UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIA FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Persistência de cepas de *Listeria monocytogenes* em linha
de abate industrial de frango em um matadouro localizado
no Estado de São Paulo

Denise de Almeida Marques Dias

Dissertação apresentada a Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade
de São Paulo para obtenção do grau de
Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientador:

Prof. Assoc. Mariza Landgraf

São Paulo

2008

Denise de Almeida Marques Dias

Persistência de cepas de *Listeria monocytogenes* em linha de abate industrial de frango em um matadouro localizado no Estado de São Paulo

Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Profa. Assoc. Mariza Landgraf

São Paulo

2008

Denise de Almeida Marques Dias

Persistência de cepas de *Listeria monocytogenes* em linha de abate industrial de frango em um matadouro localizado no Estado de São Paulo

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Assoc. Mariza Landgraf
orientador/presidente

Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto
1º. examinador

Profa. Dra. Maria Teresa Destro
2º. examinador

São Paulo, 09 de Janeiro de 2008.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação,

Ao meu marido André Luis,

Ao meu pai Arlindo,

Às minhas irmãs Raquel e Mônica,

Aos meus sobrinhos Nicole Beatriz, Gabriel e Bruno,

À minha família e amigos.

Pelo Amor, Apoio, Compreensão e Paciência.

À minha orientadora Mariza Landgraf,

“A glória da amizade não é a mão estendida, nem o sorriso carinhoso, nem mesmo a delícia da companhia. É a inspiração espiritual que vem quando você descobre que alguém acredita e confia em você.” (Ralph Waldo Emerson)

AGRADECIMENTOS

À minha professora e orientadora, Profa. Mariza Landgraf pela amizade, confiança, paciência e pelos ensinamentos adquiridos,

Às professoras Bernadette D. G. M. Franco e Maria Teresa Destro pela amizade e pelos ensinamentos adquiridos,

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP – São Paulo pela oportunidade de realizar o curso de Pós-graduação,

À FAPESP (processo 05/56901-0) e à CNPq pela concessão da bolsa de estudo,

Ao matadouro frigorífico de aves pela oportunidade e confiança neste trabalho,

Aos pesquisadores Dr. Joaquín V. Martinez-Suárez e Dra. Victoria López do Instituto Nacional de Investigación e Tecnología Agrária e Alimentícia por terem cedido gentilmente os resultados obtidos em sua pesquisa na Espanha (“Evaluation de la diversidad genética de *Listeria monocytogenes* em la industria transformadora del pollo em España y Brasil”),

Ao pessoal das secretarias do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental e da Pós-graduação FCF/USP pela atenção recebida,

Ao pessoal do laboratório de biologia molecular do Bloco 17, em especial a técnica Cristina, pela ajuda e atenção recebida,

À empresa Bio-Rad pelo material concedido,

Às técnicas Kátia Leani e Lúcia pela amizade, apoio, incentivo e convivência;

Às minhas queridas amigas Cíntia e Rosana Aurora pela amizade, apoio, auxílio, carinho e incentivo,

À Ana Eucares, Eb e Vinícius pela amizade, paciência, ensinamentos e imensa contribuição a este trabalho,

Aos amigos André, Ângela, Antônio, Cecília, Cristiano, Cristina, Daniela Horota, Danielle, Flávia, Gabriela, Giuliana, Graciela, Gunnar, Hans, Janaína, Janine, Kátia, Keila, Lina, Marildes, Matheus, Monika, Patrícia Bettini, Patrícia Kari, Paulo, Ricardo, Suzana, Tatiana Nunes, Tatiana Toledo, Vanessa Bíscola, Vanessa Tsu, Vanessa Vieira, Verônica, Viviane Nakai, pela amizade, convívio e pelos bons momentos vividos,

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. <i>Listeria</i> sp.	01
1.2. Contaminação de plantas de processamento de alimentos	05
1.3. Sorotipagem	10
1.4. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	11
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Material	14
3.1.1. Cepa bacteriana	14
3.1.2. Amostras ambientais e de alimento	14
3.1.2.1. Pontos de amostragem	14
3.1.2.2. Coleta de amostras	16
3.1.2.2.1. Amostras de superfícies sem contato com o produto	16
3.1.2.2.2. Amostras de superfícies de contato com o produto	16
3.1.2.2.3. Amostras de pele de pescoço de frango	17
3.1.2.2.4. Amostras de carcaça de frango	17

3.2. Métodos	17
3.2.1. Isolamento e identificação de <i>Listeria monocytogenes</i>	17
3.2.1.1. Enriquecimento primário	17
3.2.1.1.1. Amostras de superfícies sem contato e de contato com o produto	17
3.2.1.1.2. Amostras de pele de frango	18
3.2.1.1.3. Amostras de carcaça de frango	18
3.2.1.2. Enriquecimento secundário	18
3.2.1.3. Isolamento	18
3.2.1.4. Seleção e purificação das colônias suspeitas de <i>Listeria sp.</i>	19
3.2.1.5. Identificação bioquímica de espécies de <i>Listeria</i>	19
3.2.1.5.1. Teste de fermentação de carboidratos	19
3.2.1.5.2. Produção de β-hemólise	19
3.2.1.5.3. Teste de motilidade	20
3.2.1.5.4. Produção de catalase	20
3.2.1.5.5. Confirmação de <i>Listeria monocytogenes</i> através do meio cromogênico RAPID´L.Mono	20
3.2.2. Sorotipificação	20
3.2.2.1. Extração do DNA	20
3.2.2.2. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)	21
3.2.2.3. Eletroforese	22
3.2.2.4. Análise dos resultados	22
3.2.3. Identificação dos perfis de macro-restrição	22
3.2.3.1. Suspensão de células de <i>Listeria monocytogenes</i>	22

3.2.3.2. Preparação dos blocos de agarose	23
3.2.3.3. Lise	23
3.2.3.4. Restrição enzimática	23
3.2.3.5. Eletroforese	23
3.2.3.6. Análise dos resultados	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 Isolamento e identificação de <i>Listeria monocytogenes</i>	25
4.2 Sorotipificação	35
4.3. Identificação dos perfis de macro-restrição	40
5. CONCLUSÃO	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Característica das espécies: *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua* e *Listeria welshimeri* no meio cromogênico RAPID`L.Mono, após incubação a 37°C por 24 horas (Fonte: Rapid Microbiology, 2007). 03
- Figura 2.** Representação esquemática do processamento industrial de abate de frango, indicando os pontos de coleta de amostras de superfícies sem contato (A), superfícies de contato (E), pele de pescoço de frango (P) e de carcaça de frango (F). 15
- Figura 3.** Distribuição das 28 amostras positivas para *Listeria monocytogenes* coletadas em um matadouro de aves no Estado da São Paulo por grupo de amostras. 27
- Figura 4.** Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em amostras de superfícies sem contato com o produto coletadas em um matadouro de aves localizado no Estado de São Paulo. 29
- Figura 5.** Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em amostras de superfícies de contato com o produto coletadas em um matadouro de aves localizado no Estado de São Paulo. 30
- Figura 6.** Gel de eletroforese de agarose com fragmentos de DNA gerados por multiplex PCR com as cepas de *Listeria monocytogenes* sorologicamente referenciadas e demais espécies de *Listeria*. Linha 1 a 12, *Listeria monocytogenes* sorotipo 1/2a, 1/2b, 1/2c, 4b, 3^a, 3b, 3c, 4d, 4e, 7, 4^a e 4c, respectivamente; linha 13, *Listeria innocua* sorotipo 6b; linha 14, *Listeria welshimeri* sorotipo 4c; linha 15, *Listeria ivanovii* sorotipo 5; linha 16, *Listeria seeligeri* sorotipo 1/2b; linha M, marcador de peso molecular. 37
- Figura 7.** Gel de agarose com fragmentos de DNA gerados por multiplex PCR com cepas de *Listeria monocytogenes*. Linhas 1 e 9, marcador de peso molecular (100pb DNA Ladder, Gibco); linhas 2, 4 e 6, cepas do grupo 4 que apresentaram um fragmento extra de 691pb (cepas 68, 74 e 500); linha 3, grupo 3 (cepa 39); linhas 5 e 7, grupo 1 (cepas 75 e controle positivo, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644) e linha 8, controle negativo (branco). Consultar a Tabela 7 para a origem das cepas. 38

- Figura 8.** Gel apresentando os 6 pulsotipos obtidos na macrorestrição do DNA de *Listeria monocytogenes* com a enzima Apal através da PFGE. Linhas A a F: *L. monocytogenes* pulsotipos A a F, respectivamente. PM: padrão de peso molecular - *Salmonella* sorovar Braenderup H9812, digerida com a enzima Xba. 41
- Figura 9.** Gel apresentando os 9 pulsotipos obtidos na macrorestrição do DNA de *Listeria monocytogenes* com a enzima Ascl através da PFGE. Linhas 1 a 9: *L. monocytogenes* pulsotipo 1 a 9, respectivamente. PM: padrão de peso molecular - *Salmonella* sorovar Braenderup, cepa H9812, digerida com a enzima Xba. 42
- Figura 10.** Representação filogenética e sorológica entre os 14 perfis combinados de PFGE obtidos para as 41 cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de um matadouro de aves localizado no interior do Estado de São Paulo e *Salmonella* sorovar Braenderup escolhida como grupo externo. I, II e III correspondem aos grupos clonais. Consultar Tabela 7 para identificação dos sorogrupos. 50
- Figura 11.** Representação filogenética entre os 14 perfis combinados de PFGE obtidos de cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas em um matadouro de aves no Brasil (P1 – P14), os 14 perfis combinados de PFGE obtidos de cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas em um matadouro de aves na Espanha (E1 – E14) e *Salmonella* sorovar Braenderup escolhida como grupo externo. I e II correspondem aos grupos genéticos formados pelas cepas brasileiras e espanholas, respectivamente. Método de agrupamento utilizado foi UPGMA. 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados típicos para as espécies de <i>Listeria</i> sp. em sete testes bioquímicos.	02
Tabela 2. Seqüência de bases dos <i>primers</i> utilizados na reação de multiplex PCR para identificação dos principais sorotipos de <i>Listeria monocytogenes</i> (Doumith <i>et al.</i> , 2004).	21
Tabela 3. Freqüência de amostras positivas para <i>Listeria monocytogenes</i> provenientes de superfícies sem contato, superfícies de contato, pele de pescoço de frango e de carcaça de frango, obtidas em matadouro de aves do Estado de São Paulo no período de julho de 2005 a maio de 2006.	25
Tabela 4. Ocorrência de <i>Listeria monocytogenes</i> , por amostragem, em amostras de superfícies sem contato (A), superfícies de contato (E), pele de pescoço de frango (P) e de carcaça de frango (F) coletadas em um matadouro de aves localizado no interior do Estado de São Paulo, no período de julho de 2005 a maio de 2006.	28
Tabela 5. Ocorrência de <i>Listeria</i> sp. em amostras de superfícies sem contato (A), superfícies de contato (E), pele de pescoço de frango (P) e de carcaça de frango (F) coletadas em um matadouro de aves situado no interior do Estado de São Paulo, no período de julho de 2005 a maio de 2006.	33
Tabela 6. Identificação da origem dos 41 isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> selecionados para identificação sorológica através da técnica de multiplex PCR descrita por Doumith <i>et al.</i> (2004).	36
Tabela 7. Identificação dos grupos sorológicos para <i>Listeria monocytogenes</i> baseada no peso molecular das bandas obtidas por multiplex PCR, segundo Doumith <i>et al.</i> (2004).	37
Tabela 8. Distribuição das 41 cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> sorotipadas pela técnica de multiplex PCR por tipo de amostra considerando todas as amostragens.	39
Tabela 9. Distribuição das 41 cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> isoladas de um matadouro de aves no Estado de São Paulo, conforme os 6 pulsotipos (A – F) obtidos pela restrição empregando a enzima Apal.	41

Tabela 10. Distribuição das 41 cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> isoladas de um matadouro de aves no Estado de São Paulo, conforme os 9 pulsotipos (1 – 9) obtidos pela restrição empregando a enzima Ascl.	42
Tabela 11. Distribuição das 41 cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> isoladas em um matadouro de aves, conforme os 14 perfis combinados de PFGE obtidos com as enzimas Ascl e Apal, respectivamente.	44
Tabela 12. Distribuição dos 14 perfis compostos obtidos pela análise composta dos pulsotipos, após restrição com as enzimas Ascl e Apal, obtidos por PFGE, das 41 cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> isoladas em um matadouro de aves.	45
Tabela 13. Perfis do PFGE com enzima Ascl de cepas persistentes de <i>Listeria monocytogenes</i> , isoladas em 2003 – 2004 (Chiarini, 2007) e 2005-2006, em diferentes pontos de coleta em um matadouro localizado no Estado de São Paulo.	48
Tabela 14. Grupos clonais formados a partir da análise visual do dendrograma do perfil combinado de PFGE com as enzimas Ascl e Apal originários de 41 cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> isoladas de um matadouro de aves.	51
Tabela 15. Distribuição dos 3 grupos clonais (I, II e III) de <i>Listeria monocytogenes</i> , com similaridade superior a 90%, obtidos a partir da análise do dendrograma, isolados em um matadouro de aves.	52

RESUMO

Listeria monocytogenes é um microrganismo conhecido como causador de enfermidades transmitidas por alimentos desde a década de 80 quando foram descritos surtos de listeriose ocorridos na América do Norte e Europa. Dentre os alimentos de origem animal que veiculam esse patógeno, as aves e seus produtos têm merecido atenção especial por parte de alguns pesquisadores devido à associação feita entre aves e uma possível contaminação durante o processamento, acarretando a contaminação dos produtos finais. Os objetivos desta pesquisa foram avaliar a ocorrência de *L. monocytogenes* em diferentes etapas da produção de carcaça de frango em um matadouro frigorífico situado no Estado de São Paulo; avaliar a diversidade genética e sorológica das cepas de *L. monocytogenes* isoladas; correlacionar a diversidade genética das cepas isoladas com a distribuição nas diferentes etapas da linha de processamento, avaliar a persistência das cepas isoladas nesse matadouro e comparar os perfis genéticos de cepas de *L. monocytogenes* obtidos em nosso país com aqueles obtidos em um matadouro de aves com capacidade similar na Espanha. Foram realizadas 4 amostragens nos meses de julho e novembro de 2005, e março e maio de 2006 em um matadouro situado no Estado de São Paulo. Foi examinado um total de 178 amostras de carcaças de frango, pele de pescoço e de superfícies de contato e superfícies sem contato com o alimento. Os isolados foram submetidos à caracterização de sorogrupos por Reação de Polimerização em Cadeia (multiplex PCR) e à subtipagem por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE). Das 178 amostras analisadas, 28 (15,7%) foram positivas para *L. monocytogenes*. Dentre as amostras positivas, 12 (42,9%) foram oriundas de superfícies sem contato com o produto, 9 (32,1%) de superfícies de contato com o produto e 7 (25%) da carcaça inteira de frango, não sendo detectada *L. monocytogenes* em pele de pescoço de frango. Dos 41 isolados de *L. monocytogenes* avaliados, 11 (26,8%) pertencem ao grupo 1 (1/2a ou 3a), 5 (12,2%) ao grupo 3 (1/2b, 3b ou 7) e vinte e cinco (61%) ao grupo 4 (4b, 4d ou 4e). A análise por PFGE forneceu 9 pulsotipos AscI, 6 Apal e 14 perfis combinados, caracterizando quatro grupos clonais. Estes grupos clonais estavam amplamente disseminados ao longo das etapas de processamento.

Quando comparado com dados de estudo prévio realizado no mesmo matadouro, verifica-se a existência de cepas persistentes de *L. monocytogenes* no ambiente. A comparação entre os pulsotipos de *L. monocytogenes* isolados no Brasil e aqueles da Espanha mostrou que não há correlação genética entre as cepas, sendo gerado dos grupos distintos. Isto é uma indicação de que o comércio de carcaças de frango entre os dois países não está ocasionando a disseminação de *L. monocytogenes* no país importador.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, frango, linha de abate, PFGE e cepas persistentes.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a well-known microorganism as cause of foodborne illness since the occurrence of the first outbreak in 1980. Among foods of animal origin that serve as vehicle of this pathogen, poultry and their products are receiving special attention due to their association with outbreaks. The aims of this research were to evaluate the occurrence of *L. monocytogenes* in different steps of production of chicken carcasses in an abattoir in São Paulo state; to evaluate the genetic and serological diversity of *L. monocytogenes* isolates; to correlate the isolates with their distribution along processing line and to evaluate the persistence of strains of *L. monocytogenes* in the environment and evaluate the occurrence of *L. monocytogenes* in different steps of production of chicken carcasses in an abattoir in Brazil and at genetically correlate our data with the ones obtained in an equivalent abattoir in Spain. Samples were collected in July and November 2005, and March and May 2006. A total of 178 samples comprising chicken carcasses, neck skin, surfaces that enter in contact with the product and surfaces that not enter in contact with product were analysed. The isolates were submitted to characterization of serogroup through multiplex PCR and subtyping using PFGE. Among 178 samples, 28 (15.7%) were positive for *L. monocytogenes*: 12 (42.9%) were from the surfaces that do not enter in contact with the product, 9 (32.1%) from the surfaces that enter in contact with the product and 7 (25%) from the carcasses samples. No *L. monocytogenes* was detected among the neck skin samples. The 41 isolates were classified as group 1 [11 (26.8%)] group 3 [5 (12.2%)] and group 4 [25 (61%)]. The molecular typing by PFGE resulted in 9 Ascl and 6 Apal profiles, and 14 composite profiles, resulting in four clonal groups. These

clonal groups were spread throughout the processing line. When these results were compared with the results obtained in a previous study, persistent strains could be observed. The comparison between pulsotypes of *L. monocytogenes* isolated in Brazil and those isolated in Spain showed that there is no genetic correlation between strains. Two distinct clonal groups were obtained. This results indicates that chicken carcasses trade between Brazil and Spain is not disseminating *L. monocytogenes* in the importer country.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, poultry, slaughter line, PFGE and persistent strains.

1. INTRODUÇÃO

O interesse na ocorrência de *Listeria* em alimentos, particularmente *Listeria monocytogenes* intensificou-se rapidamente durante a década de 80 quando foi relatada uma série de surtos de listeriose veiculados por alimentos (McLauchlin, 1996; Rocourt *et al.*, 2000; Norton e Braden, 2007). O primeiro surto ocorreu durante o ano de 1981 e envolveu o consumo de salada preparada à base de repolho cru – *coleslaw*, no Canadá. Em 1983, em Massachusetts, Estados Unidos, 14 pessoas apresentaram sinais de listeriose após consumo de leite pasteurizado contaminado com *L. monocytogenes*. Dois anos depois, naquele mesmo país, o consumo de queijo tipo mexicano produzido na Califórnia foi diretamente envolvido em mais de 142 casos de listeriose, causando pelo menos 40 mortes (McLauchlin, 1996; Norton e Braden, 2007).

Desde então, numerosas mortes e centenas de casos têm sido atribuídas a esse microrganismo (McLauchlin, 1996; CDC, 2007; Norton e Braden, 2007). Acredita-se que o aumento verificado no número de casos seja devido ao maior número de indivíduos imunocomprometidos, a mudanças nos hábitos alimentares e a maior pesquisa do microrganismo em alimentos (Augustin, 2003). Atualmente, *L. monocytogenes* é considerado um patógeno de grande importância para a saúde pública (Norton e Braden, 2007). Dados de 2006, publicados pelo *Center for Disease Control and Prevention* [Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC), 2006], indicam o registro de 138 casos de listeriose naquele ano, o que coloca este microrganismo entre os dez patógenos mais freqüentemente envolvidos em surtos veiculados por alimentos naquele país.

No Brasil, até o presente momento, não existe relato de caso de listeriose humana associado ao consumo de alimentos (CVE, 2007). Porém, há relatos na literatura de casos de listeriose (Hofer *et al.*, 1998; Landgraf *et al.* 1999; Hofer *et al.*, 2000; Leme-Marques *et al.*, 2007) sem, contudo, haver a identificação de alimento como causador da doença. O extenso período de incubação da doença (até 90 dias) somado à demora na identificação do patógeno são fatores que dificultam a identificação da fonte de contaminação.

1.1. *Listeria* sp.

O gênero *Listeria* é composto por microrganismos que se apresentam na forma de bastonetes Gram positivos com extremidades arredondadas, não esporulados, com

0,5µm de diâmetro e 1 a 2µm de comprimento, cujas células podem ser encontradas isoladas, em cadeias pequenas, em forma de V e Y (Holt *et al.*, 1994). É interessante ressaltar que, para uma bactéria que não forma esporos, ela resiste bem aos efeitos deletérios do congelamento, dessecação e aquecimento (Uhtil *et al.*, 2004).

