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

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.

RICARDO ICHIRO SAKATE

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. MARIA TERESA DESTRO

São Paulo
2005

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011439

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Sakate, Ricardo Ichiro

S158p Prevalência, epidemiologia, caracterização sorológica e molecular de *Listeria monocytogenes* na criação intensiva de novilhos superprecoces e em abatedouros frigoríficos no Estado de São Paulo / Ricardo Ichiro Sakate – São Paulo, 2005. 95p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

Orientador: Destro, Maria Teresa

1. Microbiologia de alimentos 2. Listeria: Bacteriologia
I. T. II. Destro, Maria Teresa, orientador

664.07 CDD

Ricardo Ichiro Sakate

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.

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Maria Teresa Destro
orientadora/presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

_____
3º. examinador

_____
4º. examinador

São Paulo 20 de 12 de 200 5

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese,

À minha querida esposa Renate,

Ao meu filho Matheus,

Aos meus pais Minoru e Michiko,

Ao Sr. Aloísio e Sra. Ingrid,

Ao Giuseppe e Marli,

À minha família e amigos.

Pelo Amor, Apoio e Compreensão.

AGRADECIMENTOS

A minha professora e orientadora, Profa. Maria Teresa Destro,

Às professoras Mariza Landgraf e Bernadette D.G.M. Franco,

Ao Prof. José Paes e a todos do laboratório de Botucatu,

Às amigas Kátia e Lúcia,

Aos amigos e amigas da pós,

À Fapesp pela bolsa e auxílio financeiro (Proc. 01/13410-5 e 02/00021-3)

À Fac. Ciências Farmacêuticas da USP – São Paulo,

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF/USP,

Ao pessoal das secretarias do departamento e da pós-graduação,

À FMVZ-UNESP de Botucatu,

À INTL Bioproducts pelo material concedido,

Aos inspetores federais e ao pessoal do controle de qualidade dos frigoríficos,

A todos aqueles e aquelas que de uma forma ou de outra me auxiliaram ao longo deste caminho,

Meu muito obrigado e um grande abraço!

CONTEÚDO

	PÁG.
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Produção/Exportação de Carne no Brasil.....	1
1.2. Novilho Superprecoce e Confinamento.....	1
1.3. Características da <i>Listeria</i> sp.....	2
1.4. <i>Listeria monocytogenes</i>	3
1.5. <i>Listeria</i> na produção primária.....	6
1.6. <i>Listeria</i> na indústria.....	8
1.7. <i>Listeria</i> em carne e derivados.....	12
1.8. PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis – Eletroforese em Campo Pulsado).....	15
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAL e MÉTODOS.....	18
3.1. Material.....	18
3.1.1. Coleta de amostras ambientais e de água antes da entrada dos animais.....	18
3.1.2. Coleta de amostras de fezes de conjunto.....	21
3.1.3. Coleta de amostras individuais de fezes.....	21
3.1.4. Coleta de amostras de água, ração e seus componentes durante o confinamento.....	22
3.1.5. Coleta de amostras no frigorífico A.....	22
3.1.6. Coleta de amostras no frigorífico B.....	24
3.1.7. Cepas bacterianas.....	29
3.2. MÉTODOS.....	29
3.2.1. Pesquisa de <i>Listeria</i> sp.....	29

3.2.1.1. Amostras ambientais e de água do galpão de confinamento.....	29
3.2.1.2. Amostras de fezes.....	30
3.2.1.3. Amostras do frigorífico A.....	30
3.2.1.4. Amostras do frigorífico B.....	30
3.2.2. Identificação bioquímica.....	31
3.2.3. Identificação dos sorotipos de <i>L. monocytogenes</i>	31
3.2.4. Teste de soro aglutinação rápida.....	33
3.2.5. Determinação de perfis de macrorestrição.....	34
4. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	36
4.1. Confinamento e Abate dos Novilhos Superprecoces.....	36
4.2. Frigorífico B.....	49
4.3. Caracterização sorológica e molecular.....	58
5. CONCLUSÕES.....	82
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

Índice de Tabelas

	Pág.
Tabela 1. Pontos de amostragem em cada um dos dois dias de coleta no frigorífico B.....	26
Tabela 2. Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados neste estudo (DOUMITH <i>et al.</i> , 2004).....	32
Tabela 3. Ocorrência de <i>Listeria</i> sp. nas amostras de ambiente antes da entrada dos animais no galpão de confinamento.....	40
Tabela 4. Ocorrência de <i>Listeria</i> sp. nas amostras das fezes de conjunto.....	41
Tabela 5. Ocorrência de <i>Listeria</i> sp. nas amostras individuais de fezes e nas amostras de carcaças coletadas no abate dos animais das raças Simental puro e Simental ½ sangue.....	42
Tabela 6. Ocorrência de <i>Listeria</i> sp. nas amostras individuais de fezes dos animais das raças Angus puro e Angus ½ sangue e nas amostras coletadas no abate dos animais da raça Angus puro....	43
Tabela 7. Ocorrência de <i>Listeria</i> sp. nas amostras individuais de fezes e nas amostras de carcaças coletadas no abate dos animais da raça Nelore.....	44
Tabela 8. Ocorrência de <i>Listeria</i> sp. nas amostras de água, dos componentes da ração e ração final empregada na produção do Novilho Superprecoces.....	45
Tabela 9. Ocorrência de <i>Listeria</i> sp. nas amostras de utensílios, equipamentos e ambiente no abate da diferentes raças de Novilhos Superprecoces.....	46
Tabela 10. <i>Listeria</i> sp. no abate e processamento de bovinos no frigorífico B durante os cinco meses de coleta.....	50
Tabela 11. Amostras positivas para <i>Listeria monocytogenes</i> nas cinco coletas realizadas no frigorífico B.....	54
Tabela 12. Sorogrupos e sorotipos dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> provenientes do frigorífico A identificados por soroaglutinação rápida e por multiplex PCR segundo DOUMITH <i>et al.</i> (2004).....	61
Tabela 13. Sorotipos dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> provenientes do frigorífico B.....	63

Tabela 14. Representação esquemática dos perfis PFGE obtidos com a enzima <i>Ascl</i>	69
Tabela 15. Representação esquemática dos perfis PFGE obtidos com a enzima <i>Apal</i>	70
Tabela 16. Distribuição das cepas de <i>L. monocytogenes</i> de acordo com o grupo clonal.....	72
Tabela 17. Relação entre o grupo genético e o sorotipo das cepas de <i>L. monocytogenes</i> isoladas nos frigoríficos A e B.....	74
Tabela 18. Distribuição dos grupos clonais dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> no abatedouro A (abate dos Novilhos Superprecoces).....	75
Tabela 19. Distribuição dos grupos clonais de <i>L. monocytogenes</i> isolados no frigorífico B.....	79

Índice de Figuras

	Pág.
Figura 1. Representação do galpão de confinamento da FMVZ-UNESP-Botucatu. A – corredores laterais, B – corredor central, Baías enumeradas de 1 a 26 (16 m ² cada).....	20
Figura 2. Pontos de coleta de amostras na carcaça – 3 externo e 2 interno....	23
Figura 3. Fluxograma abate – Frigorífico B.....	25
Figura 4. Vista geral da sala de desossa do frigorífico B.....	28
Figura 5. Perfis sorotípicos característicos de <i>Listeria</i> spp. determinados por multiplex PCR. Linhas, 1: 1/2a; 2: 1/2b; 3: 1/2c; 4: 4b; 5: 3a; 6: 3b; 7: 3c; 8: 4d; 9: 4e; 10: 7; 11: 4a; 12: 4c; 13: <i>L. innocua</i> ; 14: <i>L. welshimeri</i> ; 15: <i>L. ivanovii</i> ; 16: <i>L. seeligeri</i> , M: marcador de peso molecular (DOUMITH <i>et al.</i> , 2004).....	33
Figura 6. Perfis PFGE obtidos com a enzima <i>Ascl</i> (1 a 15) para as cepas de <i>L. monocytogenes</i> isoladas nos frigoríficos A e B. PM: marcador de peso molecular (Kpb).....	67
Figura 7. Perfis PFGE obtidos com a enzima <i>Apal</i> (A a M) para as cepas de <i>L. monocytogenes</i> isoladas nos frigoríficos A e B. PM: marcador de peso molecular (Kpb).....	68
Figura 8. Relação filogenética das cepas de <i>L. monocytogenes</i> isoladas de amostras de carcaças, ambiente, equipamentos e utensílios nos frigoríficos A e B e determinados por PFGE. I a VII correspondem aos grupos clonais.....	71

RESUMO

O Brasil é um dos principais exportadores de carne bovina. A maioria do gado é criada a pasto, porém uma parte já é confinada, como na criação de Novilhos Superprecoces. Este confinamento pode favorecer a contaminação por *L. monocytogenes* (Lm) do rebanho, bactéria responsável pela listeriose, doença que provoca aborto, neuropatias e gastroenterites. Com isto, pesquisou-se a presença e características sorotípicas e moleculares de Lm durante o confinamento de cinco raças de novilhos e em suas carcaças no frigorífico A, assim como amostras de carcaças, utensílios, equipamentos e ambiente em outro frigorífico (B). Foram utilizadas para tipar as cepas técnicas de sorotipagem por multiplex PCR, soroaglutinação e PFGE. Nenhuma Lm foi isolada nas 645 amostras do confinamento, sendo 13/48 carcaças dos novilhos, assim como amostras de piso e parede da câmara fria positivas para Lm no frigorífico A. Das 516 amostras do frigorífico B, 27 continham Lm, sendo a maioria proveniente da área limpa. Verificou-se que os sorotipos 1/2c e 4b foram os mais frequentes no frigorífico A e o 1/2b e 1/2c no frigorífico B. A análise por PFGE forneceu 15 perfis Ascl, 13 Apal e 21 perfis compostos, caracterizando sete grupos clonais. Nesta cadeia produtiva de carne o principal ponto crítico para Lm está na área limpa do frigorífico e que cepas de mesmos grupos clonais puderam ser encontrados em ambos frigoríficos, assim como em áreas distintas do frigorífico B, demonstrando o alto poder de disseminação destas cepas. Portanto, estes resultados podem auxiliar no desenvolvimento de programas de boas práticas e HACCP para prevenir ou eliminar a contaminação por este patógeno.

