894p.

TRAVAGIN, B.N.F.S. **Estudo da formação de biofilms de *Listeria monocytogenes* frente a diferentes condições encontradas em laticínios**. Piracicaba, 2010. 98f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

TRESSE, O. et al. Comparative evaluation of adhesion, surface properties, and surface protein composition of *Listeria monocytogenes* strains after cultivation at constant pH of 5 and 7. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.101, p.53–62., 2006.

TRESSE, O. et al. The impact of growth history and flagellation on the adhesion of various *Listeria monocytogenes* strains to polystyrene. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.55, p.189–196, 2009.

UHITIL, S. et al. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and the other *Listeria* spp. in cakes in Croatia. **Food Control**, Guildford, v. 15, p. 213–216, 2004.

VAN der VEEN, S. et al. The SOS response of *Listeria monocytogenes* is involved in stress resistance and mutagenesis. **Microbiology**, v.156, p.374–384, 2010.

VELA, A.I. et al. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from meningoencephalitis in sheep. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.17, p.215–220, 2001.

VERMA, P. Methods for determining bactericidal activity and antimicrobial interactions: synergy testing, time-kill curves, and populations analysis. In SCHWALBE, R.; STEELE-MOORE, L.; GOODWIN, A.C. (Ed.). **Antimicrobial susceptibility testing protocols**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2007. p.275-299.

VITAS, A. I.; AGUADO, V.; GARCIA-JALON, I. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.90, p.349-356, 2004.

WAAK, E.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M. Prevalence and Fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.68, p.3366-3370, 2002.

WAGNER, M. et al. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from 50 small-scale Austrian cheese factories. **Journal of Food Protection**, Ames, v.9, p.1297-1303, 2006.

WALSH, C.; **Antibiotics: Actions, Origins, Resistance**, ASM Press: Washington, 2003.

WALSH, D. et al. Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail foods. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.90, p.517–522, 2001.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p. 1451, 2005.

YANG, H. et al. Efficacy of sanitizing agents against *Listeria monocytogenes* biofilms on high-density polyethylene cutting board surfaces. **Journal of Food Protection**, Ames, v.72, p. 990–998, 2009.

YAN, H. et al. Prevalence and characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes* isolates in Hebei province of Northern China, 2005–2007. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.144, p.310–316, 2010.

ZACHEUS, O.M. et al. Bacterial biofilm formation on polyvinyl chloride, polyethylene and stainless steel exposed to ozonated water. **Water Research**, Nova York, v.34, p.63-70, 2000.

ZHANG, Y. et al. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.113, p.47–53, 2007.

ZOTTOLA, E.A. Characterization of the attachment matrix of *Pseudomonas fragi* attached to non-porous Surfaces. **Biofiling**, Chur, v.5, p.37-55, 1991.

ZOTTOLA EA, SASAHARA KC. Microbial biofilms in the food processing industry—should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.23, p. 125–148, 1994.