Devido à presença de flagelos peritríquios, as espécies do gênero *Listeria* apresentam motilidade quando incubadas a 20 - 25°C, mas são imóveis a 37°C. Sua motilidade é caracterizada pela forma de “guarda-chuva” quando cultivada em meio semi-sólido. São microaerófilos ou anaeróbios facultativos, fermentando a glicose com produção de ácido láctico, sem produção de gás. As colônias de *Listeria* sp. em ágar tripticase de soja adicionado de 0,6% de extrato de levedura (TSAYE) apresentam-se com 0,2 – 0,8mm de diâmetro e com coloração azul esverdeada sob luz transmitida (Holt *et al.*, 1994).

Durante muitos anos, o gênero *Listeria* foi considerado como monoespecífico, contendo apenas uma espécie: *Listeria monocytogenes*. Através de análises filogenéticas e com a introdução de biologia molecular, esse gênero microbiano é composto por seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. grayi* (McLauchlin, 1996; Rocourt e Buchrieser, 2007). Os principais testes bioquímicos realizados para diferenciar essas espécies podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados típicos para as espécies de *Listeria* sp. em sete testes bioquímicos

Espécie	Motilidade /		Fermentação de carboidratos			
	Catalase	β-hemólise	Dextrose	Xilose	Ramnose	Manitol
<i>L. monocytogenes</i>	+ / +	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	+ / +	-	+	-	V	-
<i>L. seeligeri</i>	+ / +	+	+	+	-	-
<i>L. welshimeri</i>	+ / +	-	+	+	V	-
<i>L. ivanovii</i>	+ / +	+	+	+	-	-
<i>L. grayi</i>	+ / +	-	+	-	-	+

Onde: (+) significa positivo, (-) negativo e (V) variável.

Fonte: modificado de Holt *et al.*, 1994.

Relatos de Fujisawa e Mori (1994), Jiao e Zhou (2005) e Chiarini (2007) mostram que cepas de *L. monocytogenes* podem apresentar reação fraca de β-hemólise e até mesmo resultado negativo para essa atividade. Os meios cromogênicos desenvolvidos para a identificação das espécies desse gênero tentam substituir esse teste bioquímico ao utilizar outras características diferenciais. Assim, o meio RAPID`L.Mono (Bio-Rad)

permite diferenciar *L. monocytogenes* das outras espécies do gênero através da atividade enzimática da fosfatidilinositol fosfolipase C (PIPLC), que está presente apenas nas espécies *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* e *L. ivanovii*, e da presença de xilose, carboidrato que é fermentado apenas por *L. ivanovii* e *L. welshimeri* (AOAC, 2007). De acordo com os critérios do fabricante, são identificadas como *L. monocytogenes*, as colônias que apresentam coloração azul, devido à atividade enzimática da fosfolipase C (PIPLC) e sem formação de halo amarelo ao seu redor, já que esse microrganismo não fermenta a xilose (Figura 1).

Figura 1. Característica das espécies *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua* e *Listeria welshimeri* no meio cromogênico RAPID[®]L.Mono, após incubação a 37°C por 24 horas (Fonte: Bio-Rad, 2007).

Esse microrganismo é produtor de catalase, mas não de oxidase, e não produtor de H₂S (Holt *et al.*, 1994). Pode se multiplicar em temperaturas variando de 1°C a 45°C, em pH de 4,5 a 9,2, e em concentração de sal de até 10%. O limite mínimo de atividade de água (A_w) pode ser considerado baixo, em se tratando de patógeno, [0,93] (Rocourt e Buchrieser, 2007).

Os microrganismos do gênero *Listeria* são ubíquos, sendo comumente encontrados em águas residuárias, rios, solo, plantas, particularmente em material vegetal em decomposição e ambientes tanto úmidos como secos (Gellin e Broome, 1989; Sauders e Wiedmann, 2007). *L. monocytogenes* foi encontrada em pelo menos 37 espécies de mamíferos, tanto domésticos quanto silvestres, assim como em 17 espécies de pássaros e em algumas espécies de peixes e crustáceos (Destro, 2000; Rocourt *et al.*, 2000; Uhtil *et al.*, 2004; Rocourt e Buchrieser, 2007).

Entre os mais importantes microrganismos causadores de infecções alimentares *L. monocytogenes* destaca-se como agente causador da listeriose, doença grave que pode levar ao aborto, a problemas neurológicos. Alguns estudos sugerem que até 21% dos humanos sejam portadores desta bactéria no intestino (Skidmore, 1981; Painter e Slutsker, 2007). A patogenicidade desse microrganismo se deve à habilidade em sobreviver e multiplicar-se em células fagocitárias de seus hospedeiros (Painter e

Slutsker, 2007).

L. monocytogenes é reconhecida como a única espécie do gênero *Listeria* que é patogênica para os humanos, enquanto *L. ivanovii* é descrita como causadora de abortos em ovelhas (Wesley, 2007). Entretanto, dois casos de doença em humanos envolvendo outras espécies de *Listeria* constam da literatura. Na França, há o relato de bacteremia seguida de morte causada por *L. innocua* sorotipo 6a em uma senhora de 62 anos (Perrin *et al.*, 2003) e, em Israel, foi notificado um caso de listeriose causado por *L. ivanovii* (Snapir *et al.*, 2006).

Listeriose é o nome genérico atribuído ao grupo de quadros sintomáticos causados por *L. monocytogenes* (Painter e Slutsker, 2007). Esta doença é responsável por infecções oportunistas, infectando, preferencialmente, mulheres grávidas, recém-nascidos e indivíduos com o sistema imunológico alterado, incluindo idosos (Lawrence e Gilmour, 1994; Painter e Slutsker, 2007).

Os indivíduos que apresentam síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), ou que são portadores do vírus HIV, alcoolismo, diabetes tipo 1, doenças cardiovasculares, os submetidos a transplantes renais e que realizam terapia com corticóides são mais susceptíveis à listeriose, sendo a meningite, endocardite, bacteremia primária e a septicemia os sintomas mais comuns da doença (Farber e Peterkin, 1991; Rocourt *et al.*, 2000). Segundo Painter e Slutsker (2007), a maioria das vítimas apresenta meningoencefalite ou bacteremia.

Mulheres grávidas que contraem a doença podem não apresentar sintomas, mas quando a doença se manifesta, pode causar abortos, nascimento prematuro ou a morte do feto (Rocourt *et al.*, 2000).

Indivíduos saudáveis são altamente resistentes à infecção por *L. monocytogenes*, porém, quando ocorre, febre, diarreia, sonolência e fadiga são os sintomas mais relatados (Painter e Slutsker, 2007).

A dose infectiva de *L. monocytogenes* é desconhecida, mas acredita-se que varia de acordo com a linhagem, suscetibilidade do indivíduo, o tipo e a quantidade do alimento ingerido e a concentração do patógeno no alimento. O período de incubação pode ser excessivamente longo, variando de 1 a 90 dias. Embora a incidência de casos de listeriose seja consideravelmente baixa, a doença causa altas taxas de mortalidade chegando até 30% (Rocourt, 2000).

Devido à gravidade da enfermidade ocasionada por *L. monocytogenes* e o envolvimento de alimentos como veículo, as indústrias processadoras de alimentos foram alertadas para a importância da ocorrência desse microrganismo em seus produtos. Por

isso, cuidados devem ser tomados para evitar a contaminação do produto tanto durante o processamento como também para evitar a recontaminação do alimento pronto para o consumo (Reij *et al.*, 2004).

1.2. Contaminação de alimentos por *Listeria monocytogenes*

O ambiente das plantas processadoras de alimentos tem recebido a atenção dos pesquisadores, uma vez que ele pode contribuir para a contaminação do produto final através da contaminação cruzada (Pritchard *et al.*, 1995). A entrada do microrganismo nesse ambiente ocorre através de sapatos e do vestuário dos trabalhadores, dos equipamentos, de alimentos crus de origem animal e vegetal e através de portadores humanos (Reij *et al.*, 2004).

A presença de *L. monocytogenes* já foi detectada em diversos alimentos tanto de origem animal como vegetal (Destro *et al.*, 1996; Andrigheto, 2000; Jemmi *et al.*, 2002; Gombas *et al.*, 2003b; Hoffman *et al.*, 2003; Gudbjörnsdóttir *et al.*, 2004; Uhitil *et al.*, 2004; Sakate, 2005; Norton e Braden, 2007; Chiarini, 2007) e já foi isolada, também, na linha de processamento, de superfícies que entram e não entram em contato com o alimento e de manipuladores de alimento (Destro *et al.*, 1996; Chasseignaux *et al.*, 2002; Chiarini *et al.*, 2004; Von Laer, 2004).

Em âmbito internacional, entre os alimentos de origem animal, as aves e seus produtos têm merecido atenção especial por parte de diversos pesquisadores (Pini e Gilbert, 1988; Genigeorgis *et al.* 1989; Farber *et al.*, 1989; Genigeorgis *et al.*, 1990; Lawrence e Gilmour, 1994; Chasseignaux *et al.*, 2001; Capita *et al.*, 2001; Antunes *et al.*, 2002; Escudero-Gilete *et al.*, 2007; López *et al.*, 2007a).

Pini e Gilbert (1988), no Reino Unido, verificaram que 60% das amostras de frango resfriado e congelado apresentavam contaminação por *L. monocytogenes*.

Genigeorgis *et al.* (1989) isolaram *L. monocytogenes* em 10%, 14% e 15% das amostras de asa, fígado e coxa, respectivamente, coletadas em supermercados situados na cidade de Davis, no Estado da Califórnia, Estados Unidos. Esses mesmos autores, em outro estudo, verificaram que 20% e 13,3% das 120 amostras de asa e coxa de peru, respectivamente, estavam contaminadas por *L. monocytogenes* (Genigeorgis *et al.*, 1990).

No Canadá, Farber *et al.* (1989) detectaram *L. monocytogenes* em 56,3% das amostras de coxa de frango adquiridas em comércio local na cidade de Ottawa.

Em 1994, Lawrence e Gilmour isolaram *L. monocytogenes* em 30% das amostras

de carne de frango cru oriundas de uma planta de processamento de aves na Irlanda do Norte.

Chasseignaux *et al.* (2001), na França, detectaram *L. monocytogenes* em 43% das 35 amostras de frango fresco coletadas em uma planta de processamento de aves. Resultado similar foi encontrado por Antunes *et al.* (2002), na cidade do Porto, em Portugal, onde isolaram o patógeno de 26 (41%) das 63 amostras de carcaças de frango refrigeradas adquiridas no comércio local.

Capita *et al.* (2001), em León, na Espanha, detectaram *L. monocytogenes* em 32% das carcaças resfriadas de frango. No mesmo país, Escudero-Gilete *et al.* (2007) examinaram amostras de aves coletadas em um matadouro e detectaram *L. monocytogenes* em 30% de amostras de pele de frango. Já López *et al.* (2007a) encontraram porcentagem menor (19,2%) de contaminação por *L. monocytogenes* nesse mesmo país, quando analisaram 600 amostras divididas entre amostras de produtos prontos crus (almôndega, salsicha, nuggets, hambúrguer, entre outros) e amostras de frango cru coletadas na área de resfriamento.

O Brasil vem crescendo a cada ano no cenário da produção mundial de carne de frango e no ano de 2006 foi o terceiro maior produtor mundial de carne de frango e seus derivados. Em 2006, de acordo com dados da Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos (ABEF), a produção total de carne de frango foi de aproximadamente 9,4 milhões de toneladas, valor este 64% superior ao do ano de 2000, sendo que 6,6 milhões de toneladas abasteceram o mercado interno (ABEF, 2007). Com este desempenho, o Brasil é hoje o maior exportador mundial de carne de frango em divisas e em volume (ABEF, 2007).

Apesar de existirem vários trabalhos, no Brasil, que constataam a contaminação por *Listeria* sp. nos mais diversos alimentos: leite e derivados (Catão e Ceballos, 1999; Aragon *et al.*, 2003; Brigido *et al.*, 2004;); pescados (Destro *et al.*, 1996); vegetais (Calil, 1997; Fröder *et al.*, 2003); carnes e derivados (Silva *et al.*, 2004; Von Laer, 2004; Sakate, 2005), até o presente momento poucas pesquisas têm relatado a contaminação de aves e seus produtos por *L. monocytogenes* (Nunes, 1994; Kabuki, 1997; Rodrigues, 1999; Barbalho *et al.*, 2005; Chiarini, 2007).

No Estado de Goiás, Nunes (1994) detectou a presença de *L. monocytogenes* em 35% das 80 amostras de carcaças inteiras de frango congeladas e resfriadas, e de cortes (peitos e coxas com sobrecoxas) adquiridas no comércio da cidade de Goiânia.

Kabuki (1997), na cidade de Campinas no Estado de São Paulo, examinou 10 amostras de peito de frango resfriado e vinte de carcaça resfriada e isolou *L. monocytogenes* em 90% das amostras.

Rodrigues (1999), ao analisar amostras de peito de frango oriundas de uma indústria processadora de frango no Estado de São Paulo, verificou a contaminação por *L. monocytogenes* em 92% delas.

Barbalho *et al.* (2005) observaram a contaminação por *L. monocytogenes* em 3 (9,7%) das 66 amostras de carcaças de frango coletadas em um matadouro no Estado da Bahia.

Chiarini (2007) analisou 183 amostras de carcaças de diferentes pontos da linha de processamento, de carne mecanicamente separada (CMS) e de cortes de frango (resfriados e congelados) coletadas em duas plantas de processamento de aves, sendo uma com o processo de evisceração automática e outra manual, e verificou a ocorrência de *L. monocytogenes* em 13 (14,4%) e 18 (19,4%) amostras analisadas, respectivamente.

Na tentativa de minimizar a contaminação cruzada nas indústrias alimentícias americanas, o *United States Department of Agriculture* [Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA)], intensificou, a partir de 2003, o controle desse microrganismo, principalmente em produtos cárneos prontos para o consumo. Testes para a presença de *L. monocytogenes* em superfícies sem contato com o produto, tais como piso, parede, ralo, e em equipamentos das plantas processadoras foram exigidos de forma a minimizar o risco de uma contaminação no produto final.

Segundo Reij *et al.* (2004), a importância da investigação de *L. monocytogenes* no ambiente de processamento consiste na obtenção de informação sobre a eficiência da limpeza e desinfecção que estão sendo utilizadas, pois o ambiente é uma das principais fontes de contaminação do produto final (Lawrence e Gilmour, 1994; López *et al.*, 2007b).

Estudos realizados por Genigeorgis *et al.* (1989), Hudson e Mead (1989), Lawrence e Gilmour (1995) e Earnshaw e Lawrence (1998) demonstram que a fonte primária de contaminação de produtos avícolas por *L. monocytogenes* está localizada dentro do ambiente de processamento.

Lawrence e Gilmour (1994), após coletarem amostras de uma planta de processamento de produtos cozidos, detectaram a presença de *L. monocytogenes* em 26% das amostras ambientais da área de processamento de produtos crus e em 15% das amostras ambientais da área de cozimento. Embora não tenham detectado esse microrganismo no produto final, a presença de *Listeria* sp. em 8% dessas amostras indica uma possível contaminação pós-processamento.

Examinando amostras de ambiente, de produto cru e de produto pronto para consumo em dois matadouros de aves na Finlândia, Miettinen *et al.* (2001) isolaram *L. monocytogenes* em porcentagens que variaram de 1 a 19% das amostras colhidas nas etapas de pré-resfriamento por ar refrigerado, na máquina de remoção de pele e na esteira transportadora de frango para a embalagem.

Na França, *L. monocytogenes* foi detectada em 38,9% das amostras ambientais de duas plantas de aves durante o processamento, porcentagem essa reduzida para 13,1% das amostras após a higienização. O principal ponto contaminado foi o piso de todas as áreas de processamento (Chasseignaux *et al.*, 2002). Resultados similares foram obtidos por Gudbjörnsdóttir *et al.* (2004), nos países nórdicos, que observaram que o piso e o ralo apresentaram maior contaminação (40,7%) durante o processamento, seguidos dos manipuladores (23,1%) e do produto final (22,2%). Após higienização, 22,2% das amostras do piso e do ralo foram positivas para *L. monocytogenes*.

Berrang *et al.* (2005), nos Estados Unidos, examinando amostras de uma linha de processamento de frango, isolaram *L. monocytogenes* (46,6%) principalmente do piso, do ralo e do produto cru.

No Brasil, um trabalho recente realizado por Chiarini (2007) analisou 158 amostras de superfícies de contato com o alimento e 99 de superfícies sem contato com o alimento e verificou que 31 (19,6%) das amostras de superfícies de contato e 27 (27,3%) das amostras de superfícies sem contato foram positivas para *L. monocytogenes*. Entre as amostras de superfícies de contato, esteira após o resfriamento, facas, ganchos de pendura e luvas de aço foram as mais contaminadas. Em relação às amostras de superfície sem contato, piso da sala de evisceração e da sala de produção de carne mecanicamente separada (CMS), canaleta de drenagem, chaira e a esteira de entrada do túnel de resfriamento foram as mais contaminadas pelo patógeno.

Portanto, o levantamento da ocorrência de *L. monocytogenes* em indústrias processadoras de alimentos é de fundamental importância uma vez que esse microrganismo pode sobreviver por longos períodos em um determinado local em condições consideradas adversas para outros microrganismos. Além de possuir a capacidade de resistir a concentrações subletais de desinfetantes, juntamente com a de colonizar, multiplicar e persistir por longos períodos no ambiente e em equipamentos tornando-se um perigo para as indústrias alimentícias (Lado e Yousef, 2007). Esse perigo aumenta com a grande capacidade desse microrganismo em formar biofilmes tanto em superfícies plásticas quanto em aço inoxidável ou outras superfícies que entram ou não em contato com os alimentos (Earnshaw e Lawrence, 1998; Sommers e Wong, 2004;

Moltz e Martin, 2005).

Alguns fatores podem influenciar a sobrevivência de cepas de *L. monocytogenes* em plantas de processamento de alimentos e, conseqüentemente, facilitar a formação de biofilmes, tais como equipamentos com *design* higiênico inadequado, ranhura interna e/ou solda mal feita na tubulação. A persistência de *L. monocytogenes* pode ser influenciada por propriedades específicas da cepa, tais como diferenças na capacidade de aderência ao aço inoxidável e susceptibilidade aos desinfetantes.

Uma característica importante dos biofilmes é sua resistência aos sanificantes usualmente empregados na indústria, sendo que esta resistência eleva-se com a idade do biofilme (Stopforth *et al.*, 2002).

Uma vez formado o biofilme, a remoção do microrganismo é muito difícil através das práticas normais de limpeza, visto que este protege os microrganismos presentes de agentes sanitizantes e antimicrobianos (Lado e Yousef, 2007), favorecendo, inclusive, o desenvolvimento de resistência aos desinfetantes pela exposição a concentrações subletais. Para prevenir o aparecimento de cepas resistentes tem sido proposta a rotatividade de desinfetantes usados na indústria de alimentos (Lundén *et al.*, 2003; Jackson *et al.*, 2007; López *et al.*, 2007b).

Testando a capacidade de aderência e subseqüente formação de biofilmes por cepas de *L. monocytogenes*, Lundén *et al.* (2002) verificaram que cepas persistentes, ou seja, aquelas que são repetidamente isoladas de um determinado local, são de 2 a 11 vezes mais aderentes ao aço inoxidável do que aquelas não persistentes, constatando assim que as cepas persistentes são capazes de se adaptar ao meio mais rapidamente que as outras. Borucki *et al.* (2004) também verificaram a maior capacidade de cepas persistentes em formar biofilmes.

Portanto, investigações microbiológicas com o intuito de identificar locais de contaminação podem fornecer alguns parâmetros sobre a persistência das cepas dentro do ambiente de processamento (Lawrence e Gilmour, 1995).

A garantia da inocuidade de alimentos depende da capacidade das indústrias em minimizar a contaminação de alimentos por microrganismos patogênicos, principalmente durante o processamento e estocagem. Os fatores mais importantes que contribuem para a presença do patógeno em um alimento preparado são a falha na higiene, a contaminação cruzada, o processamento e o armazenamento inadequados, os equipamentos contaminados e a contaminação por manipuladores (Reij *et al.*, 2004).

A contaminação do alimento por *L. monocytogenes* é de difícil controle, uma vez que o organismo é ubíquo no ambiente e possui características fisiológicas que permitem

sua multiplicação no alimento sob condições usualmente adversas para outras bactérias patogênicas (Uhtil *et al.*, 2004). O grande desafio no controle de *L. monocytogenes* na indústria é a prevenção do estabelecimento da bactéria num nicho específico, onde as rotinas de limpeza e desinfecção possam ser ineficazes (Gudbjörnsdóttir, *et al.*, 2004).

Para que haja o controle da contaminação por *L. monocytogenes* tanto dos alimentos quanto do ambiente e equipamentos, as indústrias devem investir em métodos de detecção mais acurados com o intuito de rastrear e monitorar a presença do patógeno na planta, e, caso seja detectado, permitir a adoção de medidas que auxiliam a produção de alimentos inócuos (Silva *et al.*, 2003).

1.3. Sorotipagem

A sorotipagem tem sido uma ferramenta clássica para estudos epidemiológicos e de casos esporádicos de *L. monocytogenes* e consiste na utilização de anticorpos específicos (antisoro) para identificar antígenos homólogos (Chasseignaux *et al.*, 2001).