ABSTRACT

Brazil is one of the most important beef producer/exporter country worldwide. The majority of the cattle is raised extensively, but some of them are feedlot. Confinement conditions can stress the animals and favor the contamination and proliferation for *Listeria monocytogenes* (Lm), agent of listeriosis which causes abortion, stillbirths, nervous dysfunctions and gastroenteritis. The aim of this study was to verify the presence of this microorganism and its molecular and serotype characteristics. Two groups of samples were analyzed: first, during the confinement of five different breeds of steers and on their carcasses (abattoir A). Second, at the slaughter and processing of other groups of beef cattle (abattoir B). The Lm strains were serotyped with commercial antisera and by multiplex PCR, and subtyped by PFGE. No Lm was found among the 645 samples of feces, environment, feed and water during the confinement, but 13/48 of the refrigerated carcasses were contaminated, as well as the floor and the wall of the cold room at the abattoir A. Amongst the 516 samples of slaughter and processing environments, carcasses, utensils and equipment collected from abattoir B, 27 harbored Lm, being the majority from the clean area. Serotype 1/2b and 4b were the most frequent Lm serotypes in the carcasses of the steers in abattoir 1, and 1/2b and 1/2c in the abattoir B. The molecular typing by PFGE resulted in 15 *Ascl* and 13 *Apal* profiles, and 21 composite profiles, resulting in seven clonal groups. In these beef production chains the most important critical point for Lm contamination is the clean area of meat processing. Same clonal groups could be isolated in both abattoirs and in different areas on abattoir B, demonstrating high dissemination capability of these strains. Therefore, these results could aid the development of good manufacturing practices and HACCP, to prevent or eliminate the contamination for this pathogen.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produção/Exportação de Carne no Brasil

O Brasil é um dos mais importantes produtores de carne bovina do mundo, chegando a produzir 7,7 milhões de toneladas em 2003 e exportar mais de 1,3 milhão de toneladas equivalentes carcaças, sendo considerado o primeiro exportador mundial. A carne bovina é umas das carnes mais consumidas no país, estando seu consumo *per capita* situado em 36,6 Kg/ano (ABIEC, 2005). Sendo esta carne muito consumida na dieta típica brasileira, torna-se de grande importância a pesquisa da ocorrência de patógenos nela, assim como nos produtos destinados à exportação uma vez que as normas zoonosanárias tendem a se tornar cada vez mais restritas no que diz respeito às exigências de produtos livres de patógenos.

1.2. Novilho Superprecoce e Confinamento

No Brasil, novos processos de criação intensiva de gado bovino têm surgido, sendo um deles o “Programa do Novilho Superprecoce”, um sistema de criação de bovinos desenvolvido pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp – Campus Botucatu, sob financiamento da Fapesp. Este programa tem gerado grande interesse dos criadores, pois os animais, com um ano de idade, atingem pelo menos 450Kg de peso vivo, sem a utilização de qualquer promotor de crescimento. Isto representa uma vantagem se comparado ao sistema tradicional aonde o animal só vai ao abate com três a quatro anos. Este sistema economiza, ainda, cerca de 75% da área de criação extensiva tradicional, pois os bezerros são desmamados aos sete meses e vão diretamente para a engorda no confinamento, recebendo ração e silagem de milho úmido e ali ficando até o abate (FILGUEIRAS, 2000).

Portanto, com o surgimento deste novo processo de criação, novos pontos críticos podem surgir com relação à presença e disseminação de patógenos no rebanho e esses pontos deverão ser prontamente identificados e controlados para que os animais não carreguem estas bactérias para o

matadouro e conseqüentemente para a carne e seus derivados. Dentre as bactérias de importância destaca-se a *Listeria monocytogenes*.

Dentro deste contexto alguns princípios do sistema de Análise de Perigos e Controle de Pontos Críticos poderão ser utilizados na fase primária de produção, pois têm como fundamento a prevenção dos perigos químicos, físicos e biológicos. Nos países desenvolvidos já há uma mentalidade voltada para a sua adaptação e implantação nas fazendas através de programas do tipo “from farm to table” que numa tradução livre seria “da fazenda à mesa” (CULLOR, 1995; JOHNSTON, 2000). Este tipo de abordagem começa a ser, também, manifestada no nosso país (SAKATE *et al.*, 1999).

Por ser o Novilho Superprecoce um novo sistema de criação (FILGUEIRAS, 2000), nenhum trabalho ainda foi desenvolvido para avaliar a presença de patógenos neste ambiente de criação, sendo que não se encontram trabalhos no Brasil realizados até hoje em nível de fazenda para a detecção precoce da contaminação por *Listeria* nos animais, ração e ambiente de produção.

1.3. Características da *Listeria* sp.

Listeria é um bastonete pequeno (0,5 µm de diâmetro e 1-2 µm de comprimento), Gram positivo com extremidades arredondadas. As células são encontradas isoladas ou em pequenas cadeias, podendo em alguns casos apresentarem-se cocóides. *Listeria* não produz esporos nem cápsulas, é móvel através de poucos flagelos quando cultivado a 20-25°C. *Listeria* é microaerofílica ou anaeróbia facultativa, produz catalase mas não oxidase. Pode se multiplicar em temperaturas variando de – 0,1 a 45 °C, em pH de 4,4 a 9,6, a concentrações de sal de até 10% e a a_w tão baixa quanto 0,93 (RYSER e MARTH, 1999).

O gênero *Listeria* compreende 6 espécies que são *L. innocua*, *L. grayi*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. monocytogenes*, sendo somente estas duas últimas consideradas patogênicas (RYSER e MARTH, 1999). No entanto, na França em 2003 já houve a descrição de bacteremia seguida de

morte causada por *L. innocua* em um indivíduo de 62 anos (PERRIN *et al.*, 2003).

1.4. *Listeria monocytogenes*

Dentre os mais importantes e perigosos microrganismos causadores de infecções alimentares destaca-se a *Listeria monocytogenes*, agente causador da listeriose, doença zoonótica grave que pode levar ao aborto, a problemas neurológicos e a disfunções gastrintestinais. Alguns estudos sugerem que até 21% dos humanos sejam portadores desta bactéria nos intestinos (SKIDMORE, 1981; SCHUCHAT *et al.*, 1991; MASCOLA *et al.*, 1992; SLUTSKER e SCHUCHAT, 1999). Ela tem sido encontrada mundialmente em pelo menos 42 espécies de mamíferos, tanto domésticos quanto silvestres, assim como em pelo menos 22 espécies de pássaros e também em algumas espécies de peixes e moluscos (ANON., 1991; RYSER e MARTH, 1999; ROCOURT *et al.*, 2000; DESTRO, 2000). A *L. monocytogenes* é ubiqüitária podendo ser isolada do solo, água, silagem, vegetais e outras fontes ambientais. Esta bactéria é bem resistente e suporta os efeitos deletérios do congelamento, desidratação, acidez e altas temperaturas, mesmo não formando esporos (CLIVER, 1990; PERRY e DONNELLY, 1990; PELL, 1997; RYSER e MARTH, 1999; DYKES e MOORHEAD, 2000).

Embora relativamente rara, a listeriose humana é freqüentemente severa e a taxa de mortalidade pode atingir 51% (ROCOURT *et al.*, 2000). A infecção pode causar uma meningite ou mais raramente uma encefalite. Pode também causar uma infecção generalizada e em mulheres grávidas levar ao aborto espontâneo, nascimento prematuro ou infecção do neonato (LOW e DONACHIE, 1997; RYSER e MARTH, 1999).

Há relatos de desordens gastrintestinais, tais como náuseas, vômitos e diarreia, que podem preceder uma sintomatologia mais grave ou mesmo aparecerem isoladas, em humanos.

A probabilidade de mulheres grávidas contraírem a listeriose é 20 vezes superior a de adultos sãos e em pessoas com o sistema imune debilitado essa probabilidade se eleva a 300 vezes (ANON., 1998).

Supõe-se que a dose infecciosa mínima para a listeriose de origem alimentar seja de 1000 células, porém este nível ainda não é de consenso entre os pesquisadores (CLIVER, 1990; ANON., 1992; ROCOURT *et al.*, 2000).

No entanto, na França, de outubro de 1999 a fevereiro de 2000 o consumo de "rillettes" (patê a base de carne) contendo < 10UFC/g de *L. monocytogenes* sorotipo 4b foi responsável por um surto de listeriose em 10 pessoas, sendo nove delas pertencentes ao grupo de risco (VALK *et al.*, 2001).

Já em 2001, em Los Angeles, EUA, num surto de gastroenterite devido a *L. monocytogenes* a média de idade dos enfermos foi de 15,5 anos, os sintomas foram dores musculares, dor de cabeça, febre, diarreia e vômito, tendo sido incriminada carne de peru fatiada contendo $1,6 \times 10^9$ UFC/g de *L. monocytogenes* (FRYE *et al.*, 2002).

Infecções de pele, particularmente em fazendeiros ou veterinários, após o manuseio de bezerros ou material de abortos contaminados, já foram descritas (MCLAUGHLIN e LOW, 1994).

A patogenicidade da *L. monocytogenes* está relacionada principalmente à sua capacidade de sobreviver e multiplicar-se no interior das células fagocitárias do hospedeiro (RYSER e MARTH, 1999).

L. monocytogenes tem sido associada com alimentos tais como, leite cru, leite pasteurizado, queijos, sorvetes, vegetais crus, embutidos de carne, frango cru e cozido, carne crua e peixes crus ou defumados. Sua habilidade de se desenvolver em temperaturas tão baixas quanto 3°C, permite sua multiplicação em alimentos refrigerados (RORVIK e YNDESTAD, 1991; SANAA *et al.*, 1993; NORRUNG *et al.*, 1999; PETERSEN e MADSEN, 2000; DESTRO, 2000).

Nos EUA onde há uma rede eficiente de monitoramento de doenças veiculadas por alimentos, estima-se que ocorram pelo menos 2500 casos de listeriose com 500 mortes por ano, representando assim 28% das mortes causadas por enfermidades transmitidas por alimentos naquele país (CDC, 2005).

Em mamíferos a listeriose leva a sintomatologia nervosa e reprodutiva/abortiva, além de causar mastite e contaminar o leite (CORRÊA e CORRÊA, 1992; LOW e DONACHIE, 1997). Um fato agravante é que *L.*

monocytogenes pode causar mastite sub-clínica em vacas e desta forma pode ocorrer a disseminação desta bactéria para todo o rebanho atingindo até o laticínio (WINTER *et al.*, 2004).

No Brasil, vários trabalhos demonstraram que existe a contaminação por *Listeria* sp. nos mais diversos alimentos: leite e derivados (TUÑÓN e VANETTI, 2000; CATÃO e CEBALLOS, 2001; BRIGIDO *et al.*, 2004); vegetais (CALIL, 1997 e FRÖDER *et al.*, 2003); pescados (DESTRO, 2000), carnes e derivados (BARROS *et al.* 2003a; CHIARINI *et al.*, 2004; SAKATE *et al.*, 2003).

A ocorrência de listeriose humana no Brasil tem sido relatada, porém ainda nenhum caso foi detalhadamente investigado para se determinar a origem da infecção.