Linhagens de *L. monocytogenes* possuem diferentes determinantes antigênicos expressos na superfície da célula, incluindo ácidos lipotécóicos, proteínas de membrana e organelas extracelulares (como flagelos e fímbrias). Essas diferenças podem ser identificadas pela tipagem sorológica. As linhagens são divididas em 13 sorotipos baseados nos antígenos somático (O) e flagelar (H): 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 5, 6, 6b (Graves *et al.*, 2007).

Os sorotipos causadores de listeriose humana são principalmente 1/2a, 1/2b e 4b, sendo estes responsáveis por mais de 90% dos casos (Borucki *et al.*, 2004; Doumith *et al.*, 2004; Revazishvili *et al.*, 2004). Entre esses quatro sorotipos, cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 4b são as mais freqüentemente envolvidas em casos/surtos de listeriose humana veiculada por alimentos (Farber e Peterkin, 1991; Cabrita *et al.*, 2004). Segundo López *et al.* (2007a), essa observação sustenta a hipótese de que cepas do sorotipo 4b possuem maior potencial patogênico do que as dos outros sorotipos (1/2a, 1/2b).

A ecologia de cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 4b e seus reservatórios no ambiente das plantas de processamento ainda são desconhecidos. Por motivos não esclarecidos até o momento, cepas do sorotipo 4b geralmente não predominam em alimentos, porém têm sido detectadas em diversos locais no interior da indústria (Jiao e Zhou, 2005; López *et al.*, 2007a).

A sorotipagem de *L. monocytogenes* pela técnica tradicional de aglutinação com o emprego de antisoro apresenta limitações como custo, disponibilidade no mercado e menor poder discriminatório quando comparado com outros métodos de tipificação (Doumith *et al.*, 2004). Frente a isso, para separar um grande número de cepas, pesquisas estão sendo realizadas com o intuito de desenvolver novas técnicas de sorotipagem que apresentem um maior poder discriminatório e que forneçam resultados mais confiáveis e rápidos, como a reação de polimerase em cadeia (PCR) (Graves *et al.*, 2007).

Já existem trabalhos na literatura que descrevem a técnica de reação de polimerização em cadeia (PCR) para a tipagem sorológica de *L. monocytogenes* (Comi *et al.*, 1997; Manzano *et al.*, 1998; Unnerstad *et al.*, 1999; Jinneman *et al.*, 2001; Borucki e Call, 2003), entretanto esses métodos não conseguem diferenciar os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b, detectando, assim, apenas dois ou três sorotipos.

Doumith *et al.* (2004) desenvolveram um método de sorotipagem utilizando multiplex PCR capaz de diferenciar os principais sorotipos envolvidos em casos/surtos de listeriose. As 222 cepas de *Listeria* sp. testadas apresentaram resultado característico para seu sorotipo ou espécie. Porém, este método também não permite diferenciar os sorotipos mais frequentemente isolados – 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b – dos menos frequentes – 3a, 3b, 3c, 4d, 4e e 7. Os autores argumentam que isto não interfere nos resultados, uma vez que 98% dos 5000 isolados de alimentos e pacientes obtidos nos últimos 3 anos e analisados pelo Centro de Referência em *Listeria* do Instituto Pasteur, da França, pertencem aos sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b.

1.4. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

O CDC estabeleceu uma rede nacional, nos Estados Unidos, denominada PulseNet, para a subtipificação molecular de microrganismos patogênicos de origem alimentar através da PFGE, com o objetivo de desenvolver estudos epidemiológicos. O PulseNet teve início em 1996 com 10 laboratórios que subtipificavam apenas uma bactéria, *Escherichia coli* O157:H7. Atualmente, são subtipificadas além desse microrganismo, outros cinco: *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia pestis* e *Shigella* (CDC, 2006), baseado em protocolo desenvolvido pelo CDC (Swaminathan *et al.*, 2001).

Esses protocolos, em especial o protocolo da PFGE para *L. monocytogenes*, vêm sendo largamente empregado em diversos países por ser uma técnica padronizada, o que

permite a comparação dos dados obtidos pelos diversos laboratórios participantes (Graves e Swaminathan, 2001). Como consequência, a PFGE é considerada um *Platinum Standard* dentre as técnicas moleculares por possuir alto poder discriminatório (Graves *et al.*, 2007). Aarnisalo *et al.* (2003) verificaram que a PFGE apresentou maior poder discriminatório que a ribotipagem para cepas de *L. monocytogenes*. Destro *et al.* (1996) constataram que a PFGE apresentou maior poder discriminatório do que a técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA Analysis* – Análise do Polimorfismo de DNA Amplificado Aleatoriamente) para traçar a disseminação de *L. monocytogenes* em uma planta de processamento de camarão.

Por isso, atualmente a PFGE é uma das técnicas mais utilizadas para traçar a disseminação de *L. monocytogenes* em vários ambientes de processamento de alimentos. Ela baseia-se no uso de enzimas de restrição que clivam o DNA genômico de forma não freqüente, produzindo, assim, um perfil simples (10 – 20 bandas). Para a separação dos fragmentos obtidos pela clivagem utiliza-se a eletroforese em gel, na qual a orientação do campo elétrico aplicado ao gel varia periodicamente (pulso) (Graves *et al.*, 2007).

Essa macro-restrição do genoma, com enzimas de baixa freqüência de corte, resulta em um bom poder discriminatório e reprodutibilidade para a comparação entre linhagens tanto de um mesmo sorotipo como de sorotipos diferentes (Graves e Swaminathan, 2001).

As maiores desvantagens do PFGE são o tempo necessário para todo o processo, o alto custo de alguns reagentes e equipamentos, o tempo das corridas (18-26h), além da necessidade de se manter a temperatura da solução tampão a 14°C para evitar a denaturação do DNA, o que gera um aumento do consumo de energia elétrica (Graves *et al.*, 2007).

Considerando a importância que as aves e seus produtos têm para o agronegócio brasileiro e o risco que a presença de *L. monocytogenes* nesses alimentos representa para saúde pública aliado, ainda, à inexistência de estudos sobre cepas persistentes desse microrganismo em plantas de abate industrial de frango, propôs-se este estudo.

2. OBJETIVOS

Tendo em vista o exposto, os objetivos do presente estudo foram:

- Avaliar a ocorrência de *L. monocytogenes* em diferentes etapas da produção de carcaça de frango em um matadouro frigorífico situado no estado de São Paulo;
- Avaliar a diversidade genética e sorológica das cepas de *L. monocytogenes* isoladas;
- Correlacionar à diversidade das cepas isoladas com a distribuição nos diferentes pontos de processamento analisados;
- Avaliar a persistência de cepas de *L. monocytogenes* isoladas no matadouro estudado.
- Comparar os perfis genéticos de cepas de *L. monocytogenes* obtidos em nosso país com aqueles obtidos em um matadouro de aves com capacidade similar na Espanha.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. CEPA BACTERIANA

A cepa bacteriana utilizada como controle positivo no estudo foi *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (Cult Loops, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. A cepa foi mantida à temperatura de -70°C em caldo tripticase de soja (TSB, Oxoid) adicionado de glicerol (Synth, Diadema, Brasil) a 20%.

3.1.2. AMOSTRAS AMBIENTAIS E DE ALIMENTOS

Em cada matadouro de aves, um localizado no Brasil e outro na Espanha, amostras foram coletadas durante o período de 2005 e 2006, abrangendo as quatro estações do ano, totalizando quatro amostragens cada. O atendimento às exigências quanto às normas higiênico-sanitárias e de exportação de carne de aves para a comunidade européia foi o critério definido para a seleção do matadouro brasileiro. O matadouro de aves brasileiro está localizado no Estado de São Paulo, possui a etapa de evisceração manual e tem produção média de abate de 58.000 frangos/dia. O matadouro espanhol apresenta características similares ao do matadouro brasileiro.

Em cada amostragem realizada no matadouro de aves brasileiro, realizada nos meses de julho e novembro de 2005 e março e maio de 2006, foram coletadas 49 amostras, sendo 10 de superfícies sem contato com o produto, 10 de superfícies de contato com o produto, 20 de pele de pescoço de frango, provenientes de 3 lotes consecutivos, e 9 de carcaça inteira de frango resfriada provenientes também de 3 lotes consecutivos. Estas últimas amostras foram coletadas somente em amostragens ocorridas nos meses de março e maio de 2006. Considerou-se como sendo um lote, o conjunto de aves que entrava para o abate a cada duas horas.

3.1.2.1. Pontos de amostragem

Para melhor compreensão, a Figura 2 mostra o fluxograma das etapas de processamento de abate de frango no matadouro estudado e os pontos de coleta das amostras realizadas neste presente estudo.

- Sala de evisceração: foram coletadas duas amostras de superfícies sem contato com o produto sendo uma do piso e uma da parede, e quatro amostras de superfícies de contato sendo uma de calha de respingo, uma de gancho da nória, uma de faca e uma de caixa branca.

- Sala de corte: foram coletadas cinco amostras de superfícies sem contato com o produto sendo uma de piso, uma de parede, uma de área interna e uma de área externa da canaleta e uma de carrinho, e cinco de amostras de superfícies de contato sendo uma de gancho da nória, uma de esteira, uma de tábua de corte, uma de balança e uma de tesoura.

Figura 2. Representação esquemática do abate industrial de frangos, indicando os pontos de coleta de amostras de superfícies sem contato (A), superfícies de contato (E), pele de pescoço de frango (P) e de carcaça de frango (F).

- Pré-resfriamento: foram coletadas vinte amostras de pele de pescoço de frango, de três lotes consecutivos sendo sete do primeiro lote, sete do segundo e seis do terceiro, após a retirada da cabeça.

- Resfriamento: foi coletada uma amostra de superfícies de contato com o produto (rosca sem fim) e em cada uma das duas últimas amostragens foram coletadas 9 amostras de carcaça inteira de frango resfriada, de três lotes consecutivos sendo 3 do primeiro lote, 3 do segundo e 3 do terceiro, retiradas da nória, após a etapa de resfriamento.

- Armazenamento: foram coletadas três amostras de superfícies sem contato com o produto (piso, parede e ralo da câmara fria).

As amostras de superfícies sem contato com o produto foram coletadas após higienização do matadouro, imediatamente antes do início dos trabalhos de abate e, as demais amostras foram coletadas durante o processamento.

3.1.2.2. Coleta de amostras

3.1.2.2.1. Amostras de superfícies sem contato com o produto

As amostras do piso, parede, carrinho, ralo e área externa da canaleta foram coletadas, de maneira asséptica, com o auxílio de esponjas (“Speci-Sponge”®, Nasco, Fort Atkinson, EUA) umedecidas com 10mL de caldo Letheen (Remel Europe, Dartford, Reino Unido), e com o auxílio de um amostrador de plástico de 100cm² (Nasco) higienizado com álcool 70% antes e após a coleta de cada amostra. Cada amostra foi composta por três esponjas, aplicadas em três áreas distintas, totalizando 300cm²/ponto, e depositadas em saco de amostragem estéril (Whirl Pak®, Nasco).

As amostras da área interna da canaleta foram coletadas conforme descrito anteriormente, de três canaletas independentes cada, porém sem o uso do amostrador de 100cm².

3.1.2.2.2. Amostras de superfícies de contato com o produto

As amostras do gancho da nória da sala de evisceração e sala de corte, faca e tesoura tiveram toda a superfície amostrada com o auxílio de esponjas umedecidas com 10mL de caldo Letheen. Cada amostra foi composta por três esponjas de três unidades independentes de um mesmo tipo de utensílio que foram transferidas para um único saco plástico estéril.

As demais amostras (calha de respingo, caixa branca, esteira, tábua de corte de altileno, balança e rosca sem fim) foram coletadas conforme o item 3.1.2.2.1.

3.1.2.2.3. Amostras de pele de pescoço de frango

Cada amostra era composta por peles de pescoço de três aves distintas. As peles foram coletadas manualmente, utilizando luvas de látex, e colocadas em saco plástico estéril.

3.1.2.2.4. Amostras de carcaça de frango

Cada carcaça foi retirada da nória e acondicionada em saco plástico estéril contendo 200mL de solução salina estéril (NaCl 0,85%, Synth). A carcaça era então submetida à vigorosa massagem e posteriormente recolocada na nória. Os sacos contendo a solução de enxágüe foram imediatamente fechados.

Todas as amostras foram acondicionadas em caixa isotérmica contendo gelo reciclável e transportadas, imediatamente após a coleta, ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ USP. O tempo decorrido entre a coleta das amostras e o início das análises não ultrapassou 12 horas.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Listeria monocytogenes*

As amostras foram analisadas empregando-se a metodologia descrita pelo *United States Department of Agriculture/ Food Safety and Inspection Service* [Departamento de Agricultura dos Estados Unidos/ Serviço de Inspeção e Segurança Alimentar] (USDA/FSIS, 2002).

3.2.1.1. Enriquecimento primário

3.2.1.1.1. Amostras de superfícies sem contato e de contato com o produto

Para estas amostras, 200mL de caldo de enriquecimento para *Listeria* modificado [*UVM modified Listeria Enrichment Broth* (UVMm, Difco, Detroit, EUA)] foram adicionados ao saco plástico, contendo as esponjas. Foram, então, homogeneizados em *stomacher* (Seward, Worthing, EUA) por 1 minuto e posteriormente incubados a 30°C por 24 horas.

3.2.1.1.2. Amostras de pele de frango

Nas duas primeiras coletas foram pesados 25g de pele aos quais foram adicionados 225mL de caldo UVMm, homogeneizados em *stomacher* por 1 minuto e incubados a 30°C por 24 horas.

Nas coletas seguintes, as peles foram lavadas com 100mL solução salina estéril a 0,85% e homogeneizadas de maneira semelhante à anterior. Em seguida, o volume total de solução salina de cada amostra foi transferido para frascos plásticos estéreis e submetido à centrifugação (Centrífuga Sorvall Instruments, RC-5B, rotor GSA, DuPont, Waltham, EUA) a 5°C em 1000g, durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 100mL de caldo UVMm, seguido de incubação a 30°C por 24 horas. Essa metodologia foi realizada apenas nas duas últimas amostragens (março e maio de 2006).

3.2.1.1.3. Amostras de carcaça de frango

Após o enxágüe da carcaça (item 3.1.2.2.4.), o líquido foi submetido ao mesmo tratamento descrito em 3.2.1.1.2.

3.2.1.2. **Enriquecimento secundário**

Após o período de 24 horas de incubação, 0,1mL do caldo UVMm foi transferido para tubos de ensaio contendo 10mL de caldo Fraser (Oxoid) acrescido do suplemento SR156E (Oxoid). Os tubos foram incubados a 37°C por 24-48 horas.

3.2.1.3. **Isolamento**

Transcorridas às 24 horas de incubação em caldo Fraser, as amostras apresentando escurecimento devido à hidrólise da esculina, foram semeadas, através da técnica de esgotamento, em placas de Petri (Pleion, Barueri, Brasil) contendo os meios seletivos Palcam (Oxoid), adicionado de suplemento SR150E (Oxoid) e Oxford modificado (MOX, Oxoid) adicionado de suplemento SR157 (Oxoid).

As amostras que não apresentaram escurecimento no caldo Fraser em 24 horas foram reincubadas a 37°C por 24 horas adicionais. Posteriormente, as amostras que apresentaram escurecimento foram tratadas conforme o descrito anteriormente e aquelas que não apresentaram escurecimento após as 48 horas foram consideradas negativas para *Listeria* sp. e descartadas.

As placas de Petri contendo os meios seletivos MOX e Palcam foram incubadas a 37°C por 48 horas.

3.2.1.4. Seleção e purificação das colônias suspeitas de *Listeria* sp.

Três a cinco colônias características de cada meio foram submetidas à identificação.

No meio Palcam foram selecionadas colônias que apresentavam coloração cinza esverdeada, com centro côncavo e halo negro devido à hidrólise da esculina; no meio MOX foram selecionadas colônias que apresentavam coloração enegrecida com centro côncavo e halo negro formado pela hidrólise da esculina.

Cada colônia suspeita foi semeada, por esgotamento, em placas de Petri contendo ágar tripticase de soja (Oxoid) enriquecido de 0,6% de extrato de levedura (TSAYE, Oxoid) para purificação e incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse intervalo, as placas foram observadas sob luz oblíqua (método de Henry) e selecionada apenas uma colônia azulada por placa, característica do gênero *Listeria*, para a realização das provas bioquímicas.

3.2.1.5. Identificação bioquímica de espécies de *Listeria*

Para discriminação em nível de espécie foram utilizados os testes de fermentação de carboidratos (dextrose, xilose, ramnose e manitol), produção de β -hemólise em ágar sangue de cavalo, motilidade a 25°C e produção de catalase (Pagotto *et al*, 2001). Os resultados típicos para as espécies de *Listeria*, nesses testes, encontram-se na Tabela 1.

3.2.1.5.1. Teste de fermentação de carboidratos

Para este teste foram utilizadas placas de Petri contendo ágar púrpura de bromocresol [caldo púrpura de bromocresol (Oxoid) acrescido de 1,5% de ágar bacteriológico (Oxoid)], adicionado dos respectivos açúcares (dextrose, xilose, ramnose e manitol; Inlab, São Paulo, Brasil) a serem testados, na concentração final de 1%. Após a inoculação por picada, as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. O surgimento de halo amarelo ao redor do inóculo indica resultado positivo, ou seja, o microrganismo é capaz de produzir ácido a partir do carboidrato fornecido.

3.2.1.5.2. Produção de β -hemólise

A produção de β -hemólise foi avaliada em placas de Petri contendo ágar sangue de cavalo a 5% (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil). Após inoculação por picada, as placas foram incubadas a 37°C por 24 – 48 horas e examinadas quanto à presença de zonas de clareamento ao redor do crescimento (hemólise), provocadas pela produção de β -hemolisina.

3.2.1.5.3. Teste de motilidade

Os isolados foram inoculados, com o auxílio de uma agulha, em tubos de ensaio contendo 3mL de ágar Motilidade (Difco). Os tubos foram incubados a 25°C por um período de até 7 dias, com observações diárias, a fim de constatar a presença da motilidade típica de *Listeria* sp., ou seja, aspecto de “guarda-chuva” no terço superior do ágar.

3.2.1.5.4. Produção de catalase

Às placas de TSAYE contendo os isolados foram adicionadas gotas de peróxido de hidrogênio a 3% e o resultado foi verificado através do surgimento de bolhas de oxigênio como consequência da presença da enzima catalase.

3.2.1.5.5. Confirmação de *Listeria monocytogenes* através do meio cromogênico RAPID´L.Mono

Após purificação, os isolados característicos foram inoculados em placas contendo o meio cromogênico RAPID´L.Mono (RLM, Bio-Rad Laboratories, Miami Lakes, EUA) que foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Todas as cepas identificadas como *L. monocytogenes* tanto pela série bioquímica quanto pelo meio cromogênico foram armazenadas em tubos de TSAYE e armazenadas a 5°C para posterior caracterização molecular.

3.2.2. SOROTIPIFICAÇÃO

Para a sorotipificação, 41 dos 69 isolados de *L. monocytogenes* obtidos nesta pesquisa, foram submetidas à reação de multiplex PCR, seguindo o protocolo preconizado por Doumith *et al* (2004).

3.2.2.1. Extração do DNA

Os isolados de *L. monocytogenes* e o controle positivo (cepa ATCC 7644) foram semeados, por esgotamento, em placas contendo TSAYE e incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse intervalo, uma pequena massa de colônias de cada placa foi adicionada a tubo Eppendorf contendo 50µL de uma solução a 0,25% de dodecil sulfato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em 0,05N NaOH estéril. Após homogeneização, os tubos foram acondicionados em termobloco (Accublock Digital Dry Bath, Ciencor, Woodbridge,

EUA) a 99°C e mantidos por 15 minutos. Em seguida, a cada tubo foram adicionados 100µL de água ultrapura (Mili-Q, Milipore, Billerica, EUA) estéril e, após homogeneização, o tubo foi armazenado a -20°C até o momento das análises.

3.2.2.2. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

As seqüências dos *primers* utilizados encontram-se na Tabela 2. Todos foram sintetizados pela Invitrogen (Calsbad, EUA).