A presença de portadores entre a população brasileira já foi verificada na cidade de Uberaba – MG, onde TAVARES-NETO *et al.* (1996) testaram amostras de sangue de 445 indivíduos sadios empregando antisoro anti-*Listeria* e verificaram que 17,1% destes possuíam estes anticorpos. Eles puderam ainda constatar que a maioria reagiu ao sorotipo 1/2a.

Três casos de meningite por *L. monocytogenes* foram relatados no Distrito Federal sendo dois adultos e um em recém nascido, um dos adultos vindo a óbito. Relatou-se além dos sinais neurológicos, um caso diarréico. As cepas testadas pertenciam aos sorotipos 4b e 1/2 a (HOFER *et al.*, 1998). LANDGRAF *et al.* (1999) também relataram casos de meningite devido a *L. monocytogenes* em cinco neonatos, sendo os isolados pertencentes ao sorotipo 4b.

Na região de Campinas, SP, *L. monocytogenes* foi isolada de nove pacientes, sendo oito adultos e um recém-nascido. Nove das dez cepas isoladas pertenciam ao sorotipo 4b e uma ao 1/2a. Através da análise do perfil de macrorestrição por PFGE; quatro “clusters” puderam ser identificados, não havendo entretanto relação temporal ou espacial entre as cepas (LEME-MARQUES *et al.*, 2004).

Pessoas transplantadas também estão no grupo de risco para *L. monocytogenes* pelo fato de receberem medicamentos imunossupressores. De abril a dezembro de 1985 foram detectados em um hospital de SP, 5 casos de

listeriose em pacientes submetidos a transplante renal, sendo os isolados pertencentes aos sorovares 4b e 1/2a (HOFER *et al.*, 1999).

Outra forma característica de manifestação da listeriose é o aborto, sendo assim SCHWAB e EDELWEISS (2003) analisaram 10 placentas provenientes de abortos ou partos prematuros no Hospital das Clínicas de Porto Alegre em 2000, encontrando *L. monocytogenes* em 5/10 (50%) amostras.

1.5. *Listeria* na produção primária

Na produção primária de animais de abate *L. monocytogenes* tem sido isolada desde o alimento ingerido por eles até nas suas fezes.

O confinamento dos animais pode favorecer a disseminação de *Listeria* e de outros microrganismos patogênicos, no rebanho. Num estudo realizado com bovinos confinados em Nebraska, EUA, detectou-se uma média de 22% de fezes de animais contaminadas com *Listeria* spp., sendo 2,2% positivas para *L. monocytogenes*, estando os animais clinicamente sadios (SIRAGUSA *et al.*, 1993).

Outro levantamento da presença de *L. monocytogenes* em fezes de gado bovino abatido foi realizado na Iugoslávia e mostrou que 24% das amostras foram positivas para esta bactéria (BUNCIC, 1991). Na província de Elaziğ, Turquia, KALENDER (2003) analisou 130 amostras de fezes de bovinos destinados ao abate e obteve 1,53% de amostras positivas para *L. monocytogenes*, sendo 58,33% do sorotipo 1 e 41,66% do 4.

Em uma revisão sobre a presença de *Listeria* no Japão, OKUTANI *et al.* (2004) relataram que em um dos trabalhos avaliados nenhuma amostra de fezes de bovinos, dentre as 244 amostras analisadas, estava contaminada por *L. monocytogenes*.

No Brasil, HOFER *et al.* (2000) analisaram cepas de *Listeria* sp., recolhidas entre 1971 a 1997 e verificaram que 40,2% das cepas de *Listeria* isoladas de gado bovino aparentemente sadio, de diferentes propriedades, eram *L. monocytogenes*.

Outro ponto a ser analisado, principalmente no que diz respeito a criação intensiva, é a silagem, pois quando de baixa qualidade pode favorecer a proliferação de *Listeria*. Há evidências de que a silagem fornecida aos animais possa ser veiculadora de *L. monocytogenes* (PERRY e DONNELLY, 1990) e há também relatos de que a silagem seja a fonte dessa contaminação na fazenda (KALAC, 1982; DICKSON e MACNEIL, 1991). Quando animais que antes se alimentavam de pastagens começaram a ingerir silagem, observou-se um aumento na excreção de *L. monocytogenes* nas fezes (FENLON *et al.*, 1996). Animais alimentados com silagem contaminada podem ser portadores da bactéria e disseminá-la no rebanho, assim como no leite (PERRY e DONNELLY, 1990; MANZANO *et al.*, 1998; BOVILL *et al.*, 2000).

Em Vermont, EUA, PERRY e DONNELLY (1990) detectaram a presença de *L. monocytogenes* em 2,9% das amostras de silagem. Na Escócia, FENLON (1985) encontrou, em 1983, 2,5% das amostras examinadas de silagem contaminadas por *L. monocytogenes* e em 1984, 5,9% das amostras.

WIEDMANN *et al.* (1996) constataram que *L. monocytogenes* veiculada por silagem era a principal causa de listeriose em gado bovino.

Analisando amostras de silagem com diferentes pHs, PERRY e DONNELLY (1990) puderam evidenciar a influência deste parâmetro na qualidade microbiológica da silagem. Dentre as amostras com pH abaixo de 5,0, 13% continham *Listeria* e nas amostras com pH acima de 5,0 este percentual subia para 64%.

Fatores como concentração de carboidratos solúveis e quantidade de oxigênio presente durante o processo de ensilagem influem na fermentação e conseqüente diminuição do pH, favorecendo ou não o desenvolvimento de *Listeria* (FENLON, 1985). O crescimento de bolores e leveduras no produto também pode favorecer a elevação do pH e a multiplicação de *Listeria* (KALAC, 1982).

Quando a ração fornecida aos animais, seja ela silagem ou concentrado, está contaminada por *L. monocytogenes* o nível de excreção pelas fezes aumenta, sendo que quando a ração tem baixa ou nenhuma

contaminação, os animais tendem a não se contaminar e consequentemente a não excretar *L. monocytogenes* em suas fezes (RYSER e MARTH, 1999).

A contaminação que ocorre na fazenda pode ser levada ao frigorífico e consequentemente ser passada à carcaça.

1.6. *Listeria* na indústria

Animais portadores que apresentarem *Listeria* no trato gastrointestinal podem ter a superfície das suas carcaças contaminada durante os procedimentos de abate. Além disto eles podem contribuir para a contaminação do ambiente, utensílios e equipamentos que porventura entrem em contato com as fezes contaminadas. Se os animais destinados ao abate chegarem ao matadouro com um baixo nível de contaminação, o risco desta disseminação ocorrer será reduzido.

O estresse causado pelo transporte de gado por longas distâncias pode influenciar na excreção de *L. monocytogenes*. FENLON *et al.* (1996) observaram um aumento no nível de excreção fecal de *L. monocytogenes* dos animais submetidos a este transporte, porém a contaminação das carcaças não foi alta. Neste mesmo estudo *L. monocytogenes* foi observada em 91% (21/23) das amostras de carne moída, demonstrando que o processamento pode aumentar significativamente o nível de contaminação do alimento quando comparado à carcaça.

O Food Safety and Inspection Service (FSIS) do United States Department of Agriculture (USDA) dos Estados Unidos da América, realizou de outubro de 1992 a setembro de 1993 uma extensa pesquisa sobre a presença de vários patógenos em carcaças de novilhos e novilhas confinados em aproximadamente 100 estabelecimentos sob inspeção federal daquele país, coletando as amostras após o período de refrigeração. Das 2089 carcaças amostradas 86 (4,1%) estavam contaminadas por *L. monocytogenes* (ANON., 1994).

Outro grande levantamento sobre a presença de microrganismos patogênicos em carcaças de bovinos abatidos nos EUA foi realizado entre

dezembro de 1993 e novembro de 1994 também pelo FSIS/USDA. Eles verificaram que 238 (11,3%) das 2112 carcaças analisadas apresentaram *L. monocytogenes* como contaminante (ANON., 1996), um incremento de 2,8 vezes ao encontrado no período anterior.

Ainda nos EUA, um estudo comparou a presença de vários patógenos, dentre eles a *L. monocytogenes*, em dois matadouros de bovinos geograficamente distantes. Os pesquisadores verificaram que em 18,7% das amostras de couro dos animais de um dos matadouros havia *L. monocytogenes*, porém nas amostras de carcaças do mesmo matadouro houve apenas 1,1% de positividade. Já nos animais e carcaças do outro estabelecimento não se isolou *L. monocytogenes* (RIVERA-BETANCOURT *et al.*, 2004).

Na Austrália durante um período de 12 meses VANDERLINDE *et al.* (1998) coletaram amostras de 1063 carcaças bovinas em 49 matadouros e verificaram que somente 0,59% das destinadas a exportação estavam contaminadas por *L. monocytogenes*.

Uma pesquisa realizada na Irlanda do Norte, em dez matadouros bovinos, verificou que nas 200 carcaças analisadas não havia a contaminação por *Listeria monocytogenes*, sendo 5 contaminadas por *L. innocua* e uma por *L. seeligeri* (MADDEN *et al.*, 2001).

No Japão foram examinadas 4106 amostras de carcaças bovinas e 202 (4,9%) amostras foram positivas para *L. monocytogenes* (OKUTANI *et al.*, 2004).

No Brasil a região Centro-Oeste é a maior produtora de carne bovina do país. Num estudo realizado na cidade de Goiânia/GO, no período compreendido entre agosto de 1989 e julho de 1990, coletou-se em um matadouro frigorífico de grande porte, sob Inspeção Federal, 70 amostras de tecido muscular bovino e 30 de água residuária, oriunda da lavagem de metacarcaças. Nenhuma cepa de *Listeria* foi isolada a partir das amostras de carne bovina, mas uma amostra de água residuária revelou-se positiva para *L. innocua*. Foram também analisadas 50 amostras de carne bovina moída,

sendo 4,1% positivas para *L. innocua* não tipável sorologicamente e 4,1% positivas para *L. monocytogenes* sorovar 1/2 b (ALBENONES, 1991).

A presença de *Listeria* sp foi pesquisada por PICCHI *et al.* (1999) em carne bovina resfriada. Por intermédio de *swab*, eles coletaram 25 amostras das superfícies das peças, em cinco lotes de quartos dianteiros de bovinos desossados. Todos os quartos dianteiros eram provenientes de estabelecimentos sob Inspeção Federal permanente do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Confirmou-se a presença de *Listeria* spp em 24 (96%) amostras e, identificadas as espécies, ficaram distribuídas nas seguintes proporções: *L. innocua* (56%), *L. monocytogenes* (20%), *L. welshimeri* (8%), *L. grayi* (8%) e *L. seeligeri* (4%).

Em estudo semelhante realizado na Universidade Federal de Pelotas, RS, LOGUERCIO *et al.* (2000) pesquisaram a presença de *Listeria* spp em 60 amostras coletadas com auxílio de *swabs* das superfícies de carcaças bovinas, de 12 lotes de meia-carcaças, provenientes de estabelecimentos sob Inspeção Sanitária permanente. A presença de *Listeria* spp foi confirmada em 43 (71,67%) amostras analisadas, sendo destas: *L. innocua* (65,12%), *L. monocytogenes* (16,28%), *L. welshimeri* (11,63%), *L. grayi* (4,65%) e *L. seeligeri* (2,32%).

BARROS *et al.* (2003a) coletaram, em um matadouro no norte do Paraná, 62 amostras de meias-carcaças bovinas e verificaram que 6 (9,7%) estavam contaminadas com *L. monocytogenes* e 5 (8,1%) com *L. innocua*. Em outro estudo (BARROS *et al.*, 2003b) estes pesquisadores coletaram amostras de equipamentos e ambiente de 5 estabelecimentos da região norte do Paraná para avaliar a ocorrência de *Listeria* spp. no ambiente de processamento de carne bovina. *Listeria* spp foi isolada em 39 (45,3%) amostras, sendo 3 (3,5%) contaminadas com *L. monocytogenes*, 24 (27,9%) com *L. innocua*, 9 (10,5%) com *L. welshimeri*, 2 (2,3%) com *L. seeligeri* e 1 (1,2%) com *L. grayi*. *L. monocytogenes* foi encontrada em 2 caixas para acondicionamento de cortes e em 1 amaciador. As amostras de ambiente, equipamentos e utensílios contaminadas pelas outras espécies foram de pisos, paredes, ralos, serras, moedores, balança, balcão refrigerador, misturador de massa para embutidos, embutideiras, caixas, facas, mesas e amaciadores (BARROS *et al.*, 2003b).

O ambiente de abate, equipamentos, utensílios e pessoal podem ser fontes de contaminação cruzada de *L. monocytogenes* para a carne, sendo que estudo realizado em diversos frigoríficos bovinos, de frangos e pescado no norte europeu constatou a presença de *L. monocytogenes* entre 0 a 24,1 % do total de amostras examinadas e entre 0 a 12,4% se forem consideradas apenas as amostras de matadouros bovinos (SUIHKO *et al.*, 2002).

Devido à gravidade da doença provocada por *L. monocytogenes*, todos os esforços para evitar a contaminação durante a manipulação/processamento de alimentos devem ser feitos. Além disto deve-se evitar também a contaminação cruzada do alimento termoprocessado pronto para o consumo.

O levantamento da ocorrência da *L. monocytogenes* em indústrias processadoras de alimentos é de fundamental importância uma vez que a *Listeria* tem grande capacidade de formar biofilmes tanto em superfícies plásticas quanto em aço inoxidável que entram ou não em contato com os alimentos (SOMMERS e WONG, 2004; MOLTZ e MARTIN, 2005).

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

Testando a capacidade de aderência e subsequente formação de biofilmes por cepas de *L. monocytogenes*, LUNDÉN *et al.* (2000) verificaram que cepas persistentes, ou seja, aquelas que são repetidamente isoladas de um determinado local, são de 2 a 11 vezes mais aderentes a aço inoxidável que cepas não persistentes, constatando assim que cepas persistentes de *L. monocytogenes* são capazes de se adaptar ao meio mais rapidamente que as não persistentes. BORUCKI *et al.* (2003) verificaram a maior capacidade de cepas persistentes em formar biofilmes.

Cepas persistentes e não persistentes de *L. monocytogenes* originárias de três indústrias processadoras de carnes foram estudadas por LUNDÉN *et al.* (2003). Eles verificaram que todas as indústrias apresentavam cepas persistentes e não persistentes, sendo que a maioria (13/15) das cepas persistentes foi encontrada mais de uma vez no produto final. Eles observaram

ainda que a proporção de cepas persistentes em produtos tratados termicamente era oito vezes maior que na matéria prima e que frigoríficos com menor nível de compartimentalização tendem a ter um maior nível de contaminação por *L. monocytogenes* persistente.

Na Noruega, NESBAKKEN *et al.* (1996) estudaram a disseminação de *L. monocytogenes* em seis frigoríficos de bovinos e verificaram que certas cepas isoladas na área refrigerada de quatro frigoríficos possuíam o mesmo perfil eletroforético de cepas freqüentemente isoladas de pacientes daquele país, demonstrando assim que as bactérias presentes na área de processamento podem contaminar o alimento e ser responsável por infecções humanas.

Trabalho de HEIR *et al.* (2004) também evidenciou, através de PFGE, contaminação cruzada. Cepas isoladas antes e após o tratamento térmico da carne apresentaram o mesmo perfil molecular, o mesmo ocorrendo com dez isolados humanos e da indústria.

SAUDERS *et al.* (2004) analisaram cepas de *L. monocytogenes* isoladas no comércio e cepas isoladas de humanos no Estado de Nova York, EUA. Os pesquisadores verificaram que a 17 dos 48 ribotipos encontrados entre os isolados pertenciam cepas tanto de origem humana quanto de alimentos e ambiente, denotando a possibilidade de cepas ligadas a alimentos e/ou ambiente do comércio varejista serem encontradas também em casos de listeriose em humanos.

1.7. *Listeria* sp. em carne e derivados

A contaminação que ocorre durante o abate e manipulação da carne pode permanecer no produto cru ("*in natura*") ou processado pronto para consumo. Numa pesquisa realizada na Iugoslávia, com carne moída, verificou-se que 69% das amostras estavam contaminadas com *L. monocytogenes* (BUNCIC, 1991). NORRUNG *et al.* (1999) verificaram, na Dinamarca, uma taxa de 12,3% de *L. monocytogenes* em carne crua e 23,5% em carne processada. Em Monterrey, México, 88 amostras de carne moída foram analisadas sendo

62% positivas para *Listeria* sp. e 16% para *L. monocytogenes* (HEREDIA *et al.*, 2001).

Em Portugal, MENA *et al.* (2004) analisaram 1035 amostras de alimentos, encontrando uma incidência de 7% (72 amostras) de contaminação por *L. monocytogenes*. Ainda neste trabalho os autores constataram que 3/17 (17,7%) das amostras de carne crua estavam contaminadas com o patógeno.

No Japão, OKUTANI *et al.* (2004) realizaram uma revisão na literatura daquele país sobre a presença de *Listeria* em alimentos. Os autores encontraram trabalhos relatando a presença de *Listeria* em 5,1% de peças inteiras de carne contra 22 e 27% da carne moída e fatiada, respectivamente. Os pesquisadores ressaltaram que mesmo encontrando níveis altos de contaminação a taxa de morbidade (0,65 casos/milhão de habitantes) se mantém aquém de outros países como por exemplo a França que em 1997 teve 4,1 por milhão de habitantes.

No Brasil, a contaminação dos produtos de origem animal, em especial os cárneos, não foge à regra mundial, podendo ser detectada *Listeria* spp. nos produtos crus ou processados. A ocorrência de *Listeria* spp. foi avaliada por BERSOT *et al.* (2001) em 30 amostras de mortadelas de cinco marcas diferentes adquiridas no comércio varejista de São Paulo, encontrando 26,7% de amostras com *L. monocytogenes*. Ainda neste estudo verificaram, após inocularem *L. monocytogenes* no interior do produto, que quando o processamento térmico atingia 74 °C, nenhuma *Listeria* era isolada.

Amostras de carne e derivados, adquiridas no comércio da cidade de São Paulo, foram coletadas e analisadas por ARAGON *et al.* (2003). *Listeria* sp. foi encontrada em 65,8% das 120 amostras e *L. monocytogenes* em 48,3%.

Os produtos prontos para consumo devem receber especial atenção, geralmente não são submetidos a um tratamento térmico antes do consumo o que permitiria a eliminação de *Listeria*. Quantificando *L. monocytogenes* em salames fatiados embalados a vácuo de marcas e tipos diferentes, SAKATE *et al.* (2003) encontraram nas 45 amostras analisadas três (6,7%) com população

de 9,2 NMP/g, sendo dois isolados pertencentes ao sorotipo 1/2a e um ao 1/2b.

BARROS *et al.* (2003a) selecionaram 5 estabelecimentos no norte do Paraná para coletarem as amostras: 1 matadouro-frigorífico, 1 distribuidora e 3 casas de carne. Das amostras de cortes comerciais, 21 no total, 1 (4,8%) estava contaminada com *L. monocytogenes* e 4 (19,0%) com *L. innocua*. Das 7 amostras de embutidos, 2 (28,5%) apresentaram contaminação por *L. monocytogenes* e 2 (28,5%) por *L. innocua*.

Refeições servidas a bordo de aeronaves contendo preparações com carne bovina já foram avaliadas quanto a qualidade microbiológica. ZANARDI (2002) isolou *Listeria* spp em 6% (3/50) das amostras e *L. monocytogenes* em 2% (1/50).

A globalização fez com que o comércio internacional de produtos alimentícios se elevasse, gerando com isto um aumento no risco de disseminação de patógenos tais como a *Listeria*. Isto pode ser observado em trabalho realizado na Coreia, onde os pesquisadores coletaram amostras de diferentes produtos cárneos oriundos de diversos países e verificaram a presença deste microrganismo tanto nos alimentos importados como nos nacionais. Eles verificaram também que algumas das cepas provenientes de diferentes regiões eram de mesmo sorotipo e apresentavam o mesmo perfil molecular por RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) (BYUN *et al.*, 2001).

Os produtos contaminados, provenientes dos frigoríficos, podem levar microrganismos patógenos ao varejo e até mesmo ao refrigerador doméstico, tornando-se assim uma fonte de contaminação cruzada para outros alimentos. Isto foi demonstrado em uma pesquisa realizada na Grécia, onde verificou-se a contaminação por *L. monocytogenes* em refrigeradores comerciais e domésticos (SERGELIDIS *et al.*, 1997).

Uma forma de se verificar a disseminação de patógenos na cadeia produtiva está baseada na utilização de técnicas de biologia molecular. Estas técnicas têm sido amplamente utilizadas nos estudos epidemiológicos de doenças de origem alimentar, possibilitando, assim, a comparação em nível molecular das cepas isoladas tanto dos indivíduos acometidos quanto dos

alimentos por eles ingeridos. Elas também têm sido utilizadas para identificar a provável fonte de contaminação dos alimentos, permitindo a aplicação de medidas preventivas de controle. Dentre estas técnicas de subtipagem molecular utilizadas encontra-se a eletroforese em campo pulsado (“Pulsed-Field Gel Electrophoresis – PFGE”).