Tabela 2. Seqüência de bases dos *primers* utilizados na reação de multiplex PCR para identificação dos principais sorotipos de *Listeria monocytogenes* (Doumith *et al.*, 2004)

“Primers”	Seqüência de Oligonucleotídeos (5´ - 3´)	Produtos de PCR (pb)	Especificidade dos sorotipos de <i>L.</i> <i>monocytogenes</i>
<i>Imo0737 - F</i>	AGGGCTTCAAGGACTTACCC	691	1/2a, 1/2c, 3a e 3c
<i>Imo0737 - R</i>	ACGATTTCTGCTTGCCATTC		
<i>Imo1118 - F</i>	AGGGGTCTTAAATCCTGGAA	906	1/2c e 3c
<i>Imo1118 - R</i>	CGGCTTGTTTCGGCATACTTA		
<i>ORF2819 - F</i>	AGCAAAATGCCAAAACTCGT	471	1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e
<i>ORF2819 - R</i>	CATCACTAAAGCCTCCCATTG		
<i>ORF2110 - F</i>	AGTGGACAATTGATTGGTGAA	597	4b, 4d e 4e
<i>ORF2110 - R</i>	CATCCATCCCTTACTTTGGAC		
<i>prs - F</i>	GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG	370	<i>Listeria</i> sp.
<i>Prs - R</i>	CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG		

F: direto e R: inverso

A reação de PCR foi realizada em termociclador MasterCycle® PCR (Eppendorf Scientific, Hamburg, Alemanha) utilizando 100µL, sendo que para cada reação utilizava-se 72,6µL de água ultrapura estéril; 2U de *Taq* polimerase (Quiagen, Montgomery Count, EUA); 1µL do lisado celular do isolado obtido conforme item 3.2.2.1.; 0,2mM de DNTP (Fermentas, Hanover, EUA); 2mM de MgCl₂ (Quiagen), 10µL de buffer 10x (Quiagen) e os 5 pares de *primers* nas seguintes concentrações: 1µM de *Imo0737*, 1µM de *ORF 2819* e 1µM de *ORF2110*, 1,5µM de *Imo 1118* e 0,2µM de *prs*, empregando os seguintes parâmetros da reação: um ciclo inicial de 3 minutos a 94°C; 35 ciclos de 94°C durante 40 segundos, 53°C por 1,15 minutos e 72°C durante 1,15 minutos; e um ciclo final de 72°C durante 7 minutos. Após amplificação, os tubos foram mantidos a -20°C até o momento do uso.

Como controle positivo utilizou-se a cepa padrão (ATCC 7644) e como controle negativo, utilizou-se a mistura dos reagentes substituindo o lisado de células por 1µL de água ultrapura estéril.

3.2.2.3. Eletroforese

Alíquotas de 10 μ L de cada produto amplificado foram adicionadas a 2 μ L de tampão para eletroforese (“loading buffer”; Sambrook *et al.*, 1989) e separadas por eletroforese em gel de agarose 1,2% (Agarose NA, Amersham-Biosciences, Uppsala, Suécia) a 1,5% p/v em tampão TBE 0,5X [0,9M Tris base (USB, Cleveland, Estados Unidos); 0,9M ácido bórico (USB); 0,02M EDTA (Pharmacia Biotech, Cambrige, Inglaterra)]. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal (Mini Gel Electrophoresis System Gel XL Ultra V-2, Labnet International Inc., Woodbridge, EUA) contendo tampão TBE 0,5X, por 30 minutos a 100V. O marcador de peso molecular utilizado foi o 100pb DNA Ladder (Gibco, Gaithersburg, EUA).

Posteriormente, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (10 μ g/mL)(Pharmacia Biotech) por 15 a 30 minutos e a imagem foi registrada com o auxílio do sistema EDAS 120 (Eastman Kodak, New Haven, EUA), sob transiluminação UV 302nm (MacroVue transilluminator, Pharmacia Biotech).

3.2.2.4. Análise dos resultados

A identificação dos sorogrupos de *L. monocytogenes* foi realizada pela verificação da presença e tamanho dos fragmentos gerados para cada isolado (Tabela 2).

3.2.3. IDENTIFICAÇÃO DOS PERFIS DE MACRO-RESTRIÇÃO

Determinou-se o perfil de macro-restrição das mesmas 41 cepas de *L. monocytogenes* submetidas à sorotipificação, empregando-se a técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE), com as enzimas de restrição Ascl e Apal (ambas New England Biolabs, Beverly, EUA), conforme descrito por Graves e Swaminathan (2001).

3.2.3.1. Suspensão de células de *Listeria monocytogenes*

As cepas foram inoculadas em ágar BHI (Oxoid) e incubadas por 24h a 37°C. Posteriormente, cada cepa foi semeada em placa contendo TSAYE a fim de obter um crescimento em “massa” e incubada a 37°C por 24 horas. Uma suspensão de células foi preparada em 3 mL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) e foi determinada a absorbância a 610 nm (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech), com a densidade ótica sendo corrigida para $1,3 \pm 0,1$. Então, 240 μ L da suspensão de células foram transferidos para

tubos Eppendorf contendo 60 μ L de lisozima (10mg/mL; Pharmacia Biotech) e os tubos foram incubados em estufa a 37°C por 10 minutos.

3.2.3.2. Preparação dos blocos de agarose

Decorridos os 10 minutos a 37°C, ao tubo com as células já em suspensão foram adicionados 300 μ L da solução de SSP [1,2% Seakem Gold agarose (Cambrex Bio Science Rockland Inc., EUA), 10% Dodecil Sulfato de Sódio (Sigma-Aldrich), 20 mg/mL proteinase K (Sigma-Aldrich)]. Após homogeneização, aproximadamente 300 μ L foram distribuídos nos moldes de acrílico (Bio-Rad) para a formação dos blocos.

3.2.3.3. Lise

Os blocos de agarose foram tratados com solução de lise [50 mM Tris, 50 mM EDTA, 1% sarcosina (Sigma-Aldrich) e 20 mg/mL proteinase K] e foram incubados, posteriormente, em banho-maria a 54°C por 2 horas. Após este período, foram submetidos a duas lavagens sucessivas com água ultrapura estéril a 54°C por 10 minutos cada e a três lavagens com tampão TE a 54°C por 20 minutos sempre sob agitação (150rpm; Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Edison, EUA). Os blocos de agarose foram então estocados em tampão TE e mantidos a 5°C.

3.2.3.4. Restrição enzimática

Com o auxílio de lâmina de bisturi estéril, “fatias” de cerca de 1/6 dos blocos foram cortadas e submetidas à digestão com as enzimas de restrição (ApaI ou AscI) em seus respectivos tampões, separadamente. Os tubos foram incubados a 37°C (AscI) e a 30°C (ApaI) por 4 e 5 horas, respectivamente.

3.2.3.5. Eletroforese

Os produtos da macro-restrição foram separados por eletroforese em gel de agarose (agarose SeaKem Gold 1% em tampão TBE 0,5X) empregando-se o aparelho Gene Navigator (Amersham Biosciences-GE; Charlottesville, EUA) e os seguintes parâmetros: 200 Volts, tempo de 20 horas e pulsos de 4 a 40 s interpolados. O marcador de peso molecular utilizado foi o Lambda PFG Marker (New England Biolabs). O gel foi corado em solução de brometo de etídio (10 μ g/mL) e a imagem registrada sob luz ultra-violeta empregando-se o sistema EDAS 120.

3.2.3.6. Análise dos resultados

Os produtos da macro-restrição foram comparados visualmente para cada uma das enzimas e agrupados conforme os perfis de banda gerados, tendo sido considerada significativa para a análise a diferença de uma banda entre os perfis.

Os pesos moleculares das bandas de cada um dos perfis foram calculados com o auxílio do sistema EDAS 120. Os perfis obtidos com cada enzima foram combinados entre si para gerar o perfil composto.

O programa NTSYSpc 2.0 (Exeter Software, Setauket, EUA) foi utilizado para construção do dendograma baseando-se no cálculo obtido pelo coeficiente de similaridade de DICE (Dice, 1945) e na análise de agrupamento (*clusters*) UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average*) (Sneath e Sokal, 1973).

Salmonella sorovar Braenderup, cepa H9812, foi utilizada como referência para padrão de peso molecular para o dendrograma (Hunter *et al.*, 2005). Os blocos de agarose contendo o DNA deste microrganismo foram preparados da mesma maneira que os contendo o DNA de *L. monocytogenes*, sendo a enzima XbaI (New England Biolabs) utilizada na etapa de restrição a 37°C por 2 horas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Listeria monocytogenes*

De um total de 178 amostras analisadas ao longo deste experimento, 28 (15,7%) foram positivas para *L. monocytogenes*. Destas, doze (43%) foram isoladas de superfícies sem contato com o produto, nove (32%) de superfícies de contato com o produto e sete (25%) de carcaça de frango resfriada. Não se isolou o patógeno de amostras de pele de pescoço de frango.

Em relação à sazonalidade, a amostragem referente à primavera (novembro de 2005) foi a que apresentou maior número de amostras positivas para *L. monocytogenes* com doze (30%) de 40 amostras analisadas. Em seguida, a época do inverno (julho de 2005) apresentou sete amostras positivas (17,5%) dentre as 40; posteriormente, o verão (março de 2006) com seis amostras positivas (12,2%) de 49 e, finalmente, o outono (maio de 2006) com três amostras positivas (6,1%) de 49 amostras analisadas (Tabela 3).

Tabela 3. Frequência de amostras positivas para *Listeria monocytogenes* provenientes de superfícies sem contato, superfícies de contato, pele de pescoço de frango e de carcaça de frango, obtidas em matadouro de aves do Estado de São Paulo no período de julho de 2005 a maio de 2006.

Amostras	Amostragem				Total (%)
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	
Superfícies sem contato	3/10 (30%)	8/10 (80%)	1/10 (10%)	0/10(0%)	12/40 (30%)
Superfícies de contato	4/10 (40%)	4/10 (40%)	1/10 (10%)	0/10 (0%)	9/40 (22,5%)
Pele	0/20 (0%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)	0/80 (0%)
Carcaça	—*	—*	4/9 (44,4%)	3/9 (33,3%)	7/18 (39%)
Total	7/40 (17,5%)	12/40 (30%)	6/49 (12,2%)	3/49 (6,1%)	28/178 (15,7%)

*As amostras de carcaça de frango não foram coletadas nas duas primeiras amostragens

Esses resultados concordam com os de Monfort *et al.* (1998), Yoshida *et al.* (1998) e Uhtil *et al.* (2004) que também constataram maior ocorrência de *L. monocytogenes* na primavera e inverno ao contrário do observado por Gombas *et al.* (2003a) e Nakamura *et al.* (2004) que não detectaram diferença na positividade de amostras nestas estações do ano. Vale ressaltar que todos esses autores trabalharam com matrizes alimentares diferentes da desta pesquisa.

Outro resultado interessante obtido neste estudo foi a incidência de *L.*

monocytogenes em relação às amostragens (Tabela 3).

O fato das duas primeiras amostragens apresentarem maior número de amostras positivas do que nas duas últimas pode estar relacionado à limpeza realizada no matadouro no dia da coleta. Nas duas últimas amostragens foi possível verificar falhas na limpeza tanto em superfícies sem contato com o produto (como piso, parede, canaleta e ralo) quanto em superfícies que entram em contato com o produto (principalmente da balança, tesoura e tábua de corte), o que não foi observado nas duas primeiras.

Vários estudos demonstram que amostras coletadas de superfícies visivelmente limpas apresentam maior incidência de *L. monocytogenes* do que amostras de superfícies que apresentam sujidades, o que reforça a tese de que a falta de limpeza adequada na área de processamento pode contribuir para o aumento da população de outros microrganismos acarretando a diminuição da incidência de *L. monocytogenes*, uma vez que este patógeno é um fraco competidor (Slade, 1992; Lawrence e Gilmour, 1995; Miettinen *et al.*, 2001; Von Laer, 2004; Reiter *et al.*, 2005; Chiarini, 2007; López *et al.*, 2007b).

Na primeira amostragem realizada em julho de 2005, das 40 amostras analisadas, sete (17,5%) foram positivas para *L. monocytogenes*, sendo três (43%) delas provenientes de superfícies sem contato e quatro (57%) de superfícies de contato (Tabela 3 e Figura 3). Os pontos de coleta de superfícies sem contato positivos para o microrganismo na primeira amostragem foram a área interna e externa da canaleta da sala de corte e o ralo da câmara fria (Tabela 4). Em relação às amostras de superfícies de contato, os pontos positivos para *L. monocytogenes* foram a caixa branca da sala de evisceração; a esteira, o gancho da nória e a tesoura da sala de corte (Tabela 4).

Na segunda amostragem, realizada em novembro de 2005, das 40 amostras analisadas, doze (30%) foram positivas, sendo oito (66,7%) oriundas de superfícies sem contato e quatro (33,3%) de superfícies de contato (Tabela 3 e Figura 3). Os pontos de coleta de superfícies sem contato que apresentaram *L. monocytogenes* foram os pisos da sala de evisceração, da sala de corte e da câmara fria; a área interna e externa da canaleta, a parede e o carrinho da sala de corte; além do ralo da câmara fria (Tabela 4). As amostras da caixa branca da sala de evisceração, da esteira, da tesoura e do gancho da nória da sala de corte foram os pontos de superfícies de contato que apresentaram contaminação por *L. monocytogenes* (Tabela 4).

Figura 3. Distribuição das 28 amostras positivas para *Listeria monocytogenes* coletadas em um matadouro de aves no Estado da São Paulo por grupo de amostras.

A partir da terceira amostragem, decidiu-se verificar a presença de *L. monocytogenes* na carcaça de frango, uma vez que os resultados obtidos, até então, com as amostras de pele de pescoço de frango tinham sido negativos para o patógeno.

Na terceira amostragem, realizada em março de 2006, das 49 amostras analisadas, seis (12,2%) foram positivas, sendo quatro (66,6%) provenientes de carcaça de frango, uma (16,7%) de superfície sem contato e uma (16,7%) de superfície de contato (Tabela 3 e Figura 3). Dentre as amostras de carcaça de frango positivas para *L. monocytogenes*, duas (50%) pertenciam ao primeiro lote e duas (50%) ao terceiro lote (Tabela 4). O ponto de coleta de superfície sem contato positivo para *L. monocytogenes* foi a área interna da canaleta da sala de corte. Em relação às amostras de superfícies de contato, o único ponto de coleta positivo para *L. monocytogenes* foi a tábua de corte da sala de corte (Tabela 4).

Na quarta e última amostragem, realizada em maio de 2006, das 49 amostras analisadas, apenas três (6,1%) foram positivas para *L. monocytogenes*. Todas elas foram isoladas de amostras de carcaça de frango (Tabela 3 e Figura 3). Essas três amostras vieram uma do primeiro (33,3%) e duas do terceiro (66,7%) lotes (Tabela 4).

Tabela 4. Ocorrência de *Listeria monocytogenes*, por amostragem, em amostras de superfícies sem contato (A), superfícies de contato (E), pele de pescoço de frango (P) e de carcaça de frango (F) coletadas em um matadouro de aves localizado no interior do Estado de São Paulo, no período de julho de 2005 a maio de 2006.

Amostra (Área) *	Amostras positivas para <i>L. monocytogenes</i>				N (%)
	1ª Coleta	2ª Coleta	3ª Coleta	4ª Coleta	
A1- Piso (E)	-	+	-	-	1 (25%)
A2- Parede (E)	-	-	-	-	0
A3- Área interna da canaleta (C)	+	+	+	-	3 (75%)
A4- Piso (C)	-	+	-	-	1 (25%)
A5- Parede (C)	-	+	-	-	1 (25%)
A6- Carrinho (C)	-	+	-	-	1 (25%)
A7- Área externa da canaleta (C)	+	+	-	-	2 (50%)
A8- Ralo (A)	+	+	-	-	2 (50%)
A9- Parede (A)	-	-	-	-	0
A10- Piso (A)	-	+	-	-	1 (25%)
E1- Calha de respingo (E)	-	-	-	-	0
E2- Nória (E)	-	-	-	-	0
E3- Faca (E)	-	-	-	-	0
E4- Caixa branca (E)	+	+	-	-	2 (50%)
E5- Esteira (C)	+	+	-	-	2 (50%)
E6- Tábua de corte (C)	-	-	+	-	1 (25%)
E7- Balança (C)	-	-	-	-	0
E8- Tesoura (C)	+	+	-	-	2 (50%)
E9- Nória (C)	+	+	-	-	2 (50%)
E10- Rosca sem fim (R)	-	-	-	-	0
P1- Pele de frango (1º. lote - E)	-	-	-	-	0
P2- Pele de frango (2º. lote - E)	-	-	-	-	0
P3- Pele de frango (3º. lote - E)	-	-	-	-	0
F1-Carcaça de frango (1º. lote - R)	**	**	++	-	2 (33,3%)
F2- carcaça de frango (2º. lote - R)	**	**	-	+	1 (16,7%)
F3- carcaça de frango (3º. lote - R)	**	**	++	++	4 (66,7%)
Total	7 (17,5%)	12 (30%)	6 (12,2%)	3 (6,1%)	28 (15,7%)

* (E) sala de evisceração; (C) sala de corte; (A) armazenamento e (R) resfriamento.

** Amostras coletadas apenas nas duas últimas amostragens.

Em relação às amostras de superfícies sem contato (Figura 4), observa-se neste estudo que a área interna da canaleta da sala de corte apresentou maior positividade para *L. monocytogenes* (75%), seguida das amostras da área externa da canaleta e do ralo da câmara fria (50%), e dos pisos da sala de evisceração, corte e câmara fria, além da parede e do carrinho da sala de corte (25%). Em contrapartida, amostras da parede da sala de evisceração e da câmara fria não foram positivas em quaisquer amostragens.

O ambiente de uma planta de processamento de alimentos é uma importante fonte de recontaminação do produto final. Alguns patógenos, como é o caso de *L. monocytogenes*, podem fixar-se no ambiente da planta de processamento e encontrar nichos onde podem sobreviver por longos períodos de tempo (Reij, 2004). Segundo

Lawrence e Gilmour (1994), essa recontaminação pode ocorrer também devido à formação de aerossóis produzidos durante a etapa de limpeza/desinfecção, quando elas são realizadas de forma inadequada ou ineficiente.

Figura 4. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em amostras de superfícies sem contato com o produto coletadas em um matadouro de aves localizado no Estado de São Paulo.

Um estudo em plantas processadoras de frango, realizado nos EUA por Berrang *et al.* (2002), demonstrou que *L. monocytogenes* presente no ambiente representa um risco de contaminação, haja vista que este patógeno pode ser transferido para o produto a qualquer momento do processo, quando houver falha na higienização ou acúmulo de produtos na linha de processamento. Chasseignaux *et al.* (2002) analisaram o comportamento de *L. monocytogenes* em superfícies de contato e sem contato, de plantas processadoras de carne de frango e de carne de suínos, durante o processamento e após a higienização, e concluíram que a presença de resíduos orgânicos, pH neutro, baixas temperaturas e alta umidade aumentam a contaminação por *L. monocytogenes*.

Von Laer (2004), ao analisar amostras coletadas em uma planta de processamento de lingüiça mista frescal, localizada na cidade de Pelotas/RS, Brasil, detectou a presença de *L. monocytogenes* em 21% (4) e 20,8% (5) das 19 amostras de ambientes e 24 de equipamentos, respectivamente.

No Brasil, dois matadouros de frango, um com etapa de evisceração manual e outro automática, localizados na região Sudeste, foram objetos de estudo de Chiarini (2007), que constatou que dezoito (16,4%) de 99 amostras de superfícies sem contato da planta com evisceração manual e 27 (27,3%) de 110 de amostras de superfícies sem

contato da planta com evisceração automática apresentaram contaminação por *L. monocytogenes*. As amostras da canaleta (75%), piso (50%), afiador de faca (40%) e carrinho (30%) foram as que apresentaram maior positividade para o microrganismo. Os resultados de Chiarini (2007) corroboram os de Barros *et al.* (2007), no mesmo país, que verificaram ser o piso um importante foco de contaminação para o produto final, uma vez que todas as amostras de piso coletadas apresentaram contaminação por *L. monocytogenes*.

Em relação aos pontos de coleta das amostras de superfícies de contato, nota-se uma maior ocorrência de *L. monocytogenes* (50%) em amostras de caixas brancas (onde as vísceras são depositadas para posterior inspeção) da sala de evisceração (Figura 5), e na esteira, tesouras, tábuas de corte e gancho da nória da sala de corte. Nenhuma das amostras do gancho da nória coletada na sala de evisceração, da calha de respingo da sala de evisceração, de faca e de balança da sala de corte, assim como nenhuma das amostras de rosca sem fim foi positiva para *L. monocytogenes* em quaisquer amostragens (Figura 5).

Figura 5. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em amostras de superfícies de contato com o produto coletadas em um matadouro de aves localizado no Estado de São Paulo.

Outras pesquisas confirmam que a contaminação por *L. monocytogenes* em diversas plantas processadoras de alimentos por *L. monocytogenes* pode ocasionar a contaminação final do produto (Destro *et al.*, 1996; Dauphin *et al.*, 2001; Chasseignaux *et al.*, 2002).

As percentagens de contaminação por *L. monocytogenes*, encontradas por Chasseignaux *et al.* (2002), na França, em amostras de ambiente (55%) e equipamentos

(27%) de duas plantas de processamento de aves foram superiores às encontradas nesta pesquisa, que foram de 30% e 22,5%, respectivamente.