1.8. PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis – Eletroforese em Campo Pulsado)

A PFGE vem sendo largamente empregada nos países desenvolvidos. Nos EUA, já existe uma rede de levantamento de dados epidemiológicos (“PulseNet”) baseada nos resultados obtidos com a PFGE de vários microrganismos patogênicos, dentre eles a *L. monocytogenes*. A técnica empregada é padronizada, o que permite a comparação dos dados obtidos pelos diversos laboratórios participantes (GRAVES e SWAMINATHAN, 2001).

A PFGE é considerada um “Gold Standard” dentre as técnicas moleculares, tendo um alto poder discriminatório. AARNISALO *et al.* (2003) compararam a eficiência de PFGE e de ribotipagem para cepas de *L. monocytogenes* e verificaram que a primeira demonstrou ter um poder discriminatório maior que a segunda. HARVEY *et al.* (2004) compararam a PFGE com outras duas técnicas para tipagem molecular de *L. monocytogenes*, a MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis – Eletroforese de Enzima Multilocos) e a rep-PCR também chegando a conclusão que a PFGE tem um maior poder discriminatório.

A PFGE é uma ferramenta versátil nas investigações epidemiológicas e útil na comparação de cepas à primeira vista distintas, conforme foi demonstrado por BORUCKI *et al.* (2004). Analisando por PFGE cepas de *L. monocytogenes* isoladas de propriedades rurais e cepas isoladas em casos esporádicos e surtos em humanos eles verificaram que aquelas propriedades eram reservatórios de *L. monocytogenes*, pois 23% das cepas isoladas das propriedades e de casos/surtos tinham o mesmo perfil genético.

Verifica-se assim que desde a fazenda até o comércio varejista pode-se isolar *Listeria* e principalmente *L. monocytogenes*. Observa-se ainda que em

outros países já se fez a associação entre cepas isoladas de alimentos e cepas isoladas de humanos através de técnicas moleculares, ressaltando assim a relevância do estudo da epidemiologia desta bactéria desde a produção primária até a indústria.

2. OBJETIVOS

- Realizar o levantamento da presença de *L. monocytogenes* no confinamento do Novilho Superprecoce;
- Verificar a presença de *L. monocytogenes* em carcaças de animais abatidos e no ambiente de frigoríficos sob Inspeção Federal;
- Avaliar a diversidade sorológica e genética das cepas isoladas;
- Traçar as possíveis rotas de disseminação da bactéria desde o processo de criação até o abate.

3. MATERIAL e MÉTODOS

3.1. Material

Este trabalho foi conduzido com um total de 433 amostras de fezes, ambiente, ração final e seus componentes e água, coletadas no galpão de confinamento de novilhos da Fazenda Lageado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu – SP. Para isto utilizamos novilhos pertencentes a cinco diferentes raças, denominadas: R1, R2 e R3 (animais puros) e R4 e R5 (animais mestiços R1xR2 e R1xR3, respectivamente); sendo 12 animais por raça. Foram também avaliadas 192 amostras de carcaças dos mesmos Novilhos Superprecoces abatidos em um frigorífico comercial (A) no Estado de São Paulo, assim como 20 amostras de utensílios, equipamentos e ambiente deste estabelecimento.

Em um outro frigorífico (B) foram coletadas um total de 516 amostras referentes a carcaças, cortes, peças de carne desossadas, equipamentos, utensílios e ambiente. As coletas foram realizadas em cinco diferentes meses.

A primeira etapa, com os Novilhos Superprecoces, foi realizada de março de 2002 a maio de 2003 e a segunda, no frigorífico B, de janeiro a agosto de 2004.

3.1.1. Coleta de amostras ambientais e de água antes da entrada dos animais

Após realizado o delineamento experimental, foi feita uma visita ao galpão de confinamento (Figura 1) para se definir os pontos de amostragem antes da entrada dos animais.

Os pontos escolhidos foram:

- Corredor de acesso lateral direito
- Corredor de acesso lateral esquerdo

- Quatro baias sorteadas dentre as 26 existentes no galpão
- Cocho destas baias sorteadas
- Água do bebedouro destas quatro baias
- Água da caixa abastecedora central

Os corredores laterais foram amostrados separadamente utilizando-se moldes estéreis de 10x10 cm e esponja de celulose pré-umedecida para amostragem, estéril, com haste (INTL Bioproducts). Utilizou-se uma esponja com haste e um molde para cada corredor, sendo que estes foram amostrados em dois pontos que foram considerados como uma amostra. A esponja era depositada em sua embalagem plástica estéril, tomando-se o cuidado de quebrar a haste plástica adequadamente.

Os pisos das quatro baias sorteadas também foram amostrados com esponjas conforme descrito anteriormente, porém foram coletadas amostras de cinco pontos distintos (um central e quatro laterais) de cada piso com uma mesma esponja, sendo a amostra considerada única por baia.

Os cochos de cada baia foram amostrados em seis pontos diferentes conforme já descrito, que também foram considerados como amostra única por cocho.

A água dos bebedouros foi coletada em frascos de vidro esterilizados, assim como a água da caixa central, proveniente de poço artesiano contíguo.

Todas as amostras coletadas ao longo dos experimentos foram mantidas em caixas isotérmicas com gelo reciclável até serem transportadas ao laboratório.

A												
1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25
B												
2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26
A												

Figura 1. Representação do galpão de confinamento da FMVZ-UNESP-Botucatu. A – corredores laterais, B – corredor central, Baías enumeradas de 1 a 26 (16 m² cada)

3.1.2. Coleta de amostras de fezes de conjunto

Aproximadamente de dois a três dias após a chegada de um lote de animais à fazenda, foi realizada a coleta de fezes de conjunto. Optou-se pela realização da análise de fezes de conjunto como forma de evitar a manipulação individual dos animais que por muitas vezes chegavam estressados pela longa viagem e não estavam adaptados ao novo ambiente de criação e com o pessoal de manejo.

Esta coleta foi realizada na parte inferior do piso das baias, onde se encontravam os animais escolhidos. Este piso é formado por lajes de concreto na forma de estrado por onde as fezes caem em um piso de cimento onde puderam ser amostradas. Foi adaptado um copo coletor estéril na extremidade de um tubo de cerca de três metros de comprimento e com ele realizou-se a coleta em cinco pontos distintos na região correspondente a baia. As amostras (5) coletadas sob cada baia foram tratadas como amostras independentes.

3.1.3. Coleta de amostras individuais de fezes

Depois da chegada e adaptação de todos os animais selecionados, foram realizadas coletas mensais das fezes de cada animal conforme descrito a seguir.

Conduziam-se grupos de seis animais da mesma baia ao tronco de manejo, situado logo ao lado do galpão e por palpação retal era retirada uma amostra de fezes de cada animal que era imediatamente depositada em saco de amostragem estéril (Nasco) ou em copo coletor estéril identificado com o número do animal. As amostragens foram realizadas utilizando-se luvas de látex descartáveis para cada animal.

3.1.4. Coleta de amostras de água, ração e seus componentes durante o confinamento

A água dos bebedouros das baias, onde os grupos de animais escolhidos eram mantidos, foi coletada mensalmente em frascos de 250 mL estéreis, cerca de 15 dias após a coleta individual de fezes. O mesmo volume de água do reservatório central também era coletado no mesmo dia.

Cerca de 100g de cada componente da ração (milho, feno, silagem de milho, concentrado, caroço de algodão e polpa cítrica) e a ração final pronta também foram coletadas aleatoriamente, em sacos de amostragem previamente identificados, a partir de seus respectivos locais de armazenamento e/ou distribuição, 15 dias após cada coleta individual de fezes.

Armaram-se também armadilhas para roedores, porém nenhum roedor foi capturado.

3.1.5. Coleta de amostras no frigorífico A

À medida que os animais atingiam o peso determinado para o abate eles iam sendo encaminhados ao matadouro em lotes correspondentes às raças e assim que era informado o local do abate realizou-se uma visita prévia para poder determinar os pontos de coleta de amostras.

A coleta de amostras das carcaças foi realizada utilizando-se a mesma metodologia para todos os animais abatidos. Na linha de abate, logo após a etapa de inspeção da carcaça e antes da pesagem realizava-se o esfregaço em três pontos distintos (posterior, vazio e anterior) (Figura 2) da face lateral com esponja de amostragem (INTL Bioproducts) reidratada com 10 mL de solução salina 0,85% (p/v) utilizando um delimitador plástico estéril (INTL Bioproducts) de 100 cm². O mesmo procedimento era repetido para a outra meia carcaça correspondente. Na face medial da carcaça, também com

esponja, dois pontos (abdômen e tórax) foram amostrados nas duas meias carcaças. Assim, cada carcaça gerou duas amostras, uma correspondente a superfície externa e outra interna. Coletou-se também a cada abate, por esfregação superficial, com o uso de esponja umedecida em salina 0,85%, amostras da faca de sangria, faca de esfola e serra de carcaça.

No dia seguinte ao abate de cada lote, retornava-se ao frigorífico para a coleta de amostras das carcaças refrigeradas, sendo esta realizada da mesma maneira e nas mesmas regiões das carcaças do dia do abate. Foram coletadas, também, amostras do piso e das paredes da câmara frigorífica através do esfregação com esponja umedecida em caldo Letheen (Difco) em 100 cm² da superfície. O armazenamento e transporte do material amostrado foi efetuado como citado anteriormente.

Figura 2. Pontos de coleta de amostras nas carcaças – 3 externos e 2 internos.

3.1.6. Coleta de amostras no frigorífico B

As coletas e análises microbiológicas das amostras foram realizadas com base nos procedimentos indicados pelo USDA-FSIS (ANON., 1994).

As coletas de amostras foram realizadas em duas etapas consecutivas. No primeiro dia coletavam-se amostras na área de abate (área suja) e no segundo a partir da câmara frigorífica até a sala de desossa (área limpa), para que se obtivessem amostras relativas ao mesmo lote de abate. Este procedimento foi realizado da mesma forma em cada um dos cinco meses de coleta.

No primeiro dia, eram coletadas amostras de carcaças e de todos utensílios e equipamentos que entravam em contato com as mesmas, além de amostras ambientais. Na Figura 3 encontra-se representado o diagrama de abate e na Tabela 1 os pontos amostrados.

As amostragens de carcaças foram realizadas do mesmo modo que as coletadas no frigorífico A.

As facas das salas de abate, corte e desossa, foram amostradas com esponja, conforme anteriormente descrito, realizando-se cerca de cinco esfregaços em cada lado das lâminas com esponja embebida em salina; o mesmo foi feito com as serras. As luvas de malha de aço foram amostradas esfregando-se uma esponja tanto na palma, quanto no dorso e também entre os dedos.

Nas mesas e esteiras da desossa, as amostras foram coletadas em cinco pontos diferentes por esfregaço de esponja umedecida em salina, utilizando-se também o delimitador plástico de 100 cm² em cada ponto.

As amostras de ambiente (piso e parede) foram amostradas como no frigorífico A.

Figura 3. Diagrama simplificado de abate do frigorífico B com os pontos de coleta de amostras.

Tabela 1. Pontos de amostragem em cada um dos dois dias de coleta no frigorífico B e ponto de coleta correspondente.

Linha Abate (primeiro dia)	Área Refrigerada (segundo dia)
1. Faca sangria (U1) ^a	Câmaras frias
2. Facas esfolia 1 (U2)	1. 8 a 12 carcaças refrigeradas (externa e interna) (C2)
3. Facas esfolia 2 (U3)	2. Pisos das câmaras frias (A4)
4. Facas esfolia 3 (U4)	3. Paredes das câmaras frias (A4)
5. Máquina esfolia (U5)	Sala corte
6. Faca oclusão do reto (U6)	4. Superfície de corte dos quartos (P1)
7. Faca excisão cabeça (U7)	5. Faca (U13)
8. Serra peito (U8)	6. Serra circular (U13)
9. Faca retirada esôfago (U9)	7. Serra fita (U13)
10. Facas evisceração (U10)	8. Piso (A5)
11. Serra carcaça (U11)	Sala desossa
12. Facas toalete 1 (U12)	9. Mesas (U14)
13. Facas toalete 2 (U12)	10. Facas (U14)
14. 10 Carcaças (Medial e Lateral) ^b (C1)	11. Luvas de aço (U14)
15. Piso (A1)	12. Esteiras rolantes (U14)
16. Escada acesso (A2)	13. Peças de carne (P2)
17. Calha enxágüe (A3)	14. Piso (A6)
18. Parede enxágüe (A3)	15. Ralo (A6)

^a Consultar Fig.2 para localização dos pontos. ^b Cada carcaça foi amostrada tanto na face medial quanto na lateral.

Na linha de abate foram coletadas amostras de ambiente (piso, escada de acesso, parede e calha do túnel de enxágüe) utilizando-se esponja (Nasco, EUA) reidratada com caldo Letheen (Difco, EUA). Os utensílios que entravam em contato com as carcaças foram amostrados através do esfregaço de esponja reidratada com solução salina 0,85% (p/v), sendo eles: faca de sangria, facas de esfolia, faca da oclusão do reto, faca da retirada da cabeça, faca de liberação do esôfago, facas da evisceração e facas da "toalete" final. Os equipamentos (máquina de esfolia, serra de peito e serra de carcaça) também foram amostrados com o uso de esponja embebida em sol. salina.

Este procedimento foi realizado duas vezes no mesmo dia de coleta, uma antes da amostragem das carcaças e uma após.

Entre estas duas amostragens ambientais colhiam-se amostras de pelo menos dez carcaças logo após a "toalete" final, antes da pesagem das mesmas, através do esfregaço de esponja de nitrocelulose estéril (Nasco, EUA) umedecida com 10 mL de solução salina, em três pontos distintos da porção externa de cada meia carcaça e em dois pontos da porção interna, conforme descrito para as carcaças amostradas no frigorífico A (item 3.1.5) (Figura 2).

No dia seguinte ao abate foram coletadas amostras, de oito a doze carcaças do mesmo lote abatido no dia anterior, utilizando a mesma metodologia já descrita (item 3.1.5).

As amostras do ambiente (piso e parede) das câmaras frigoríficas foram coletadas através do esfregaço de esponja reidratada com 10 mL de caldo Letheen em 4 pontos distintos de 100 cm² cada, conforme descrito no item 3.1.5.

Foram também coletadas amostras na sala de corte, tendo sido amostradas serras e facas, conforme descrito no item 3.1.5. Para a superfície de corte dos quartos dianteiros (corte 1 e 2) empregou-se esponja umedecida em salina.

Na sala de desossa, foram realizadas a amostragem de facas, luvas, esteiras e mesas, assim como de peças de carne que entraram em contato com estes utensílios e equipamentos. Também foram coletadas amostras do piso e ralo. As amostras foram todas colhidas com esponjas conforme descrito anteriormente (item 3.1.5).

Neste matadouro existem quatro conjuntos de desossa constituídos cada um de uma esteira central com duas mesas de inox paralelas a esta esteira (Figura 4), onde os (as) magarefs realizam a desossa e separação das peças de carne, utilizando facas e luvas de malha de aço. Para fins de identificação, cada conjunto (mesa, esteira, faca, luva e peça de carne) recebeu um mesmo número de forma a identificar o conjunto. As esteiras 5, 6 e 7 não pertenciam a estes conjuntos, sendo utilizadas para o transporte de aparas e ossos, ficando superiores as mesas.

Figura 4. Visão geral da sala de desossa do frigorífico B.

3.1.7. Cepas bacterianas

De um total de 547 cepas de *L. monocytogenes* isoladas das diversas amostras examinadas neste estudo, 180 foram selecionadas aleatoriamente para avaliações posteriores, sendo estas cepas representativas de todos os pontos positivos para *L. monocytogenes* ao longo do experimento. Sempre que possível, mais de uma cepa/ponto foi examinada. Além destas, 16 cepas de *L. monocytogenes* pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF/USP foram utilizadas. Todas as cepas foram mantidas a – 70 °C em caldo BHI adicionado de 20% glicerol.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Pesquisa de *Listeria* sp.

3.2.1.1. Amostras ambientais e de água do galpão de confinamento

Às embalagens com as esponjas foram adicionados 100 mL de solução de NaCl a 0,85% (p/v). Procedeu-se, então, a homogeneização manual, por cerca de 60 segundos. Alíquotas de 10 mL foram transferidas para frascos contendo 90 mL do caldo de enriquecimento seletivo primário para *Listeria* (LEB-UVM) (Oxoid). Para as amostras de água também se empregou alíquota de 10 mL.

Os frascos foram incubados a 30°C por 24 horas e uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para 9,9 mL do caldo de enriquecimento seletivo secundário Fraser (Oxoid). Após agitação em “vortex” os tubos foram incubados por 24-48 horas a 35 °C. Os tubos que se apresentavam escurecidos e com turvação após 24 horas foram considerados como positivos e uma porção foi inoculada, por esgotamento, em placas contendo ágar Oxford (Oxoid) e ágar PALCAM (Oxoid). Os tubos não escurecidos foram re-incubados até completarem 48 horas, sendo que após este período os positivos foram tratados de maneira similar ao já descrito. Aqueles tubos

negativos após 48 horas de incubação foram descartados. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas.

De 3 a 5 colônias características de cada placa de Oxford e PALCAM foram repicadas em placas de Ágar Soja Triptona (Oxoid), enriquecido com 0,6% (p/v) de extrato de levedura (Oxoid) (TSA-YE) que foram incubadas a 35°C por 24 horas. As placas foram examinadas sob iluminação inclinada transmitida (Método de Henry) empregando-se uma lupa (Olympus) para verificar a presença das colônias características de *Listeria* sp. (azuis esverdeadas e com aspecto de vidro moído). Destas placas, de 3 a 5 colônias características foram repicadas para tubos contendo TSA-YE inclinado que foram incubados a 35 °C por 24 horas. Os tubos foram estocados sob refrigeração para posterior identificação bioquímica dos isolados.

3.2.1.2. Amostras de fezes

As amostras de fezes, tanto de conjunto como individuais, foram submetidas a uma vigorosa homogeneização e 10g de cada amostra foram pesados e transferidos para saco de amostragem (Nasco-Whirl-Pak) estéril contendo 90 mL do caldo LEB-UVM. As amostras foram manualmente homogeneizadas no caldo de enriquecimento seletivo e tratadas conforme item 3.2.1.1.

3.2.1.3. Amostras do frigorífico A

Aos sacos contendo as esponjas utilizadas para a coleta de amostras no frigorífico acrescentavam-se 100 mL de solução salina 0,85%, deixando-se homogeneizar por 1 minuto no homogeneizador a pistão. 10 mL do homogenato foram adicionados a 90 mL do LEB-UVM, seguindo a partir deste ponto a metodologia já descrita para a pesquisa de *Listeria* sp.

3.2.1.4. Amostras do frigorífico B (ANON., 2002)

No laboratório, 200 mL de caldo de enriquecimento para *Listeria* (LEB-UVM, Difco) foram adicionados às embalagens contendo o material amostrado e foram

homogeneizados e incubados a 30°C por 24 horas, seguindo-se deste ponto o mesmo procedimento descrito em 3.2.1.1.

3.2.2. Identificação bioquímica

Antes da realização das provas bioquímicas as cepas eram reativadas em caldo cérebro coração (BHI) (Oxoid) que foi incubado a 37°C por 24 horas. A seguir eram isoladas em placas contendo TSA-YE, incubadas por 24 horas a 37°C e novamente examinadas sob luz transmitida a 45°.

Uma colônia característica da placa de TSA-YE era transferida com agulha de níquel-cromo para placas contendo ágar púrpura de bromocresol adicionado dos carboidratos, manitol, xilose, dextrose e ramnose; ágar sangue de cavalo e uma placa de TSA-YE. Simultaneamente inoculava-se ágar motilidade. As placas eram incubadas a 37°C por 24 horas e o teste da motilidade a 25°C por até 7 dias (JOHNSON, 1998).

Todas as cepas identificadas como *L. monocytogenes* foram armazenadas em glicerol 20% a -70 °C para posterior caracterização molecular e sorológica.

3.2.3. Identificação dos sorotipos de *L. monocytogenes* (DOUMITH *et al.*, 2004)

- Lise das células

180 cepas isoladas neste estudo e 16 provenientes de outro estudo realizado no laboratório (ANDRIGHETO, 2000) foram ativadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Oxoid) por 24 horas a 37 °C. Após o crescimento, o caldo foi centrifugado a 10.000 x g por 2 min e as células lavadas por duas vezes com solução salina. As células foram ressuspensas em 1 mL de água ultrapura (Milli-Q, Millipore) estéril e os tubos então foram tratados a 100 °C por 10 min em bloco aquecedor (Uniscience – Techne Dri Block DB 2D). O lisado foi aliquotado e mantido a - 20 °C até o instante das análises.

- Amplificação e eletroforese

Utilizando-se como referência o trabalho de DOUMITH *et al.* (2004), um conjunto de 5 pares de primers (Tabela 2) foi utilizado para se determinar os perfis moleculares correspondentes aos sorotipos das cepas de *L. monocytogenes* por multiplex PCR. A amplificação de um ou mais fragmentos foi utilizada para caracterizar o sorotipo da cepa (Figura 5).

Tabela 2. Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados neste estudo (DOUMITH *et al.*, 2004).