As amostras de nória tanto da sala de evisceração quanto da sala de corte analisadas neste estudo foram coletadas a partir do gancho, superfície a qual se faz a pendura das carcaças e onde há o contato direto com o produto. A contaminação por *L. monocytogenes* nessas superfícies de contato foi nula para amostras da sala de evisceração e de 50% para as amostras da sala de corte (Figura 5). Chiarini (2007) concluiu que a alta incidência do patógeno em ganchos da sala de corte pode estar relacionada com a temperatura mais baixa nesse ambiente, o que propiciaria a sobrevivência e multiplicação do microrganismo.

Neste estudo, as amostras de superfícies sem contato e de contato com o produto oriundas da sala de corte apresentaram maior positividade para *L. monocytogenes* (37,5%) do que as da sala de evisceração (7,5%). Essa relação foi também verificada por Chiarini (2007) em um matadouro de aves com evisceração manual, que constatou a presença de *L. monocytogenes* em 9,4% das amostras coletadas na sala de evisceração e 20,2% das amostras coletadas na sala de corte. Tal fato não foi observado pelo mesmo autor, quando analisou amostras em um matadouro de aves com evisceração automática. Neste caso, as amostras de superfícies sem contato e de contato com o produto da sala de evisceração e de corte apresentaram percentuais muito próximos de 20,6% e 20,2%, respectivamente.

As amostras provenientes de facas da sala de evisceração e as provenientes de tábuas de corte da sala de corte apresentaram contaminação por *L. monocytogenes* de 0% e 25%, respectivamente (Figura 5). De acordo com as informações obtidas no matadouro de aves analisado nesta pesquisa, as facas e tábuas de corte são trocadas a cada duas horas de trabalho, mas um fato importante notado foi que tanto as tábuas de corte quanto o cabo das facas amostradas apresentavam superfície rugosa, o que pode ser um risco para a formação de biofilme caso a higienização não seja efetiva.

Neste estudo, as amostras de carcaça de frango apresentaram maior incidência de *L. monocytogenes* (39%) em relação ao total de amostras analisadas por ponto de coleta, seguidas pelas amostras de superfícies sem contato (30%) e pelas amostras de superfícies de contato (22,5%).

Mead (2004), após realizar uma revisão sobre a qualidade microbiológica da carne de aves, apontou contaminação por *L. monocytogenes* em mais de 50% das carcaças processadas analisadas. Segundo o autor, a carne de frango crua é uma das principais fontes de contaminação cruzada em uma cozinha doméstica, haja vista a grande

possibilidade desse patógeno em contaminar alimentos cozidos ou alimentos prontos para o consumo, como saladas, quando as boas práticas de higiene não são seguidas corretamente.

A contaminação por *L. monocytogenes* de carcaça de frango, tanto congelada quanto fresca, tem recebido atenção por parte de alguns pesquisadores (Pini e Gilbert, 1988; Hudson e Mead, 1989; Nierop *et al.*, 2005; Barbalho *et al.*, 2005), entretanto, a frequência de contaminação encontrada tem sido muito variável.

Pini e Gilbert (1988), na Inglaterra, após analisarem 100 amostras de carcaça de frango congelada e fresca, verificaram que 54% e 66% das amostras, respectivamente, apresentaram contaminação por *L. monocytogenes*. Porcentagem próxima a estas foi verificada por Hudson e Mead (1989) que detectaram a ocorrência de *Listeria* sp. em 50% das amostras de carcaças de frango prontas para serem embaladas e concluíram que a contaminação cruzada ocorreu através dos equipamentos.

Na Europa, dois trabalhos relatam alta incidência de *L. monocytogenes* em carcaças de frango. Na Espanha, Capita *et al.* (2001) verificaram que 95% das amostras examinadas estavam contaminadas por *Listeria* sp., sendo 32% delas por *L. monocytogenes*. No ano seguinte, em Portugal, Antunes *et al.* (2002) relataram que 100% das amostras apresentaram contaminação por *Listeria* sp., com 41% apresentando *L. monocytogenes*.

Nierop *et al.* (2005) verificaram que das 99 amostras de carcaça de frango fresca e congelada obtidas em matadouros, supermercados e outros pontos de venda, localizados na cidade de Gauteng, África do Sul, dezenove (19,2%) apresentavam contaminação por *L. monocytogenes*, sendo doze (18,2%) oriundas de carcaças de frango frescas e sete (21,2%) de carcaças de frango congeladas.

No Brasil, em uma planta de processamento de frango, situada no Estado da Bahia, Barbalho *et al.* (2005) detectaram 33 isolados de *Listeria* sp. oriundos de carcaça de frango em diversas etapas do processamento, sendo 28 (90,3%) identificados como *L. innocua*, três (9,7%) como *L. monocytogenes* e dois (6,5%) *L. grayi*.

Considerando as 178 amostras analisadas nesta pesquisa, 94 (52,8%) foram positivas para o gênero *Listeria* e 84 (47,2%) não apresentaram contaminação por microrganismos desse gênero.

Dentre as 94 amostras positivas para o gênero *Listeria*, três (3,2%) apresentaram contaminação apenas por *L. monocytogenes*, 57 (60,6%) apenas por *L. innocua* e 34 (36,2%) por mais de uma espécie do gênero.

Entre as 34 amostras positivas para mais de uma espécie de *Listeria* sp., 24 (70,6%) apresentaram contaminação por *L. monocytogenes* e *L. innocua*, nove (26,5%) por *L. innocua* e *L. welshimeri*, e uma (2,9%) por *L. innocua*, *L. monocytogenes* e *L. grayi*.

Através deste estudo, de 739 isolados testados bioquimicamente, 69 (9,3%) foram confirmados como *L. monocytogenes*, 632 (85,5%) como *L. innocua*, vinte e três (3,1%) como *L. welshimeri* e três (0,4%) como *L. grayi*. Doze (1,7%) não foram identificados como gênero *Listeria*. Na Tabela 5 tem-se a distribuição de amostras positivas para o gênero *Listeria* por grupo de amostras.

Conforme a Tabela 5 é possível verificar a alta incidência de *L. innocua* em todas as amostras analisadas neste estudo o que concorda com diversos outros autores para diferentes tipos de amostras (Farber *et al.*, 1989; Okutami *et al.*, 2004; Yücel *et al.*, 2005).

Tabela 5. Ocorrência de *Listeria* sp. em amostras de superfícies sem contato (A), superfícies de contato (E), pele de pescoço de frango (P) e de carcaça de frango (F) coletadas em um matadouro de aves situado no interior do Estado de São Paulo, no período de julho de 2005 a maio de 2006.

Amostras (Área)*	Nº. de amostras analisadas	Lm (%)	Li (%)	Lw (%)	Lg (%)
A1	4	1 (25%)	3 (75%)	1 (25%)	0
A2	4	0	2 (50%)	1 (25%)	0
A3	4	3 (75%)	4 (100%)	1 (25%)	0
A4	4	1 (25%)	4 (100%)	2 (50%)	0
A5	4	1 (25%)	3 (75%)	1 (25%)	0
A6	4	1 (25%)	4 (100%)	0	0
A7	4	2 (50%)	4 (100%)	0	0
A8	4	2 (50%)	3 (75%)	0	0
A9	4	0	2 (50%)	0	0
A10	4	1 (25%)	4 (100%)	1 (25%)	0
E1	4	0	2 (50%)	0	0
E2	4	0	2 (50%)	0	0
E3	4	0	1 (25%)	1 (25%)	0
E4	4	2 (50%)	4 (100%)	0	1 (25%)
E5	4	2 (50%)	4 (100%)	0	0
E6	4	1 (25%)	4 (100%)	0	0
E7	4	0	4 (100%)	0	0
E8	4	2 (50%)	3 (75%)	0	0
E9	4	2 (50%)	3 (75%)	1 (25%)	0
E10	4	0	3 (75%)	0	0
P1	28	0	4 (14,3%)	0	0
P2	28	0	5 (17,8%)	0	0
P3	24	0	2 (8,3%)	0	0
F1	6	2 (33,3%)	6 (100%)	0	0
F2	6	1 (16,7%)	6 (100%)	0	0
F3	6	4 (66,7%)	5 (83,3%)	0	0
Total	178	28 (15,7%)	91 (51,1%)	9 (5%)	1 (0,6%)

* Consultar Tabela 4 para identificação das amostras.

Uma vez que *L. innocua* foi a espécie prevalente em todos os tipos de amostras analisadas, pode-se afirmar que ela se encontra mais adaptada ao ambiente do matadouro. Outra hipótese a ser levada em consideração é que *L. innocua* pode ter se multiplicado em velocidade maior, sobrepondo a taxa de crescimento de *L. monocytogenes* no meio seletivo utilizado. Esse comportamento foi observado por Bruhn *et al.* (2005) ao avaliarem o caldo de enriquecimento formulação UVM, caldo este também utilizado no presente estudo (UVM modificado).

A rápida multiplicação de *L. innocua* em caldos de enriquecimento seletivo designados para o isolamento de *L. monocytogenes* resulta no aumento do risco de resultados falso negativos. Segundo um modelamento preditivo desenvolvido por Cornu *et al.* (2002), essa rápida sobreposição da multiplicação de *L. innocua* sobre *L. monocytogenes* deve-se a dois fenômenos cepa-dependente: a primeira é a rápida adaptação de *L. innocua* quando inoculada no caldo seletivo e a segunda consiste na inibição de *L. monocytogenes* por *L. innocua* como resultado da produção de compostos inibitórios (bacteriófagos).

Das 80 amostras de pele de frango analisadas, onze (13,8%) apresentaram contaminação por *L. innocua*, resultado inferior ao obtido por diversos pesquisadores (Skovgaard e Morgen, 1988; Capita *et al.*, 2001; Antunes *et al.*, 2002; Barbalho *et al.*, 2005; Chiarini, 2007).

Na Dinamarca, duas plantas automatizadas de processamento de aves, localizadas nas cidades de Jutland e Seeland, foram objetos de estudo para Skovgaard e Morgen (1988) que, após analisar em dezessete amostras de pele de pescoço de frango, verificaram que 16 (94%) delas apresentaram contaminação por *Listeria* sp, sendo todas positivas para *L. innocua* e 50% para *L. monocytogenes*.

Capita *et al.* (2001), na cidade de León na Espanha, detectaram a contaminação por *Listeria* sp. em 95% de amostras de pele de frango oriundas de 100 carcaças evisceradas e resfriadas, adquiridas em diversos pontos de comercialização. Dessas, 15% apresentaram contaminação *L. monocytogenes*, 17% contaminação por *L. monocytogenes* e demais espécies de *Listeria* sp. e 63% apresentaram contaminação por mais de uma espécie do gênero.

Antunes *et al.* (2002), em Portugal, trabalharam com cortes de frango e também detectaram mais de uma espécie de *Listeria* sp. em diversas amostras. Foram detectadas 63 amostras (100%) positivas para *Listeria* sp., sendo 26 (41%) para *L. monocytogenes*. Dentre as demais espécies, *L. innocua* (32 isolados) foi a espécie predominante, seguida

por *L. monocytogenes* (26 isolados), *L. welshimeri* (8 isolados) e *L. seeligeri* (1 isolado). Três amostras apresentaram contaminação por duas ou mais espécies de *Listeria*, sendo duas delas contaminadas por *L. monocytogenes* e *L. innocua*, e uma amostra contaminada por *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. welshimeri*.

No Brasil, pesquisa realizada em amostras de carcaça de frango (Chiarini, 2007), no Estado de São Paulo, revelou *L. innocua* em 76% das amostras.

A maior frequência de isolamento de *L. innocua* em todos os tipos de amostras coletadas deve ser interpretada com cuidado. Não só porque a presença desta espécie de *Listeria* pode estar relacionada a uma possível presença de *L. monocytogenes*, mas também porque *L. innocua* já esteve envolvida em caso clínico (Perrin *et al.*, 2003).

A contaminação do ambiente por outras espécies do gênero *Listeria*, que não *L. monocytogenes*, indica que esse ambiente possui condições que podem propiciar o desenvolvimento do patógeno. De acordo com Graves *et al.* (2007), isso ocorre devido à alta homologia do DNA apresentada entre as espécies do gênero, o que as tornam muito semelhantes fenotipicamente, além de apresentarem a mesma ecologia (Sauders e Wiedmann, 2007).

4.2. SOROTIPIFICAÇÃO

Do total de 69 isolados identificados como *L. monocytogenes*, 41 foram selecionados para sorotipificação molecular. Duas cepas foram escolhidas de cada meio seletivo (MOX e Palcam) para cada amostra positiva para *L. monocytogenes*. As exceções foram as amostras provenientes do piso da sala de evisceração (2ª amostragem), da área interna da canaleta da sala de corte (1ª e 3ª amostragem), do piso da sala de corte (2ª amostragem), da área externa da canaleta (2ª amostragem), do ralo da câmara fria (1ª e 2ª amostragem), da caixa branca da sala de evisceração (1ª e 2ª amostragem), da esteira da sala de corte (2ª amostragem), da tábua de corte da sala de corte (3ª amostragem) e da tesoura da sala de corte (2ª amostragem), das quais somente uma cepa por amostra foi utilizada (Tabela 6).

Devido à inexistência, no Brasil, dos soros comerciais (Denka-Seiken) que fornecem resultados mais específicos, buscou-se outra técnica acessível e capaz de mapear os tipos sorológicos dos isolados selecionados. Assim, optou-se pela técnica de sorotipificação por multiplex PCR desenvolvida por Doumith *et al.* (2004), uma vez que Sakate (2005) e Chiarini *et al.* (2006) comprovaram a sua eficácia. Além disso, é uma

técnica sensível, rápida e de baixo custo quando já existe no laboratório o equipamento para a realização da PCR.

De acordo com a sorotipificação molecular é possível classificar as cepas de *L. monocytogenes* em quatro grupos. São considerados sorotipos 1/2a ou 3a (grupo 1) cepas de *L. monocytogenes* que apresentam um fragmento de 370pb e outro de 691pb, sorotipos 1/2c ou 3c (grupo 2) cepas que apresentam três fragmento de 370, 691 e 906pb cada, sorotipos 1/2b, 3b ou 7 (grupo 3) cepas que apresentam dois fragmentos de 370 e 471pb cada e sorotipos 4b, 4d ou 4e (grupo 4) cepas que apresentam três fragmentos com tamanhos de 370, 471 e 597pb cada (Tabela 7 e Figura 6).

Tabela 6. Identificação da origem dos 41 isolados de *Listeria monocytogenes*, oriundos de matadouro de aves situado no Estado de São Paulo, selecionados para serem submetidos à sorotipificação molecular.

Amostras (Área)*	Amostragem			
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
A1		75		
A3	28	78; 80; 83	237	
A4		84		
A5		88; 89		
A6		93; 94		
A7	38; 39	96		
A8	43	99		
A10		103; 104; 105		
E4	58	114		
E5	59; 60	119		
E6			287	
E8	68; 69	128		
E9	72; 73; 74	130; 131		
F1			331; 337	
F2				488; 491
F3			359; 366	495; 500

* Consultar Tabela 4 para a origem das amostras.

Do total de 41 isolados de *L. monocytogenes* submetidos à sorotipificação, vinte e cinco (61%) pertencem ao grupo 4, onze (26,8%) pertencem ao grupo 1 e cinco (12,2%) pertencem ao grupo 3. Não foi detectada *L. monocytogenes* pertencente ao grupo 2 (1/2c ou 3c).

Tabela 7. Identificação dos grupos sorológicos para *Listeria monocytogenes* baseada no peso molecular das bandas obtidas por multiplex PCR, segundo Doumith *et al.* (2004).

Tamanho dos Fragmentos (pb)					Grupo
370	471	597	691	906	
+	-	-	+	-	1 (1/2a ou 3a)
+	-	-	+	+	2 (1/2c ou 3c)
+	+	-	-	-	3 (1/2b, 3b ou 7)
+	+	+	-	-	4 (4b, 4d ou 4e)
+	-	-	-	-	<i>Listeria</i> sp.

Figura 6. Gel de agarose com fragmentos de DNA gerados por multiplex PCR com as cepas de *Listeria monocytogenes* sorologicamente referenciadas e demais espécies de *Listeria*. Linha 1 a 12, *Listeria monocytogenes* sorotipo 1/2a, 1/2b, 1/2c, 4b, 3a, 3b, 3c, 4d, 4e, 7, 4a e 4c, respectivamente; linha 13, *Listeria innocua* sorotipo 6b; linha 14, *Listeria welshimeri* sorotipo 4c; linha 15, *Listeria ivanovii* sorotipo 5; linha 16, *Listeria seeligeri* sorotipo 1/2b; linha M, marcador de peso molecular. Os genes correspondentes aos produtos de amplificação gerados estão indicados à direita. Os tamanhos dos fragmentos estão indicados à esquerda. **Fonte:** Doumith *et al.*, 2004.

Das vinte e cinco cepas pertencentes ao grupo 4 (4b, 4d ou 4e), dezessete (41,5%) apresentaram um fragmento inesperado na sorotipificação molecular, tendo-se obtido quatro fragmentos, 370pb, 471pb, 597pb e 691pb, sendo os três primeiros característicos do grupo 4 e o de 691pb característico do grupo 1 (Figura 7). Apesar dos quatro fragmentos obtidos terem sido descritos por Doumith *et al.* (2004), os pesquisadores não haviam relatado a existência de cepas com quatro fragmentos, sendo três o maior número de fragmentos esperados (grupo 2 e grupo 4) (Figura 6). Os resultados obtidos para essas 17 cepas são semelhantes aos de Chiarini (2007) que os relata em 29 cepas de *L. monocytogenes*. Ao realizar a sorotipificação convencional, as 29 cepas mostraram ser do sorotipo 4b.

Figura 7. Gel de agarose com fragmentos de DNA gerados por multiplex PCR com cepas de *Listeria monocytogenes*. Linhas 1 e 9, marcador de peso molecular (100pb DNA Ladder, Gibco); linhas 2, 4 e 6, cepas do grupo 4 que apresentaram um fragmento extra de 691pb (cepas 68, 74 e 500); linha 3, grupo 3 (cepa 39); linhas 5 e 7, grupo 1 (cepas 75 e controle positivo, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644) e linha 8, controle negativo (branco). Consultar a Tabela 7 para a origem das cepas.

Em relação às cepas pertencentes ao grupo 1, observa-se também um predomínio em amostras de superfícies sem contato (sete cepas), seguido de amostras de carcaça de frango (três cepas) e uma cepa de superfície de contato com o produto. As cepas de *L. monocytogenes* pertencentes a esse grupo foram isoladas do piso da sala de evisceração, da área interna da canaleta e da parede da sala de corte; de carcaças de frango; e da caixa branca da sala de evisceração, respectivamente (Tabela 8).

Em contrapartida, das cepas pertencentes ao grupo 3, três foram isoladas de amostras de superfícies de contato e duas de superfícies sem contato com o produto. Essas cepas de *L. monocytogenes* foram isoladas da área externa da canaleta e do ralo da sala de corte, da caixa branca da sala de evisceração, da tesoura e do gancho da nória da sala de corte (Tabela 8).

As cepas do grupo 4 foram isoladas de superfícies sem contato (dez cepas), de superfícies de contato (dez cepas) e de carcaça de frango (cinco cepas). As cepas de superfícies sem contato foram isoladas da área interna e externa da canaleta, piso e carrinho, e as de superfícies de contato foram a esteira, tábuas de corte, tesoura e ganchos da nória da sala de corte e do ralo e piso da câmara fria, respectivamente (Tabela 8).

No Brasil, o predomínio de cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 4b, pertencente ao grupo 4, em produtos cárneos, incluindo matadouros de aves e seus produtos, também foi verificado por alguns pesquisadores (Hofer *et al.*, 2000; Chiarini, 2007)

Pesquisa realizada por Hofer *et al.* (2000) detectou uma maior prevalência de *L. monocytogenes* sorotipo 4b (44,9%), seguido do 1/2b (32,7%), 1/2a (12,2%), 1/2c (8,9%), 4c (0,6%), 4e e 3c (0,3% cada) em amostras de carcaça de frango e pescado, provenientes de diversas fontes no Brasil, no período entre 1971 e 1997.

Em um matadouro de aves localizado no Estado de São Paulo, Chiarini (2007) constatou que 77 (61,6%) de 125 cepas de *L. monocytogenes*, sorotipificadas pela mesma técnica de multiplex PCR utilizada neste estudo, pertenceram ao grupo 4, vinte e quatro (19,2%) ao grupo 1, dezenove (15,2%) ao grupo 3 e cinco (4%) ao grupo 2.

Tabela 8. Distribuição das 41 cepas de *Listeria monocytogenes* sorotipificadas pela técnica de multiplex PCR por tipo de amostras considerando todas as amostragens.