Gene alvo	Sequência dos primers (5' – 3')	Tamanho do amplicom (pb)	Especificidade para <i>L. monocytogenes</i> (sorotipo)
<i>Imo0737</i>	For : AGGGCTTCAAGGACTTACCC Rev: ACGATTCTGCTTGCCATTC	691	1/2a, 1/2c, 3a e 3c
<i>Imo1118</i>	For : AGGGGTCTTAAATCCTGGAA Rev: CGGCTTGTTCCGCATACTTA	906	1/2c e 3c
<i>ORF2819</i>	For : AGCAAAATGCCAAACTCGT Rev : CATCACTAAAGCCTCCCATTG	471	1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e
<i>ORF2110</i>	For : AGTGGACAATTGATTGGTGAA Rev : CATCCATCCCTTACTTTGGAC	597	4b, 4d e 4e
<i>Prs</i>	For : GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG Rev : CAAAGAAACCTTGATTGCGG	370	<i>Listeria</i> spp.

For: direto; Rev: inverso

As reações foram realizadas em 25 µL, sendo que para cada reação utilizava-se 0,5 U de *Taq* polimerase (Fermentas); 1 µL de DNA; 0,2 mM de cada DNTP (Fermentas); 2,5 mM de MgCl₂; tampão da *Taq* 1X (Fermentas) e os 5 pares de primers nas seguintes concentrações: 1 µM de *Imo0737*, *ORF 2819* e *ORF 2110*; 1,5 µM de *Imo1118* e 0,2 µM de *prs*. A amplificação foi conduzida em um termociclador (Perkin-Elmer 9600) e o seguinte programa utilizado: 3 min a 94 °C para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 0,40 min., 53 °C por 1,15 min. e 72 °C por 1,15 min. e um ciclo final a 72 °C por 7 min. Aos produtos da amplificação foram adicionados 3 µL de "loading buffer" (SAMBROOK *et al.*, 1989), sendo os mesmos separados em gel de agarose (USB-NA) a 1,5% p/v em TBE 0,5X (SAMBROOK *et al.*, 1989). A eletroforese foi realizada em cuba horizontal (Bio-Rad

Sub Cell GT) contendo TBE 0,5X. O gel foi corado em solução de brometo de etídeo (1 µg/mL) (Pharmacia) e a imagem registrada com o sistema EDAS120 (Eastman Kodak, USA), sob transiluminação UV 302nm.

Os produtos da amplificação após eletroforese foram comparados à Figura 5 que mostra os perfis característicos de cada sorotipo. Como critério considerou-se sorotipo 1/2a – 3a aquele perfil onde houve a amplificação de dois fragmentos, um de 691 pb (*lmo0737*) e outro de 370 pb (*prs*); 1/2b – 3b com fragmentos de 471 pb (*ORF2819*) e 370 pb (*prs*); 1/2c – 3c com três fragmentos, um de 906 pb (*lmo1118*), um de 691 (*lmo0737*) e o terceiro de 370 pb (*prs*); 4b, 4d e 4e, também com três fragmentos de 597 pb (*ORF2110*), 471 pb (*ORF2819*) e de 370 pb (*prs*); o 4a, 4c produzem somente um tipo de fragmento, o correspondente ao *prs* (DOUMITH *et al.*, 2004).

Figura 5 – Perfis sorotípicos característicos de *Listeria* spp. determinados por multiplex PCR. Linhas, 1: 1/2a; 2: 1/2b; 3: 1/2c; 4: 4b; 5: 3a; 6: 3b; 7: 3c; 8: 4d; 9: 4e; 10: 7; 11: 4a; 12: 4c; 13: *L. innocua*; 14: *L. welshimeri*; 15: *L. ivanovii*; 16: *L. seeligeri*, M: marcador de peso molecular (DOUMITH *et al.*, 2004).

3.2.4. Teste de soro aglutinação rápida

As cepas também foram soro-agrupadas através de teste de soro aglutinação em lâmina utilizando-se anti-soro comercial (Difco) de acordo com o protocolo do fabricante, para os grupos 1 e 4. Assim aquelas cepas com resultado no multiplex PCR 1/2a – 3a, por exemplo, que aglutinaram com o anti-soro 1 foram consideradas

1/2a, as 1/2b - 3b - 7 que aglutinaram com o mesmo antisoro foram consideradas 1/2b e assim sucessivamente. As cepas do grupo 4 somente foram diferenciadas de outros sorogrupos, porém não entre seus sorotipos.

3.2.5. Determinação de perfis de macrorestrição

Determinou-se o perfil de macrorestrição de 75 cepas de *L. monocytogenes* isoladas nos frigoríficos A e B empregando-se a PFGE conforme descrito por GRAVES E SWAMINATHAN (2001). Estas cepas foram selecionadas aleatoriamente, sendo representativas de todos os pontos onde se isolou *L. monocytogenes* ao longo do experimento.

As cepas foram inoculadas em ágar BHI e incubadas por 24h a 37°C. Suspensão de colônias em 3 mL de tampão TE [10 mM Tris-HCL:1 mM EDTA (Pharmacia)] foi utilizada para determinar a absorbância a 610nm (Ultrospec 2000, Pharmacia), sendo a densidade ótica corrigida para 1.3. Foram então transferidos 240µl desta suspensão para tubos de microcentrifuga contendo 60µl de lisozima (Pharmacia) e o tubo foi incubado em banho-maria a 37°C por 10 min.

Ao tubo com as células tratadas foram adicionados 300µl da solução SDS [1.2% SeaKem Gold agarose (Cambrex), 1% Dodecil Sulfato de Sódio (Sigma), 0.2 mg/ml proteinase K (Pharmacia)]. Após homogeneização, volumes adequados foram distribuídos nos moldes acrílicos (BioRad) para formação dos blocos ou “plugs”.

Os blocos de agarose foram tratados com a solução de lise (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 1% sarcosina e 0,2 mg/ml proteinase K) em tubos que foram incubados em banho-maria a 54°C por 2 horas. Após duas lavagens sucessivas com água ultrapura estéril a 50°C e quatro com tampão TE a 50°C sob agitação (160 rpm), os plugs foram ou estocados em tampão TE em refrigerador ou submetidos a restrição.

Foram cortadas “fatias” de cerca de 1/6 dos blocos, utilizando-se lâmina de bisturi estéril, que foram submetidas à digestão com uma das enzimas de restrição (*Apa*I ou *Asc*I) (New England Biolabs) em seus respectivos tampões. Os tubos foram incubados a 37°C (*Asc*I) e a 30°C (*Apa*I) por no mínimo 4 horas ou deixadas nestas mesmas temperaturas "overnight".

Os produtos da macrorestrição foram separados por eletroforese em gel de agarose [Agarose Seakem Gold 1% em tampão TBE 0,5X (0,9M Tris base, 0,9 M ácido bórico, 0,02 M EDTA)] empregando-se o aparelho Gene Navigator (Amersham Biosciences-GE) com os seguintes parâmetros: $v=200$, $t=20h$ e pulsos de 4,0 a 40 s interpolados. O gel foi corado em solução de brometo de etídio (1 $\mu g/mL$) (Pharmacia), a imagem registrada sob luz ultra-violeta empregando-se o Sistema Edas 120 (Eastman Kodak). Os perfis gerados foram comparados para se determinar os perfis para cada enzima. Os perfis foram combinados para gerar o perfil composto e o dendrograma foi construído utilizando-se o programa NTSyspc 2.0 (Exeter Software, USA).

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Descrevem-se a seguir os resultados do isolamento de *Listeria* sp. de todos os meses de confinamento dos novilhos e também do abate destes animais, assim como os resultados da coleta de amostras no frigorífico B e análise sorológica e molecular das cepas.

4.1. Confinamento e Abate dos Novilhos Superprecoces

A maioria dos animais atingiu o peso determinado pelo projeto “Novilho Superprecoce” para o abate (± 450 Kg) após quatro meses de confinamento, porém os animais da raça R2 e R1 permaneceram por 7 e 6 meses, respectivamente, sob confinamento para atingir o mesmo peso. O atraso no ganho de peso foi, no caso dos animais R2, decorrente de doenças (babesiose e anaplasmoses) que se desenvolveram no início do confinamento. Os R1, sofreram um maior estresse no início do experimento chegando até mesmo a perder peso, permanecendo, portanto por seis meses. Com isto o número de amostras destas raças foi maior que as demais.

Foram analisadas no total 645 amostras, sendo 15 amostras ambientais antes da entrada dos animais no galpão de confinamento; 10 de fezes de conjunto; 300 de amostras individuais de fezes, 108 de amostras de água e ração e 212 de amostras coletadas ao abate, incluindo nestas as faces medial e lateral das carcaças, facas, serra e ambiente da câmara frigorífica. A partir destas amostras foram isoladas e testadas bioquimicamente 3867 cepas com aparência característica em TSA-YE, quando observadas sob iluminação transmitida.

Das 645 amostras analisadas, 181 (28,1%) apresentaram o gênero *Listeria*, havendo predomínio de *Listeria innocua* (166/181 – 91,7%), seguido de *L. monocytogenes* (16/181 – 8,8%). Das 166 amostras positivas para *L. innocua*, três foram positivas simultaneamente para outras espécies: uma para *L. grayi*; uma para *L. welshimeri* e uma para *L. monocytogenes*.

Nas amostras do ambiente do galpão de confinamento, coletadas antes da entrada dos animais (Tabela 3), 5 (33,3%) dos 15 pontos foram positivos para *L. innocua*.

A análise das fezes de conjunto (Tabela 4) demonstrou que os animais das diferentes raças, originários de diferentes regiões e propriedades, já chegaram ao confinamento excretando *Listeria* sp em suas fezes, possibilitando assim a disseminação desta durante toda a fase de confinamento e do abate.

Verifica-se pelos resultados referentes às coletas individuais de fezes (Tabelas 5, 6 e 7) que em 109 (36,3%) das 300 amostras examinadas isolou-se exclusivamente *L. innocua*, sendo que o isolamento foi possível a partir de todos grupos genéticos.

Pode-se verificar que ao longo dos primeiros três meses de amostragem, houve um aumento no número de amostras positivas para *Listeria* sp., sendo no primeiro mês 9 (15%) animais positivos, 19 (31,7%) no segundo e 47 (78,3%) no terceiro. No quarto mês de coleta houve uma queda sensível no número de amostras positivas para *Listeria* sp. com 23 animais positivos dentre os 60 amostrados (38,3%).

É interessante notar que os animais R2 e uma parte do lote dos R1 não estavam excretando *Listeria* quando da chegada ao confinamento (Tabela 4) e que se mantiveram assim durante o primeiro mês de coleta individual de fezes. A partir do segundo mês, 10 dos 12 R1 examinados estavam excretando *Listeria*. A partir do terceiro mês de confinamento a excreção de *Listeria* nas fezes dos dois grupos foi muito semelhante (Tabelas 6 e 7).