Grupo sorológico*	Ponto de coleta / Área	Identificação da cepa	Nº de cepas (%)
Grupo 1	Piso / Evisceração	75	11 (26,8%)
	Área interna da canaleta / Corte	28; 78; 80; 83	
	Parede / Corte	88; 89	
	Caixa branca / Evisceração	114	
	Carcaça de frango (2º lote) / Resfriamento	488; 491	
	Carcaça de frango (3º lote) / Resfriamento	366	
Grupo 3	Área externa da canaleta / Corte	39	5 (12,2%)
	Ralo / Corte	43	
	Caixa branca / Evisceração	58	
	Tesoura / Corte	128	
	Nória / Corte	72	
Grupo 4	Carrinho / Corte	93	8 (19,5%)
	Área externa da canaleta / Corte	96	
	Piso / Armazenamento	103	
	Esteira / Corte	59	
	Tesoura / Corte	69	
	Nória / Corte	73	
	Carcaça de frango (3º lote) / Resfriamento	359; 495	
Grupo 4**	Área interna da canaleta / Corte	237	17 (41,5%)
	Piso / Corte	84	
	Carrinho / Corte	94	
	Área externa da canaleta / Corte	38	
	Ralo / Armazenamento	99	
	Piso / Armazenamento	104; 105	
	Esteira / Corte	60; 119	
	Tábua de corte / Corte	287	
	Tesoura / Corte	68	
	Nória / Corte	74; 130; 131	
	Carcaça de frango (1º lote) / Resfriamento	331; 337	
	Carcaça de frango (3º lote) / Resfriamento	500	

* Consultar Tabela 7 para identificação dos sorotipos de cada grupo.

**Cepas identificadas como pertencentes ao grupo 4 e que apresentaram o fragmento de 691pb.

Ao contrário do encontrado no Brasil, estudos envolvendo produtos de aves, em outros países, constata-se que os sorotipos mais freqüentemente encontrados são 1/2a e 1/2b (Faber *et al.*, 1989; Guerra *et al.*, 2001; López *et al.*, 2007a).

Farber *et al.* (1989), no Canadá, verificaram que sete (77,8%) dos nove isolados de *L. monocytogenes*, provenientes de coxas de frango adquiridos no comércio local de Ottawa, pertenciam ao sorotipo 1, um (11,1%) ao sorotipo 4 e um (11,1%) não tipável.

Em Portugal, Guerra *et al.* (2001) verificaram que dos onze isolados de *L. monocytogenes*, oriundos de amostras de carcaça de frango coletadas no comércio local da cidade de Lisboa, 7 (63,6%) pertenciam ao sorotipo 1/2a, 2 (18,2%) ao sorotipo 1/2b e 2 (18,2%) ao sorotipo 3b, sendo que dois diferentes sorotipos de *L. monocytogenes* (3b e 1/2b) foram detectados em uma mesma amostra de frango.

Por outro lado, López *et al.* (2007a), na Espanha, constataram que 68,8% dos 77 isolados de *L. monocytogenes* provenientes de amostras de diversos produtos final de uma planta de processamento de aves pertenciam ao sorotipo 1/2a, 15,6% ao sorotipo 4b, 10,4% ao sorotipo 1/2b e 5,2% ao sorotipo 1/2c.

Apesar de se ter detectado *L. monocytogenes* sorotipo 4b em carcaças de frango resfriadas, esta contaminação não indica risco direto à saúde do consumidor, uma vez que estes produtos ainda serão tratados termicamente. Entretanto, a manipulação destes alimentos no ambiente domiciliar deve ser adequada, obedecendo às boas práticas de higiene, de forma a reduzir o risco de contaminação cruzada em refrigeradores e alimentos prontos para o consumo (Jackson *et al.*, 2007).

4.3. Identificação dos perfis de macro-restrição

As mesmas 41 cepas de *L. monocytogenes*, previamente identificadas sorologicamente (Tabela 6), foram submetidas à digestão por enzimas de restrição Apal e Ascl, seguida de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).

Através da comparação visual dos padrões de macrorestrição gerados pela enzima Apal foram obtidos seis perfis genéticos (A a F) que apresentaram um número de bandas que variou de 12 a 20, com peso molecular entre 29kb e 1135kb (Figura 8).

O pulsotipo C foi o perfil que agrupou o maior número de cepas de *L. monocytogenes* (17), seguido pelos pulsotipos A e D (7 de cada), pulsotipo F (5) e pelo pulsotipo B (4). A cepa 39 apresentou perfil único (pulsotipo E) quando digerida pela enzima Apal (Tabela 9).

Figura 8. Gel apresentando os 6 pulsotipos obtidos na macrorestrição do DNA de *Listeria monocytogenes* com a enzima Apal através da PFGE. Linhas A a F: *L. monocytogenes* pulsotipos A a F, respectivamente. PM: padrão de peso molecular - *Salmonella* sorovar Braenderup H9812, digerida com a enzima Xba.

Tabela 9. Distribuição das 41 cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de um matadouro de aves no Estado de São Paulo, conforme os 6 pulsotipos (A – F) obtidos pela restrição empregando a enzima Apal.

Pulsotipo	Cepa*	Número de cepas (%)
A	94; 96; 103; 131; 331; 359; 495	7 (17,1%)
B	38; 43; 58; 60	4 (9,7%)
C	59; 68; 69; 72; 73; 74; 84; 93; 104; 105; 119; 128; 130; 237; 287; 337; 500	17 (41,5%)
D	28; 78; 80; 83; 88; 89; 99	7 (17,1%)
E	39	1 (2,4%)
F	75; 114; 366; 488; 491	5 (12,2%)

* Para consultar a origem das cepas e seus respectivos sorotipos, ver Tabela 6.

Com a enzima Ascl foram obtidos nove perfis genéticos (1 a 9) que apresentaram de 5 a 11 fragmentos, com peso molecular variando entre 34,95kb e 1135kb (Figura 9).

Figura 9. Gel apresentando os 9 pulsotipos obtidos na macrorestrição do DNA de *Listeria monocytogenes* com a enzima *Ascl* através da PFGE. Linhas 1 a 9: *L. monocytogenes* pulsotipo 1 a 9, respectivamente. PM: padrão de peso molecular - *Salmonella* sorovar Braenderup, cepa H9812, digerida com a enzima *Xba*I.

O pulsotipo 1 foi o perfil que agrupou maior número de cepas de *L. monocytogenes* (15), seguido pelos pulsotipo 3 (7), pulsotipo 6 (6), pulsotipo 8 (5), pulsotipo 4 (3) e pelo pulsotipo 2 (2). As cepas 128, 39 e 99 apresentaram perfis únicos (pulsotipo 5, 7 e 9, respectivamente) quando digeridas com a enzima *Ascl* (Tabela 10).

Tabela 10. Distribuição das 41 cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de um matadouro de aves no Estado de São Paulo, conforme os 9 pulsotipos (1 – 9) obtidos pela restrição empregando a enzima *Ascl*.

Pulsotipo	Cepa*	Número de cepas (%)
1	38; 68; 69; 72; 73; 74; 84; 93; 96; 119; 130; 131; 237; 337; 500	15 (36,6%)
2	43; 58	2 (5%)
3	59; 60; 94; 287; 331; 359; 495	7 (17,1%)
4	103; 104; 105	3 (7,3%)
5	128	1 (2,4%)
6	28; 78; 80; 83; 88; 89	6 (14,6%)
7	39	1 (2,4%)
8	75; 114; 366; 488; 491	5 (12,2%)
9	99	1 (2,4%)

* Para informação da origem das cepas e seus respectivos sorotipos, ver Tabela 6.

Fato interessante pode ser observado com a cepa 39 que apresentou pulsotipo único tanto para Ascl quanto para Apal (7 e E, respectivamente).

A combinação entre os pulsotipos obtidos com as duas enzimas permitiu a obtenção de 14 perfis combinados e geneticamente diferentes **P1 - P14**, sendo que os perfis **P3**, **P2** e **P1** agruparam o maior número de cepas: doze (29,3%), seis (14,6%) e cinco (12,2%), respectivamente (Tabela 11).

O perfil **P1** foi isolado na segunda, terceira e quarta amostragens, com a maior incidência de *L. monocytogenes* tendo ocorrido na segunda amostragem, nas amostras de piso e caixa branca da sala de evisceração. Na terceira e quarta amostragens, o patógeno só foi isolado das amostras de carcaça de frango (Tabela 12).

O perfil combinado **P2** esteve presente nas duas primeiras amostragens e *L. monocytogenes* foi isolado de amostras de superfícies sem contato com o produto oriundas da sala de corte - área interna da canaleta (primeira e segunda amostragens) e parede (segunda amostragem) (Tabela 12).

Isolou-se o perfil genético **P3** nas amostras de superfícies sem contato – área interna da canaleta e piso da sala de corte, nas de superfícies de contato – carrinho, esteira, tesoura e nória da sala de corte, e nas de carcaça de frango, em todas as amostragens, como pode ser observado na Tabela 12.

O perfil combinado **P4** correspondeu à cepa de *L. monocytogenes* isolada do carrinho da sala de corte na segunda amostragem e às cepas isoladas de carcaça de frango coletadas na terceira e quarta amostragens (Tabela 12).

O perfil **P5** esteve presente apenas na amostra da área externa da canaleta da sala de corte na primeira amostragem (Tabela 12).

O perfil genético **P12** foi isolado na esteira (na primeira amostragem) e na tábua de corte (terceira amostragem), ambas oriundas da sala de corte (Tabela 12).

Pela Tabela 12, verifica-se também que os perfis **P5**, **P6**, **P7**, **P8**, **P9**, **P10**, **P11**, **P13** e **P14** são exemplos da presença de cepas transitórias, haja vista que estes perfis foram detectados em um ou mais pontos de coleta, mas apenas em uma amostragem.

Tabela 11. Distribuição das 41 cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas em um matadouro de aves, conforme os 14 perfis combinados de PFGE obtidos com as enzimas Ascl e Apal, respectivamente.

Perfil Combinado	Perfil Ascl	Perfil Apal	Cepa*	Sorotipo (Grupo)**
P1	8	F	75	1
			114	3
			488; 491	3
			366	1
P2	6	D	28; 78; 80; 83	1
			88; 89	1
P3	1	C	237	4
			84	4
			93	4
			119	4
			68; 69	4
			72	3
			73; 74; 130	4
			337	4
			500	4
P4	3	A	94	4
			331	4
			359; 495	4
P5	1	B	38	4
P6	7	E	39	3
P7	1	A	96	4
			131	4
P8	2	B	43	3
			58	3
P9	9	D	99	4
P10	4	A	103	4
P11	4	C	104; 105	4
P12	3	C	59	4
			287	4
P13	3	B	60	4
P14	5	C	128	3

* Consultar Tabela 6 para identificação da origem das cepas e suas respectivas amostragens.

** Ver Tabela 7 para identificação dos grupos.

Tabela 12. Distribuição dos 14 perfis compostos obtidos pela análise composta dos pulsotipos, após restrição com as enzimas *Ascl* e *Apal*, obtidos por PFGE, das 41 cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas em um matadouro de aves.

Etapas do Processamento	Perfis Combinados (P*)			
	Amostragem			
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
Evisceração				
Piso		1		
Parede				
Calha				
Nória				
Faca				
Caixa branca	8	1		
Resfriamento				
Rosca sem fim				
Carcaça de frango (1º lote)			4; 3	
Carcaça de Frango (2º lote)				1
Carcaça de frango (3º lote)			1; 4	3; 4
Sala de Corte				
Área interna da canaleta	2	2; 3	3	
Piso		3		
Parede		2		
Carrinho		3; 4		
Área externa da canaleta	5; 6	7		
Esteira	12; 13	3		
Tábua de corte			12	
Balança				
Tesoura	3	14		
Nória	3	3; 7		
Armazenamento				
Ralo da câmara fria	8	9		
Parede da câmara fria				
Piso da câmara fria		10; 11		

Cores iguais, perfis combinados iguais.

* Consultar Tabela 11 para identificação dos perfis combinados.

A ocorrência do isolamento repetido de cepas de *L. monocytogenes* pertencente ao mesmo perfil genético sugere que estas cepas podem estar colonizando uma determinada superfície do matadouro estudado e que sua disseminação pode estar ocorrendo durante

o processamento e/ou higienização.

Baseando-se na análise dos resultados obtidos a partir da Tabela 12, pode-se considerar que a disseminação de *L. monocytogenes* no matadouro de aves ocorreu, possivelmente, através de contaminação cruzada ao longo das etapas de processamento, principalmente na sala de corte.

Os perfis **P1**, **P3** e **P4** foram detectados em amostras de superfícies sem contato com o produto e em amostras de carcaça. Os perfis **P1** e **P3** estiveram presentes, também, em amostras de superfícies com contato com o produto, o que pode significar uma possível rota de contaminação (Tabela 12).

A sala de corte foi a etapa do processamento que apresentou maior agrupamento de perfis combinados – nove: **P2**, **P3**, **P4**, **P5**, **P6**, **P7**, **P12**, **P13** e **P14** – e o maior número de cepas de *L. monocytogenes* – vinte e cinco - sendo treze oriundas de amostras de superfícies sem contato e doze de superfícies de contato com o produto. Já na etapa de armazenamento foram agrupados quatro perfis combinados **P8**, **P9**, **P10** e **P11**, totalizando cinco cepas de *L. monocytogenes* oriundas somente de superfícies sem contato com o produto (Tabela 12).

Na etapa de resfriamento foram agrupadas, em três perfis combinados **P1**, **P4** e **P5**, oito cepas de *L. monocytogenes* todas oriundas de amostras de carcaça de frango. Na sala de evisceração foram detectadas apenas três cepas de *L. monocytogenes* oriundas de uma amostra de superfície sem contato e outra de superfície de contato com o produto que originaram os perfis combinados **P1** e **P8** (Tabela 12).

Apesar de *L. monocytogenes* estar amplamente disseminada nas áreas estudadas no matadouro, não há como definir a origem da contaminação do patógeno ao longo do matadouro, pois neste estudo não foram analisados todos os focos de contaminação que podem contribuir para a entrada e disseminação do microrganismo, tais como, as aves vivas, as áreas consideradas sujas (classificação, sangria e depenagem), manipulador e a água utilizada neste local.

Quando analisada, através da Tabela 12, a diversidade genética das 41 cepas de *L. monocytogenes* em relação ao grupo de amostras coletadas foi possível observar que as amostras de superfícies sem contato com o produto apresentaram maior diversidade genética seguida das de superfícies de contato e das de carcaça de frango, o que pode significar que cepas isoladas de amostras ambientais, como piso, parede, ralo e canaleta, por exemplo, possuem características especiais que lhes permitem sobreviver ou se tornar residentes por mais tempo nesses locais. Uma hipótese para a ocorrência desse

fato é a dificuldade de se higienizar estes locais uma vez que apresentam muitas ranhuras que podem abrigar diversos microrganismos, entre eles *L. monocytogenes*.

As dezenove cepas de *L. monocytogenes* isoladas de amostras de superfícies sem contato com o produto foram agrupadas em 11 perfis combinados **P1 – P11**, sendo treze oriundas da sala de corte, cinco da área de armazenamento e uma oriunda da sala de evisceração. Seis destes **P5, P6, P7, P9, P 10 e P11** apresentam cepas de *L. monocytogenes* transitórias (Tabela 12).

As amostras de superfícies de contato com o produto agruparam seis perfis combinados **P1, P3, P7, P12, P13 e P14**, com um total de quatorze cepas de *L. monocytogenes*, sendo doze provenientes da sala de corte e duas provenientes da sala de evisceração. Os perfis combinados **P13 e P14**, pertencentes a este grupo de amostra, apresentam cepas de *L. monocytogenes* transitórias (Tabela 12).

Oito das 21 cepas de *L. monocytogenes* pertencentes aos perfis **P1, P3 e P4** foram isoladas de amostras de carcaças de frango na etapa de resfriamento. As demais cepas pertencentes ao **P1 e P3** foram isoladas de outras amostras nas salas de evisceração e de corte (Tabela 12).

Ao se comparar os perfis combinados obtidos nesta pesquisa com os encontrados por Chiarini (2007) na mesma empresa, verifica-se não haver similaridade entre eles. Porém, comparando-se os perfis para cada enzima, separadamente, observa-se que a restrição com a enzima Ascl apresentou cepas com perfis iguais, mesmo após 3 anos daquele estudo, caracterizando-as como persistentes. Estas cepas pertencem a seis perfis Ascl distintos **1, 3, 4, 7, 8 e 9**, sendo que dois desses apresentaram cepas de *L. monocytogenes* isoladas dos mesmos locais (Tabela 13) – piso da sala de corte (perfil **1**) e piso da sala de evisceração (perfil **8**) e os demais perfis apresentaram cepas amplamente disseminadas pelo ambiente, equipamentos e produtos acabados (Tabela 13). Para a restrição com a enzima Apal, no entanto, não se observou a presença de perfis semelhantes.

Lundén (2004) também relata a ampla disseminação de cepas persistentes de *L. monocytogenes* em plantas de processamento, contaminando até mesmo duas ou mais linhas de processamento.

Tabela 13. Perfis do PFGE com enzima Ascl de cepas persistentes de *Listeria monocytogenes*, isoladas em 2003 – 2004 (Chiarini, 2007) e 2005-2006, em diferentes pontos de coleta em um matadouro localizado no Estado de São Paulo.

Perfil Ascl*	Origem das cepas**	
	2003-2004	2005-2006
1	Corte resfriado de frango (C), corte congelado de frango (CO), piso (C), manipulador (CMS), utensílio de coleta (CMS), luvas de aço (C) e frango resfriado (PC)	Piso (C), área externa da canaleta (C), tesouras (C), ganchos (C), carrinho (C), esteira (C), área interna da canaleta (C), carcaça de frango (R)
3	Carrinho (CO), monobloco branco (EM) e manipulador (C)	Esteira (C), tábua (C), carrinho (C) e carcaça de frango (PC)
4	Carrinho (CO)	Piso (A)
7	Carne mecanicamente separada (CMS), Frango após o chuveiro (PC) e dorso (CMS)	Área externa da canaleta (C)
8	Tábua (C), esteira (CMS), faca (C), ganchos (C), afiador (C), piso (E), manipulador (CMS), piso (CMS), carne mecanicamente separada (CMS), corte resfriado de frango (C), utensílio de coleta (CMS), piso (E), raspador (C), saída de carne mecanicamente separada (CMS), ralo (C), entrada do dorso (CMS), máquina de cortes (C) e carrinho (CO)	Piso (E), caixa branca (E) e carcaça de frango (R)
9	Faca (C), tábua (C), esteira transportadora (C), carrinho (CO), esteira transporte de dorso (CMS) e luvas de aço (C),	Ralo (A)

Cores iguais, cepas isoladas no mesmo local.

* Perfis Ascl obtidos neste estudo.

** (C) sala de corte, (A) armazenamento, (CMS) área de produção de carne mecanicamente separada, (CO) área de congelamento, (E) sala de evisceração, (EM) embalagem e (R) resfriamento.

A persistência de cepas de *L. monocytogenes* com o mesmo perfil genético – como, por exemplo, os perfis **P1**, **P2**, **P3**, **P4** e **P12** – mesmo com período máximo de até quatro meses entre as coletas, indica que essas cepas colonizaram o matadouro. Provavelmente, elas apresentam melhor capacidade de adaptação ao ambiente, formando biofilmes o que possibilita, também, a contaminação cruzada. Lundén *et al.* (2000) consideraram cepas persistentes as que foram isoladas, repetidamente, durante meses e anos do ambiente, de equipamento e/ou de produtos em uma mesma planta processadora.

A contaminação cruzada e a persistência de certas cepas de *L. monocytogenes* foram verificadas por Lundén *et al.* (2003), na Finlândia, através da técnica de PFGE na

qual utilizaram as mesmas enzimas de restrição Ascl e Apal. De 47 perfis combinados obtidos em três matadouros com as duas enzimas, 35 foram restritos a um determinado matadouro, sete foram comuns a dois deles e cinco apareceram nos três matadouros estudados. Dezenove pulsotipos foram considerados persistentes e 28 não persistentes. Verificaram, ainda, que o mesmo pulsotipo que contaminava um equipamento estava presente no produto processado naquele local. Eles observaram, também, que a proporção de cepas persistentes em produtos tratados termicamente era oito vezes maior que na matéria-prima e que os frigoríficos com menor nível de compartimentalização tendem a ter um maior nível de contaminação por cepas persistentes de *L. monocytogenes*.

Berrang *et al.* (2005), através da técnica de amplificação por PCR e posterior seqüenciamento do gene de virulência *actA*, detectaram três tipos persistentes do patógeno na área suja da planta, por mais de um ano, em uma linha de processamento de frango nos Estados Unidos. Esse estudo corroborou o de Lawrence e Gilmour (1995) que isolaram 289 cepas de *L. monocytogenes* oriundas de ambiente de processamento de aves e seus produtos, num período de seis meses.

A persistência de cepas de *L. monocytogenes* no comércio varejista foi constatada por Sauders *et al.* (2004), nos EUA, ao submeterem à ribotipagem 125 isolados de alimentos diversos, 40 de ambiente de comércio varejista e 325 cepas isoladas de listeriose humana. Dos 48 ribotipos detectados, 17 pertenciam a cepas tanto de origem humana quanto de alimentos e de ambiente.

No Brasil, Andrigheto (2000) observou a resistência às condições de processamento de cepas de *L. monocytogenes* de um determinado perfil genético isolada tanto da matéria-prima como de amostras de peito de frango. Nesse mesmo país, Chiarini *et al.* (2007) observaram que 67 de 106 cepas isoladas de amostras de ambiente, processamento, manipulador e do produto final, provenientes de duas plantas de processamento de aves, localizadas no Estado de São Paulo, apresentaram o mesmo perfil genético pela PFGE.

Entretanto, as causas da persistência de *L. monocytogenes* em plantas de processamento ainda não estão totalmente elucidadas, e mais pesquisas são necessárias para identificá-las (Lawrence e Gilmour, 1995; Earnshaw e Lawrence, 1998; Lundén *et al.*, 2003). Porém uma das hipóteses levantadas é a capacidade de formação de biofilmes por esse microrganismo. As células presentes no biofilme têm maior capacidade de resistir ao processo de higienização e grande potencial de se liberar para o ambiente o que provoca a contaminação contínua dos produtos que entram em contato com a superfície

colonizada (Tompkin, 2002; Moltz e Martin, 2005). Os resultados desses autores corroboram o estudo realizado por Fenlon *et al.* (1996) que verificaram que cepas de *L. monocytogenes*, adaptadas ao ambiente das plantas processadoras, e aderidas a superfícies e utensílios são disseminadas aos alimentos disponibilizados ao consumidor.

Na Figura 10 tem-se o dendrograma que indica a presença de quatro grupos genéticos I, II, III e IV originários de 41 isolados de *L. monocytogenes* cujos DNA foram submetidos à macro-restrição com as enzimas *Ascl* e *Apal* seguida da PFGE. *Salmonella* sorovar Braenderup foi utilizada como grupo externo (*outgroup*).

Figura 10. Representação filogenética e sorológica entre os 14 perfis combinados de PFGE obtidos para as 41 cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de um matadouro de aves localizado no interior do Estado de São Paulo e *Salmonella* sorovar Braenderup escolhida como grupo externo. I, II, III e IV correspondem aos grupos clonais. Consultar Tabela 7 para identificação dos sorogrupos.

O grupo clonal I foi composto por apenas um perfil combinado **P1** (Tabela 14 e Figura 10) e este grupo reuniu cepas de *L. monocytogenes* pertencentes aos sorotipos do grupo 1 e 3 (Tabela 8).

Ao grupo clonal II foram agrupados sete perfis combinados **P3, P4, P7, P10, P11, P12 e P14** (Tabela 14 e Figura 10), com vinte e quatro cepas de *L. monocytogenes* pertencentes aos sorotipos do grupo 3 e 4 (Tabela 8). Duas cepas das sete pertencentes aos sorotipos do grupo 4 apresentaram uma banda extra de 691pb na sorotipificação molecular (Figura 7 e Tabela 8).

O grupo clonal **III** agrupou dois perfis combinados **P2** e **P9** (Tabela 14), totalizando sete cepas de *L. monocytogenes*. Seis cepas pertencentes ao perfil **P2** e uma ao **P9**, de sorotipos do grupo 4 (Tabela 8), apresentaram o mesmo fragmento citado anteriormente (Figura 7 e Tabela 8).

Ao grupo clonal **IV** foram reunidos quatro perfis combinados **P5**, **P6**, **P8** e **P13** (Tabela 14 e Figura 10), totalizando cinco cepas de *L. monocytogenes* pertencentes aos sorotipos do grupo 3 e 4. Cepas pertencentes aos sorotipos do grupo 4 - perfis **P5** (1) e **P13** (1) - apresentaram o fragmento inesperado de 691pb na sorotipificação molecular (Figura 7 e Tabela 8).

Tabela 14. Grupos clonais formados a partir da análise visual do dendrograma do perfil combinado de PFGE com as enzimas *Ascl* e *Apal* originários de 41 cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de um matadouro de aves.

Grupo Clonal	Perfil Combinado*	Sorotipo (Grupo)**	Número de cepas
I	P1	1 e 3	5
II	P3, P4, P7, P10, P11, P12 e P14	3 e 4	24
III	P2 e P9	1 e 4	7
IV	P5, P6, P8 e P13	3 e 4	5

* Para a origem das amostras positivas para cada perfil combinado e suas respectivas cepas, ver Tabela 11.

** Ver Tabela 7 para identificação dos grupos sorológicos descritos por Doumith *et al.* (2004).

Neste estudo, os 4 grupos clonais formados **I**, **II**, **III** e **IV** (Tabela 14) agruparam cepas de *L. monocytogenes* pertencentes a mais de um grupo sorológico (Tabela 8 e Tabela 12).

Ao contrário do encontrado neste estudo, Giovannacci *et al.* (1999), na França, através da análise do dendrograma, observaram a formação de 4 grupos clonais, sendo que 225 cepas foram agrupadas no grupo predominante. Com exceção de um grupo clonal, que apresentou cepas dois sorotipos diferentes, todos os outros agruparam cepas de um mesmo sorotipo.

A Tabela 15 apresenta a distribuição dos grupos clonais das cepas de *L. monocytogenes* isoladas nas quatro amostragens realizadas no matadouro de aves estudado. O grupo clonal **II** predominou uma vez que foi detectado em todas as amostragens, sendo sete vezes apenas na segunda amostragem. Na primeira amostragem, o grupo clonal **III** apareceu uma vez e três vezes na segunda amostragem, enquanto o grupo clonal **I** apareceu 2 vezes na segunda amostragem e uma vez na

terceira e quarta amostragens e o grupo clonal **IV** apareceu apenas em amostras coletadas na primeira amostragem (Tabela 15).

Tabela 15. Distribuição dos 4 grupos clonais **I**, **II**, **III** e **IV** de *Listeria monocytogenes* obtidos a partir da análise do dendrograma.

Amostras (Área)	Amostragem			
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
Piso (E)		I (1)		
Área interna da canaleta (C)	III (1)	III (3)	II (1)	
Piso (C)		II (1)		
Parede (C)		III (2)		
Carrinho (C)		II (2)		
Área externa da canaleta (C)	IV (2)	II (1)		
Ralo (A)	IV (1)	III (1)		
Piso (A)		II (3)		
Caixa Branca (E)	IV (1)	I (1)		
Esteira (C)	II (1); IV (1)	II (1)		
Tábua de corte (C)			II (1)	
Tesoura (C)	II (2)	II (1)		
Nória (C)	II (3)	II (2)		
Carcaça de frango (1 ^o . lote) (R)			II (2)	
Carcaça de frango (2 ^o . lote) (R)				I (2)
Carcaça de frango (3 ^o . lote) (R)			I (1); II (1)	II (2)

* (E) significa sala de evisceração, (C) sala de corte, (A) Armazenamento e (R) Resfriamento.

** (n) é o número de cepas.

A sala de corte apresentou cepas de *L. monocytogenes* pertencentes aos três grupos clonais distintos **II**, **III** e **IV** (Tabela 15) oriundos de 9 perfis combinados **P2**, **P3**, **P4**, **P5**, **P6**, **P7**, **P12**, **P13** e **P14** (Tabela 12). Fato interessante foi observado na etapa de armazenamento que agrupou os mesmos 3 grupos clonais **II**, **III** e **IV** observados na sala de corte (Tabela 15). Os quatro perfis combinados **P8**, **P9**, **P10** e **P11**, porém, verificados nesta etapa não coincidem com os perfis da sala de corte (Tabela 12).

A sala de evisceração apresentou duas cepas de *L. monocytogenes* pertencentes ao grupo clonal **I** composto pelo perfil combinado **P1** (Tabela 12).

As amostras de carcaça de frango apresentaram cepas de *L. monocytogenes* pertencentes aos grupos clonais **I** e **II**. Um fato interessante é que o grupo **I** só foi isolado nas amostras do segundo e terceiro lotes nas terceira e quarta amostragens (Tabela 15).

Outro resultado interessante obtido neste trabalho foi verificado nas amostras de carcaça de frango que apresentaram contaminação por cepas de *L. monocytogenes* de

dois grupos clonais gerados I e II (Tabela 15). Na terceira amostragem foi verificado que a amostra proveniente do terceiro lote apresentou contaminação por *L. monocytogenes* pertencente ao grupo clonal I, sendo que a presença de cepa pertencente a este grupo clonal não havia sido observada naquela amostragem (Tabela 15). Fato similar ocorreu na quarta amostragem com uma amostra de carcaça de frango oriunda do segundo e terceiro lotes que apresentaram a contaminação por cepas de *L. monocytogenes* pertencentes aos grupos clonais I e II, respectivamente (Tabela 15).

Além de terem sido isoladas de carcaça de frango na segunda amostragem, cepas de *L. monocytogenes* pertencentes ao grupo clonal II foram isoladas de amostras do piso da área de armazenamento, e da sala de corte foram isoladas do carrinho, do piso, da área externa da canaleta, da esteira, da tesoura e da nória, o que sugere que estas cepas são residentes neste ambiente. Sua presença, porém, não foi detectada nas duas últimas amostragens nestas amostras ou por estarem aderidas a algum ponto não coletado ou por causa da microbiota presente que pode ter dificultado seu isolamento, já que nessas amostragens foi possível verificar falhas na higienização do matadouro estudado.

Os resultados obtidos no estudo realizado paralelamente a este na Espanha indicam que os 98 isolados de *L. monocytogenes* foram agrupados em 9 perfis Ascl, 10 Apal, e 14 perfis combinados, gerando 5 grupos clonais (López Alonso *et al.*, 2005).

Na Figura 11 encontra-se o dendrograma, elaborado com os dados obtidos no matadouro de aves espanhol (E1 – E14) e no matadouro brasileiro (P1 – P14). Através dessa figura, é possível verificar a existência de dois grupos clonais distintos (I e II) o que indica a não correlação genética entre as cepas isoladas em cada país.

Estes resultados são interessantes, pois assume-se que o comércio internacional é responsável pela disseminação de patógenos. Estes dados indicam que, apesar do comércio intenso entre os dois países, essa disseminação não ocorre.

Figura 11. Representação filogenética entre os 14 perfis combinados de PFGE obtidos de cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas em um matadouro de aves no Brasil (P1 – P14), os 14 perfis combinados de PFGE obtidos de cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas em um matadouro de aves na Espanha (E1 – E14) e *Salmonella* sorovar Braenderup escolhida como grupo externo. I e II correspondem aos grupos genéticos formados pelas cepas brasileiras e espanholas, respectivamente. Método de agrupamento utilizado foi UPGMA.

As sessões limpas e com ambiente refrigerado (sala de corte, resfriamento e câmara fria, por exemplo) foram os locais nos dois matadouros com o maior índice de isolamento de *L. monocytogenes* e com maior diversidade genética. Resultados semelhantes foram encontrados por Sakate (2005) que avaliou matadouros frigoríficos de bovinos e por Chiarini (2007) que avaliou dois matadouros frigoríficos de aves, ambos no Brasil. Lundén *et al.* (2002), na Finlândia, em três plantas de processamentos de suínos e Bagge-Ravn *et al.* (2003), na Dinamarca, em uma planta processadora de salmão defumado observaram os mesmos fatos.

Apesar dos trabalhos acima reforçarem a importância da higienização na redução de *L. monocytogenes* nas plantas processadoras, deve-se também considerar a importância da matéria-prima servindo como fonte de entrada do patógeno na linha de

processamento. Este fato foi comprovado por Andricheto (2000), analisando cepas isoladas por Rodrigues *et al.* (1999), em uma planta de processamento de *nuggets* de frango no Estado de São Paulo, Brasil, mas não por Fenlon *et al.* (1996), no Reino Unido.

Não há como propor ao matadouro estudado uma forma única para a diminuição ou eliminação da contaminação do produto por *L. monocytogenes*, uma vez que a presença do microrganismo está generalizada na linha de produção, principalmente na sala de corte. A solução pode ser a melhoria das boas práticas de fabricação e manipulação de alimentos (BPF/M), dos procedimentos padrão de higiene operacional (PPHO) e do sistema de análise de perigo e pontos críticos de controle (APPCC).

Com as BPF/M e com os PPHOs, o matadouro em estudo pode otimizar seu procedimento de limpeza e desinfecção, já que foram isoladas cepas de *L. monocytogenes* persistentes e completamente adaptadas a superfícies de equipamentos e ambiente e que posteriormente foram detectadas no produto final. A remoção dos biofilmes formados deve ser buscada a fim não só de removê-los como também evitar sua formação posterior.

Somente após essas medidas corretivas é que se pode pensar na melhoria do sistema APPCC, que irá garantir o fornecimento de um alimento com baixo risco ao consumidor. Por se tratar de um alimento que ainda será submetido a tratamento térmico antes do consumo, a ausência de *L. monocytogenes* no produto não é necessária, mas a empresa deve buscar a redução nos níveis de contaminação para evitar deixar nas mãos do consumidor final a responsabilidade pela segurança do alimento.

5. CONCLUSÕES

Baseado nas condições desta pesquisa e nos resultados e discussão apresentados, pode-se concluir que:

- *L. monocytogenes* esteve presente em todos os tipos de amostras coletadas, mas foi mais freqüentemente isolada de amostras oriundas da sala de corte e da câmara fria;
- Ocorreu a predominância de cepas de *L. monocytogenes* pertencentes ao sorogrupo 4, principalmente entre as provenientes de carcaça de frango resfriada;
- A disseminação de *L. monocytogenes* ocorreu ao longo da linha de processamento, sendo os perfis genéticos **P1** e **P3** encontrados na sala de evisceração, sala de corte e no produto final;
- As amostras de superfícies sem contato com o produto apresentaram maior diversidade genética o que indica a presença de cepas de *L. monocytogenes* adaptadas a estes locais;
- No matadouro estudado foram encontradas cepas persistentes de *L. monocytogenes*, uma vez que os mesmos perfis Ascl foram isolados em diferentes épocas (2003-2004 e 2005-2006);
- As superfícies de contato (nória e esteira) e de não contato com o produto (piso, canaleta e carrinho) das áreas de corte e resfriamento podem ser consideradas importantes focos de contaminação de *L. monocytogenes* no matadouro de aves estudado.
- Foi possível verificar que o comércio de frango entre o Brasil e Espanha não pode ser responsabilizado pela disseminação de *L. monocytogenes* no país importador.

Este estudo reforçou a importância do controle e monitoramento de *L. monocytogenes* no ambiente e equipamentos de matadouros de frango. Outros estudos, porém, são necessários em nosso país para melhor elucidar o problema da persistência desse microrganismo em ambiente e equipamentos de indústrias de alimentos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARNISALO, K.; AUTIO, T.; SJÖEBERG, A-M; LUNDÉN, J.; KORKEALA, H.; SUIHKO, M-L. Typing of *Listeria monocytogenes* isolates originating from the food processing industry with automated ribotyping and pulsed-typed gel electrophoresis. **Journal of Food Protection**, v. 66, nº. 2, p. 249-255, 2003.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Certification Report. Performance Tested MethodSM 030406. RAPID[®]L.Mono Agar: A Chromogenic medium for identification and differentiation of *Listeria monocytogenes* in selected foods. [ONLINE]. Disponível em: <http://www.aoac.org/testkits/030406certpt.pdf> . Acesso em: 01.set.2007.

ANDRIGHETO, C. Disseminação de *Listeria monocytogenes* em uma linha de produção de “nuggets” congelados de frango. São Paulo, 2000, 51p. Dissertação apresentada para obtenção do título de MESTRE junto à **Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP**.

ANTUNES, P.; RÉU, C.; SOUSA, J.C.; PESTANA, N.; PEIXE, L. Incidence and susceptibility to antimicrobial agents of *Listeria* sp. and *Listeria monocytogenes* isolated from poultry carcasses in Porto, Portugal. **Journal of Food Protection**, v. 65, nº. 12, p. 1888-1893, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE FRANGO. Estatística. [Online] Disponível em: <http://www.abef.com.br> , 2007 . Acesso: 5.out.2007.

AUTIO, T.; HIELM, S.; MIETTINEN, M.; SJÖBERG, A-M.; AARNISALO, K.; BJÖRKROTH, J.; SANDHOLM, T. M-; KORKEALA, H. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, nº. 1, p. 150-155, 1999.

ARAGON, L.C.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T. Detection of *Listeria* sp. in meat and meat product using TECRA[®] *LISTERIA* VIA and BioControl VIP[®] for *Listeria* immunoassays and a cultural procedure. **Anais do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Florianópolis, novembro, 2003.

AUGUSTIN, J.C. Evaluation of the sensitivity of microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in detecting unsafe food according to the prevalence of the pathogen and the shelf-life of the food. **Food Microbiology**, v. 20, p. 681-689, 2003.

BAGGE-RAVN, D.; GARDSHONDN, K.; GRAM, L.; VOGEL, B.F. Comparison of sodium hypochlorite-based foam and peroxyacetic acid-based fog sanitizing procedures in a salmon smokehouse: survival of the general microflora and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 66, nº. 4, p. 592-598, 2003.

BARBALHO, T.C.F.; ALMEIDA, P.F.; ALMEIDA, R.C.C.; HOFER, E. Prevalence of *Listeria* spp. at a poultry processing plant in Brazil and a phage test for rapid confirmation of suspect colonies. **Food Control**, v. 16, p. 211-216, 2005.

BARROS, M.A.F.; NERO, L.A.; SILVA, L.C.; D’OVIDIO, L.; MONTEIRO, F.A.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; HOFER, E.; BELOTI, V. *Listeria monocytogenes*: Occurrence in beef

and identification of the main contamination points in processing plants. **Meat Science**, v. 76, p. 591-596, 2007.

BERRANG, M.E.; MEINERSMANN, R.J.; FRANK, J.F.; SMITH, D.P.; GENZLINGER, L.L. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from a poultry further processing facility and from fully cooked product. **Journal of Food Protection**, v. 65, nº. 10, p. 1574-1579, 2002.

BERRANG, M.E.; MEINERSMANN, R.J.; FRANK, J.F.; SMITH, D.P.; GENZLINGER, L.L. Distribution of *Listeria monocytogenes* subtypes within a poultry further processing plant. **Journal of Food Protection**, v. 68, nº. 5, p. 980-985, 2005.

BIO-RAD LABORATORIES S.A. Rapid Microbiology. New Validations of RAPID'*L.mono* for *Listeria monocytogenes* in 24 hr and *Listeria* spp. [ONLINE]. Disponível em: <http://www.rapidmicrobiology.com/news/1027h11.php>. Acesso em: 01.set 2007.

BORUCKI, M.K.; CALL, D.R. *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, nº. 12, p. 5537-5540, 2003.

BORUCKI, M.K.; REYNOLDS, J.; GAY, C.C; MCELWAIN, K.L.; KIM, S.H.; KNOWLES, D.P.; HU, J. Dairy form reservoir of *Listeria monocytogenes* sporadic and epidemic strains. **Journal of Food Protection**, v. 67, nº. 11, p. 2496-2499, 2004.

BRIGIDO, B.M.; FREITAS, V.P.S.; MAZON, E.M.A.; PISANI, B.; PRANDI, M.A.G.; PASSOS, M.H.C.R. Avaliação de qualidade de queijos Minas frescal comercializados nas regiões de Campinas, Piracicaba e São João da Boa Vista – Estado de São Paulo. **III Simpósio Internacional de Inocuidade de Alimentos (ABRAPA) e VIII Simpósio Brasileiro de Microbiologia de Alimentos (SBM)**, São Paulo, junho, 2004.

BRUHN, J.B.; VOGEL, B.F.; GRAM, L. Bias in the *Listeria monocytogenes* enrichment procedure: Lineage 2 strains outcompete lineage 1 strains in University of Vermont selective enrichments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, nº. 2, p. 961-967, 2005.

CABRITA, P.; CORREIA, S.; Dias, S.F.; BRITO, L. Genetic characterization of *Listeria monocytogenes* food isolates and pathogenic potential within serovars 1/2a and 1/2b. **Systematic Applied Microbiology**, v. 27, p. 454-461, 2004.

CALIL, E.M.B. Incidência de *Listeria* sp. em amostra de alface lisa (*Lactuca sativa*) comercializadas na cidade de São Paulo e na água de irrigação de propriedades produtoras do município de Ibiúna, SP. Dissertação apresentada para obtenção do título de MESTRE junto à **Faculdade de Saúde Pública da USP**. 66p., São Paulo, 1997.

CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C.; MORENO, B.; GARCÍA-FERNANDES, M.C. Occurrence of *Listeria* species in retail poultry meat and comparison of a cultural/immunoassay for their detection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, p.75-82, 2001.

CATÃO, R.M.R.; CEBALLOS, B.S.O. Frequência de *Listeria* sp. e de microrganismos indicadores de contaminação fecal no leite cru e pasteurizado e no esgoto de uma indústria de laticínios em Campina Grande-PB. Dissertação apresentada à **Universidade**

Federal da Paraíba/ João Pessoa – Ciência e Tecnologia de Alimentos, 98p., Paraíba, 1999.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – 10 states, 2006. **MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.56, nº. 4, p. 336-339, United States, 2006. Disponível em: <http://www.cdc.gov/pulsenet/index.htm>. Acesso em: 05.out.2007.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DO ESTADO DE SÃO PAULO. Doenças Transmitidas por Alimentos – Dados Estatísticos de 1998-2006. [Online] Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/ddtha_sh9805.htm. Acesso em: 02.nov.2007.

CHASSEIGNAUX, E.; GÉRAULT, P.; TOQUIN, M.-T.; SALVAT, G.; COLIN, P.; ERMEL, G. Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. **FEMS Microbiology Letters**, v. 210, p. 271-275, 2002.

CHASSEIGNAUX, E.; TOQUIN, M.-T.; RAGIMBEAU, C.; SALVAT, G.; COLIN, P.; ERMEL, G. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from the environment, raw meat and raw products in two poultry- and pork-processing plants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 888-899, 2001.

CHIARINI, E. *Listeria monocytogenes* em matadouros de aves: marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação. Tese apresentada para a obtenção do título de DOUTOR junto à **Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP**. 149p., São Paulo, 2007.

CHIARINI, E.; DESTRO, M.T.; FARBER, J.M.; PAGOTTO, F. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolated from Brazilian poultry abattoirs. **Program and Abstract Book of IAFP 93rd Annual Meeting**, Canadá, agosto, 2006.

COMI, G.; COCOLIN, L.; CANTONI, C.; MANZANO, M. A RE-PCR method to distinguish *Listeria monocytogenes* serovars. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v. 18, p. 99-104, 1997.

CORNU, M.; KALMOKOFF, M.; FLANDROIS, J.-P. Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 261-274, 2002.

DAUPHIN, G.; RAGIMBEAU, C.; MALLE, P. Use of PFGE for tracing contamination with *Listeria monocytogenes* in three cold-smoked salmon processing plants. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 51-61, 2001.

DESTRO, M.T. Incidence and significance of *Listeria* in fish and fish products from Latin America. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 191-196, 2000.

DESTRO, M.T.; LEITÃO, M.F.F.; FARBER, J.M. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, nº. 2, p. 705-711, 1996.

DICE, L.R. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**, v. 26, p. 297-302, 1945.

DONNELLY, C.W.; NYACHUBA, D.G. **Listeria, listeriosis, and food safety**. New York: Marcel Dekker, 3^a. ed, cap. 7, p. 215-256, 2007.

DOUMITH, M.; BUCHRIESER, C.; GLASER, P.; JACQUET, C.; MARTIN, P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n^o. 8, p. 3819-3822, 2004.

EARNSHAW, A.M.; LAWRENCE, L.M. Sensitivity to commercial disinfectants, and the occurrence of plasmids within various *Listeria monocytogenes* genotypes isolated from poultry products and the poultry processing environment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 642-648, 1998.

ESCUDERO-GILETE, M.L.; GONZÁLEZ-MIRET, M.L.; TEMPRANO, R.M.; HEREDIA, F.J. Application of a multivariate concentric method system for the location of *Listeria monocytogenes* in a poultry slaughterhouse. **Food Control**, v. 18, p. 69-75, 2007.

FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*: a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v. 55, n^o. 3, p.476-511, 1991.

FARBER, J.M.; SANDERS, G.W.; JOHNSTON, M.A. A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. **Journal of Food Protection**, v. 52, n^o. 7, p. 456-458, 1989.

FENLON, D.R.; WILSON, J.; DONACHIE, W. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, n^o. 6, p. 641-650, 1996.

FRÖDER, H.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T. Emprego de um método molecular para avaliar a presença de *L. monocytogenes* em saladas de hortaliças minimamente processadas. **Anais do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Florianópolis, novembro, 2003.

FUJISAWA, T.; MORI, M. Evaluation of media for determination hemolytic activity and that of API *Listeria* system for identifying strains of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n^o. 4, p. 1127-1129, 1994.

GELLIN, B.G.; BROOME, C.V. Listeriosis. **Journal of American Medicine Association**, v. 261, p. 1313-1320, 1989.

GENIGEORGIS, C.A.; DUTULESCU, D.; GARAYZABAL, J.F. Prevalence of *Listeria* spp. in poultry meat at the supermarket and slaughterhouse level. **Journal of Food Protection**, v. 52, n^o. 9, p. 618-624, 1989.

GENIGEORGIS, C.A.; OANCA, P.; DUTULESCU, D. Prevalence of *Listeria* spp. in turkey meat at the supermarket and slaughterhouse level. **Journal of Food Protection**, v. 53, n^o.4, p. 282-288, 1990.

GIOVANNACCI, I.; RAGIMBEAU, C.; QUEGUINER, S.; SALVAT, G.; VENDEUVRE, J.-L.; CARLIER, V.; ERMEL, G. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants: use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, n^o. 2/3, p. 127-140, 1999.

GOMBAS, D.E.; CHEN, Y.; CLAVERO, R.S.; SCOTT, V.N. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. **Journal of Food Protection**, v. 66, nº. 4, p. 559-569, 2003a.

GOMBAS, D.E.; CHEN, Y.; ROSS, W.R.; SCOTT, V.N. *Listeria monocytogenes*: Low levels equal low risk. **Journal of Food Protection**, v. 66, nº. 4, p. 570-577, 2003b.

GRAVES, L.M., SWAMINATHAN, B. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.65, p.55-62, 2001.

GRAVES, L.M.; SWAMINATHAN, B.; HUNTER, S.B. **Listeria, listeriosis, and food safety**. New York: Marcel Dekker, 3^a. ed, cap. 9, p. 283-304, 2007.

GUDBJÖRNSDÓTTIR, B.; SUIHKO, M.-L.; GUSTAVSSON, P.; THORKESSON, G.; SALO, S.; SJÖBERG, A.-M.; NICLASSEN, O.; BREDHOLT, S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. **Food Microbiology**, v. 21, p. 217-225, 2004.

GUERRA, M.M; MCLAUCHIN, J.; BERNARDO, F.A. *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. **Food Microbiology**, v. 18, p. 423-429, 2001.

HOFER, E.; NASCIMENTO, R.S.; OLIVEIRA, M.A. Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. **Revista da Sociedade de Medicina Tropical**, v. 31, nº. 2, p. 173-177, 1998.

HOFER, E.; RIBEIRO, R.; FEITOSA, D.P. Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, nº. 5, p. 615-620, 2000.

HOFFMAN, A.D.; GALL, K.L.; NORTON, D.M.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* contamination patterns for the smoked fish processing environment and for raw fish. **Journal of Food Protection**, v. 66, nº. 1, p. 52-60, 2003.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. capítulo 19, 9^o. ed. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, p. 566-570, 1994.

HUDSON, W.R.; MEAD, G.C. *Listeria* contamination at a poultry processing plant. **Letters in Applied Microbiology**, v. 9, p. 211-214, 1989.

JACKSON, V.; BLAIR, I.S.; MCDOWELL, D.A.; KENNEDY, J.; BOLTON, D.J. The incidence of significant foodborne pathogens in domestic refrigerators. **Food Control**, v.18, p. 346-351, 2007.

JEMMI, T; PAK, S.I.; SALMAN, M.D. Prevalence and risk factors for contamination with *Listeria monocytogenes* of imported and exported meat and fish products in Switzerland, 1992-2000. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 54, p. 25-36, 2002.

JIAO, X.; ZHOU, X. Molecular grouping and pathogenic analysis of *Listeria monocytogenes* of clinical and food origin. **Food Control**, v. 16, p. 867-872, 2005.

JINNEMAN, K.C.; HILL, W.E. *Listeria monocytogenes* lineage group classification by MAMA-PCR of the listeriolysin gene. **Curr. Microbiology**, v. 43, p. 129-133, 2001.

KABUKI, D.Y. Contagem de *Listeria* spp. pelo método do Número Mais Provável (NMP), avaliação da sua ocorrência em carnes de frango e da eficiência de sanitizantes na redução da contaminação por *Listeria monocytogenes*. Campinas, 1997, 91p. Dissertação apresentada para obtenção do título de mestrado junto à **Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP**.

LADO, B.H.; YOUSEF, A.E. **Listeria, listeriosis, and food safety**. New York: Marcel Dekker, 3^a. ed, cap. 6, p. 157-213, 2007.

LANDGRAF, I.M.; MASSUMI, M.K.A.; JAKABI, M.; ALVES, K.C.R.; MARCHI, C.R. An outbreak of *Listeria monocytogenes* meningitis in neonates. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, n^o. 1, p. 63-67, 1999.

LAWRENCE, L.M.; GILMOUR, A. Characterization of *Listeria monocytogenes* from poultry products and from the poultry-processing environment by random amplification of polymorphic DNA and multilocus enzyme electroforesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n^o. 6, p. 2139-2144, 1995.

LAWRENCE L.M.; GILMOUR, A. Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environment and in poultry products and their rapid confirmation by multiplex PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n^o. 12, p. 4600-4604, 1994.

LEME-MARQUES, E.G.; CRUZ, C.D.; DESTRO, M.T. Pheno- and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates from the southwestern region of the state of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n^o. 2, p. 287-292, 2007.

LÓPEZ, V.; ORTIZ, S.; CORUJO, A.; LÓPEZ, P.; POZA, D.; NAVAS, J.; MORENO, R.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, J.V. Different contamination patterns of lineage I and II strains of *Listeria monocytogenes* in a Spanish broiler abattoir. **Poultry Science**, v. 87, p. 1-9, 2008.

LÓPEZ, V.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, J.V.; ORTIZ, S.; CORUJO, A.; LÓPEZ, P.; NAVAS, J.; MORENO, R. Traceback identification of an ingredient (Pork Dewlap) as the possible source of *Listeria monocytogenes* serotype 4b contamination in raw chicken products. **Journal of Food Protection**, v. 70, n^o. 6, p. 1513-1517, 2007a.

LÓPEZ, V.; VILLATORO, D.; ORTIZ, S.; LÓPEZ, P.; NAVAS, J.; DÁVILA, J.C.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, J.V. Molecular tracking of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig abattoir and processing plant. **Meat Science**, 2007b. [article in press]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.05.002>. Acesso em: 05.out.2007.

LÓPEZ ALONSO, V.; ORTIZ JAREÑO, S.; CORUJO FERNÁNDEZ, A.; LÓPEZ ABARQUERO, P.; MORENO TEMPRADO, R.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, J.V. Estudio de los subtipos de *Listeria monocytogenes* de un matadero de pollos mediante electroforesis em campo pulsante. In: XX CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MICROBIOLOGÍA SEM2005, **Resumo**: A-221, Cáceres, Espanha, 2005. [ONLINE] Disponível em: <http://higiene.unex.es/SEM2005/> Acesso em: 10.mai.2008.

LUNDÉN, J. Persistent *Listeria monocytogenes* contamination in food processing plants. Helsinki, 2004. 59p. Academic Dissertation, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland. Disponível em: <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/ela/elint/vk/lunden/> Acesso em: 13.nov.2007.

LUNDÉN, J.M.; AUTIO, T.J.; SJÖBERG, A.-M.; KORKEALA, H.J. Persistente and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. **Journal of Food Protection**, v. 66, nº. 11, p. 2062-2069, 2003.

LUNDÉN, J.M.; AUTIO, T.J.; KORKEALA, H.J. Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. **Journal of Food Protection**, v. 65, nº. 7, p. 1129-1133, 2002.

LUNDÉN, J.M.; MIETTINEN, M.K.; AUTIO, T.J.; KORKEALA, H.J. Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. **Journal of Food Protection**, v. 63, nº. 9, p. 1204-1207, 2000.

MANZANO, M.; COCOLIN, L.; CANTONI, C.; COMI, G. A rapid method for the identification and partial serotyping of *Listeria monocytogenes* in food by PCR and restriction enzyme analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, p. 207-212, 1998.

MCLAUCHLIN. The relationship between *Listeria* and listeriosis. **Food Control**, v. 7, nº. 4/5, p. 187-193, 1996.

MEAD, G.C. Microbiological quality of poultry meat: a review. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 6, nº. 3, p. 135-142, 2004.

MIETTINEN, M.K.; PALMU, L.; BJÖRKROTH, K.L.; KORKEALA, H. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in broilers at the abattoir, processing plant, and retail level. **Journal of Food Protection**, v. 64, nº. 7, p. 994-999, 2001.

MIETTINEN, M.K.; SIITONEN, A.; HEISKANEN, P.; HAAJANEN, H.; BJÖRKROTH, K.L.; KORKEALA, H.J. Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, nº. 7, p. 2358-2360, 1999.

MOLTZ, A.G.; MARTIN, S.E. Formation of biofilm by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. **Journal of Food Protection**, v. 68, nº. 1, p. 92-97, 2005.

MONFORT, P.; MINET, J.; ROCOURT, J.; PICLET, G.; CORMIER, M. Incidence of *Listeria* spp. in Breton live shellfish. **Letters Applied Microbiology**, v. 26, p. 205-208, 1998.

NAKAMURA, H.; HATANAKA, M.; OCHI, K.; NAGAO, M.; OGASAWARA, J.; HASE, A.; KITASE, T.; HARUKI, K.; NISHIKAWA, Y. *Listeria monocytogenes* isolated from cold-smoked fish products in Osaka city, Japan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 323-328, 2004.

NIEROP, W.V.; DUSÉ, A.G.; MARAIS, E.; AITHMA, N.; THOTHOBOLO, N.; KASSEL, M.; STEWART, R.; POTGIETER, A.; FERNANDES, B.; GALPIN, J.S.; BLOOMFIELD, S.F. Contamination of chicken carcasses in Gauteng, South Africa, by *Salmonella*, *Listeria*

monocytogenes and *Campylobacter*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, p. 1-6, 2005.

NORTON, D.M.; BRADEN, C.R. **Listeria, listeriosis, and food safety**. New York: Marcel Dekker, 3^a. ed, cap. 10, p. 305-356, 2007.

NUNES, I.A. Bactérias do gênero *Listeria* em carcaças e cortes comerciais de frango obtidos no varejo, avaliação da eficiência de meios para isolamento e variantes da técnica. Jaboticabal, 1994, 108p. Dissertação apresentada para obtenção do título de MESTRE junto à **Faculdade de Ciências Agrárias da UNESP**.

OKUTAMI, A.; OKADA, Y.; YAMAMOTO, S.; IGIMI, S. Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 93, p. 131-140, 2004.

PAGOTTO, F.; DALEY, E.; FARBER, J.; WARBURTON, D. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples (MFHPB-30, 2001). In: **Compendium of Analytical Methods**. v.3. Disponível em: <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>. Acesso em 05.out. 2007.

PAINTER, J.; SLUTSKER, L. **Listeria, listeriosis, and food safety**. New York: Marcel Dekker, 3^a. ed, cap. 4, p. 85-109, 2007.

PERRIN, M.; BEMER, M.; DELAMARE, C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, nº. 11, p. 5308-5309, 2003.

PINI, P.N.; GILBERT, R.J. The occurrence in the UK of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. **International of Food Microbiology**, v.6, p. 317-326, 1988.

PRITCHARD, T.J.; FLANDERS, K.J.; DONNELLY, C.W. Comparision of the incidence of *Listeria* on equipments versus environmental sites within dairy processing plants. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, nº. 3, p. 375-384, 1995.

REIJ, M.W.; DEN AANTREKKER, E.D. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, p. 1-11, 2004

REITER, M.G.R.; BUENO, C.M.M.; LÓPEZ, C.; JORDANO, R. Occurrence of *Campylobacter* and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing plant. **Journal of Food Protection**, v. 68, n.9, p. 1903-1906, 2005.

REVAZISHVILI, T.; KOTETISHVILI, M.; STINE, O.C.; KREGER, A.S.; MORRIS, J.G.; SULAKVELIDZE, A. Comparative analysis of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis for characterization *Listeria monocytogenes* strains isolated from environmental and clinical sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, nº. 1, p. 276-285, 2004.

ROCOURT J.; BUCHRIESER, C. **Listeria, listeriosis, and food safety**. New York: Marcel Dekker, 3^a. ed, cap. 1, p. 1-20, 2007.

ROCOURT, J.; JACQUET, CH.; REILLY, A. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 197-209, 2000.

RODRIGUES, D.A. *Listeria* sp. e *Listeria monocytogenes* em indústria processadora de nuggets de frango – estudo de ocorrência e avaliação de metodologias de análise. São Paulo, 1999. 104p. Dissertação apresentada para obtenção do título de MESTRE junto à **Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP**.

SAKATE, R.I. Prevalência, epidemiologia, caracterização sorológica e molecular de *Listeria monocytogenes* isoladas na criação intensiva de novilhos superprecoces e em abatedouros frigoríficos no Estado de São Paulo. São Paulo, 2005, 95p. Dissertação apresentada para obtenção do título de DOUTOR junto à **Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP**.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T., eds. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2^o. ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 3, 1989.

SAUDERS, B.D.; MANGIONE, K.; VINCENT, C.; SCHERMERHORN, J.; FARCHIONE, C.M.; DUMAS, N.B.; BOPP, D.; KORNSTEIN, L.; FORTES, E.D.; WINDHAM, K.; WIEDMANN, M. Distribution of *Listeria monocytogenes* molecular subtypes among human and food isolates from New York State shows persistence of human disease-associated *Listeria monocytogenes* strains in retail environments. **Journal of Food Protection**, v. 67, n^o.7, p. 1417-1428, 2004.

SAUDERS, B.D.; WIEDMANN, M. **Listeria, listeriosis, and food safety**. New York: Marcel Dekker, 3^a. ed, cap. 2, p. 21-53, 2007.

SENCZEK, D.; STEPHAN, R.; UNTERMANN, F. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from a meat processing plant over two-year period. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, n^o.1-2, p. 155-159, 2000.

SILVA, I.M.M.; ALMEIDA, R.C.C.; ALVES, M.A.O.; ALMEIDA, P.F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environmental of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 241-248, 2003.

SILVA, W.P.; LIMA, A.S.; GANDRA, E.A.; ARAÚJO, M.R.; MACEDO, M.R.P.; DUVAL, E.H. *Listeria* sp. no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n^o.3, p. 911-916, 2004.

SKIDMORE, A.G. Listeriosis at Vancouver General Hospital, 1965-79. **Canadian Medical Association**, v. 125, p. 1217-1221, 1981.

SKOVGAARD, N.; MORGEN, C.A. Detection of *Listeria* spp. in faeces from animals, in feeds, and raw foods of animals origin. **International of Journal of Food Microbiology**, v. 6, p. 229-242, 1988.

SLADE, P.J. Monitoring *Listeria* in the food production environment. I. Detection of *Listeria* in processing plants and isolation methodology. **Food Research International**, v. 25, p. 45-56, 1992.

SNAPIR, Y.M.; VAISBEIN, E.; NASSAR, F. Low virulence but potentially fatal outcome – *Listeria ivanovii*. **European Journal of Internal Medicine**, v. 17, p. 286-287, 2006.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical Taxonomy**, San Francisco: Freeman, 573 p., 1973.

SOMMERS, E.B.; WONG, A.C.L. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. **Journal of Food Protection**, v. 67, nº.10, p. 2218-2229, 2004.

STOPFORTH, J.D.; SAMELIS, J.; SOFOS, J.N.; KENDALL, P.A.; SMITH, G.C. Biofilm formation by acid-adapted and nonadapted *Listeria monocytogenes* in fresh beef descontamination washings and its subsequent inactivation with sanitizers. **Journal of Food Protection**, v. 65, nº. 11, p. 1717-1727, 2002.

SWAMINATHAN, B.; BARRETT, T.J.; HUNTER, S.B.; TAUXE, R.V.; CDC PulseNet Task Force. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, nº. 3, p. 382-389, 2001.

TOMPKIN, R.B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. **Journal of Food Protection**, v. 65, nº. 4, p. 709-725, 2002.

UHITIL, S.; JAKSIC, S.; PETRAK, T.; MEDIC, H.; GUMHALTER-KAROLYI, L. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and the others *Listeria* spp. in cakes in Croatia. **Food Control**, v. 15, nº. 3, p. 213-215, 2004.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). [Food Safety and Inspection Service (FSIS)]. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg and environmental (MLG 8.03, 2002). [Online] Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov>. Acesso em: 05.out.2007.

UNNERSTAD, H.; NILSSON, I.; ERICSSON, H.; THAM, M-L. D-; BIILE, J.; BANNERMAN, E.; THAM, W. Division of *Listeria monocytogenes* serovar 1/2a strains into two groups by PCR and restriction enzyme analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, nº. 5, p. 2054-2056, 1999.

VON LAER, A. E. Mapeamento da contaminação por *Listeria monocytogenes* em uma planta de processamento de lingüiça mista frescal através de sorologia e PFGE. Pelotas, 2004, 79p., Dissertação apresentada para a obtenção do título de MESTRE junto à **Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da UFP**.

YOSHIDA, T.; SATO, M.; HIRAI, K. Prevalence of *Listeria* species in raw milk from farm bulk tanks in Nagano prefecture. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60, nº. 3, p. 311-314, 1998.

YÜCEL, N.; ÇITAK, S.; ÖNDER, M. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. **Food Microbiology**, v. 22, p. 241-245, 2005.

WESLEY, I.V. **Listeria, listeriosis, and food safety**. New York: Marcel Dekker, 3^a. ed, cap. 3, p. 55-84, 2007.