O resultado do isolamento nas amostras dos animais R2 e R4 (Tabela 6) se mostrou semelhante aos obtidos para as demais raças durante a fase de isolamento de *Listeria* nas amostras individuais de fezes, sendo que os R2 permaneceram em confinamento por sete meses nos levando a realizar sete coletas.

Nos seis meses de coletas individuais de fezes dos animais R1 (Tabela 7) nenhuma *L. monocytogenes* pode ser isolada, seguindo o comportamento geral das demais raças, mas das 72 amostras de fezes, 30 (41,7%) apresentavam *L. innocua*, sendo que no segundo e terceiro meses a taxa de isolamento foi maior.

O monitoramento da água, ração e seus componentes indicou a presença de *L. innocua* em 22 das 108 (20,4%) e nenhuma *L. monocytogenes* nas amostras examinadas (Tabela 8).

As amostras de água coletadas diretamente na caixa d'água que alimentava as baias não apresentaram *Listeria* durante todo o tempo do estudo (Tabela 8). Isto indica que os isolados de *Listeria* encontrados nas amostras dos bebedouros eram provenientes ou do ambiente ou das fezes/saliva dos animais, uma vez que na maioria das vezes a água estava turva e, às vezes, até notava-se a presença de fezes no interior do bebedouro no instante das coletas.

Tanto na água do bebedouro quanto na maioria dos componentes da ração e na ração final pode-se isolar *L. innocua*, sendo que nas amostras da água do bebedouro das baias cinco e 14, concentrado e polpa cítrica nenhuma *Listeria* foi isolada nos seis meses de coleta (Tabela 8).

Com relação às amostras das carcaças coletadas no dia do abate, (Tabelas 5, 6 e 7) verifica-se que, de maneira geral, a ocorrência de *Listeria* sp. nas carcaças no dia do abate foi baixa. Das 48 carcaças amostradas apenas três apresentaram *Listeria innocua* na face lateral e uma na face medial (todas de animais R5) (Tabela 5). Já para as 48 carcaças refrigeradas analisadas externa e internamente, 13 (27,1%) estavam contaminadas por *L. monocytogenes*.

Conforme pode ser visto na Tabela 5, no dia seguinte ao abate dos R3, pode-se isolar *L. monocytogenes* em quatro das doze (33,3%) carcaças refrigeradas e em uma (8,3%) do 1/2 sangue, estando esta última carcaça (77) contaminada tanto na face lateral quanto na medial.

É interessante notar que não se isolou *Listeria* sp. nas amostras de parede ou piso de câmara de resfriamento utilizada para o resfriamento das carcaças dos R3 (Tabela 9).

Apesar de ter-se isolado *L. monocytogenes* e *L. innocua* da parede da câmara frigorífica onde as carcaças dos R2 foram estocadas (Tabela 9) e *L. innocua* do piso desta mesma câmara, não se encontrou a bactéria nas amostras de carcaça desta raça (Tabela 6). Fato este devido provavelmente ao erro inerente ao processo de amostragem ou simplesmente porque não houve a contaminação destas carcaças neste ponto do processamento.

As análises das amostras coletadas no dia do abate dos R1 demonstraram que nenhuma *Listeria* estava presente em qualquer carcaça (Tabela 7) ou nas facas e serra utilizadas (Tabela 9), seguindo assim o mesmo comportamento no abate do R3 e dos R2; porém após 24 horas ao abate, das 12 carcaças novamente amostradas, 10 (83,3%) apresentavam *Listeria* sp. na face lateral e/ou medial, sendo oito (66,7%) positivas para *L. monocytogenes* e cinco para *L. innocua*, sendo uma delas simultaneamente positiva para *L. grayi* (Tabela 7). Importante citar que neste dia pode-se isolar *L. monocytogenes* da amostra do piso da câmara frigorífica (Tabela 9).

Tabela 3. Ocorrência de *Listeria* sp. nas amostras de ambiente antes da entrada dos animais no galpão de confinamento.

Ponto de amostragem	<i>Listeria</i> sp.
Corredor de acesso direito	(-)
Corredor de acesso esquerdo	(-)
Piso da baia 13	(+) <i>L.innocua</i>
Piso da baia 16	(-)
Piso da baia 21	(-)
Piso da baia 26	(-)
Água do bebedouro da baia 13	(-)
Água do bebedouro da baia 16	(-)
Água do bebedouro da baia 21	(+) <i>L.innocua</i>
Água do bebedouro da baia 26	(-)
Água da caixa d'água central	(-)
Cocho da baia 13	(+) <i>L.innocua</i>
Cocho da baia 16	(-)
Cocho da baia 21	(+) <i>L.innocua</i>
Cocho da baia 26	(+) <i>L.innocua</i>

Tabela 4. Ocorrência de *Listeria* sp. nas 10 amostras das fezes de conjunto¹ (seis animais/baia).

Raça	Baia	<i>Listeria</i> sp.
R3	3	(+) <i>L.innocua</i>
R3	5	(+) <i>L.innocua</i>
R5	15	(+) <i>L.innocua</i>
R5	17	(+) <i>L.innocua</i>
R2	1	(-)
R2	2	(-)
R4	10	(+) <i>L.innocua</i>
R4	14	(+) <i>L.innocua</i>
R1	22	(+) <i>L.innocua</i>
R1	24	(-)

¹ Coletadas dentro da primeira semana após a chegada dos animais ao confinamento.

Tabela 5. Ocorrência de *Listeria* sp. nas amostras individuais de fezes e nas amostras de carcaças coletadas no abate dos animais das raças R3 e R5.

Raça	Baia	Número/ Nome do animal	Fezes				Carcaça			
			Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	abate		refrigerada	
							Ext. ^a	Int. ^b	Ext.	Int.
R3	3	55	L.i.	-	L.i.	L.i.	-	-	L.m.	L.i.
		B39	-	-	L.i.	L.i.	-	-	-	-
		B41	-	-	L.i.	-	-	-	-	-
		B42	-	-	L.i.	-	-	-	-	-
		B58	-	L.i.	L.i.	-	-	-	-	-
		Boato	L.i.	-	L.i.	-	-	-	-	-
	5	362	-	-	L.i.	-	-	-	L.m.	-
		B48	-	-	L.i.	-	-	-	L.m.	L.i.
		B53	L.i.	-	L.i.	-	-	-	-	-
		Belo	-	-	L.i.	L.i.	-	-	L.m.	-
		Baliste	-	-	L.i.	L.i.	-	-	-	-
		Bruce	-	-	-	-	-	-	-	-
R5	15	58	-	L.i.	L.i.	-	L.i.	-	-	-
		65	-	-	L.i.	-	L.i.	-	-	-
		67	-	L.i.	L.i.	-	-	L.i.	L.i.	-
		68	L.i.	L.i.	L.i.	L.i.	-	-	-	-
		69	-	L.i./L.w.	L.i.	L.i.	-	-	L.i.	-
		72	-	-	L.i.	-	-	-	L.i.	-
	17	73	L.i.	-	L.i.	L.i.	-	-	L.i.	-
		74	-	-	L.i.	-	-	-	-	-
		75	-	-	-	-	L.i.	-	L.i.	-
		76	-	-	L.i.	-	-	-	-	-
		77	L.i.	L.i.	L.i.	-	-	-	L.m./L.i.	L.m.
		78	L.i.	-	L.i.	-	-	-	-	L.i.

L.i. – *L. innocua*; L.m. – *L. monocytogenes*; (-) negativo

^a Amostras coletadas com esponja em três regiões da face lateral de cada meia carcaça.

^b Amostras coletadas com esponja em duas regiões da face medial de cada meia carcaça.

Tabela 6. Ocorrência de *Listeria* sp. nas amostras individuais de fezes dos animais das raças R2 e R4 e nas amostras coletadas no abate dos animais da raça R2.

Raça	Baia	Animal	Fezes							Carcaça			
			Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	Mês 7	Abate		Refrig.	
										Ext.	Int.	Ext.	Int.
R2	1	103	-	-	-	L.i.	-	-	-	-	-	-	-
		155	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		158	-	-	L.i.	-	L.i.	-	L.i.	-	-	-	-
		176	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		179	-	-	L.i.	-	L.i.	-	-	-	-	-	-
		199	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	152	-	-	L.i.	-	-	-	L.i.	-	-	-	-
		153	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		161	-	-	L.i.	L.i.	-	L.i.	-	-	-	-	L.i.
		183	-	-	L.i.	L.i.	-	-	-	-	-	-	-
		194	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		196	-	L.i.	L.i.	L.i.	L.i.	-	-	-	-	-	-
R4	10	3001	-	-	L.i.	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		3003	-	-	L.i.	L.i.	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		3006	-	-	L.i.	L.i.	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		3012	-	-	L.i.	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		3016	L.i.	-	L.i.	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		3018	-	-	L.i.	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	14	3002	-	-	L.i.	L.i.	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		3005	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		3007	-	-	-	L.i.	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		3011	-	-	L.i.	L.i.	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		3013	-	L.i.	L.i.	L.i.	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		3017	L.i.	L.i.	L.i.	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

L.i. – *Listeria innocua*; L.m. – *L. monocytogenes*, nd – não determinado

Tabela 7. Ocorrência de *Listeria* sp. nas amostras individuais de fezes e nas amostras de carcaças coletadas no abate dos animais da raça R1.

Raça	Baia	Animal	Fezes						Carcaça			
			Mês	Mês	Mês	Mês	Mês	Mês	Abate		Refrigerada	
			1	2	3	4	5	6	Ext.	Int.	Ext.	Int.
R1	22	404	-	L.i.	L.i.	-	-	-	-	-	L.i.	L.m.
		513	-	-	L.i.	L.i.	L.i.	-	-	-	L.m.	-
		630	-	-	L.i.	-	-	-	-	-	L.i.	-
		761	-	L.i.	-	L.i.	L.i.	-	-	-	-	L.i./L.g.
		772	-	L.i.	-	L.i.	L.i.	-	-	-	L.i.	L.m.
		996	-	L.i.	L.i.	-	-	-	-	-	-	-
	24	586	-	L.i.	-	L.i.	-	-	-	-	L.m.	-
		621	-	L.i.	L.i.	-	-	-	-	-	L.m.	L.i.
		683	-	L.i.	L.i.	L.i.	-	-	-	-	-	-
		762	-	L.i.	L.i.	-	-	-	-	-	L.m.	-
		784	-	L.i.	L.i.	-	-	-	-	-	-	L.m.
		852	-	L.i.	L.i.	L.i.	L.i.	L.i.	-	-	L.m.	-

L.i. – *Listeria innocua*; L.g.- *L. grayi*; L.m. – *L. monocytogenes*

Tabela 8. Ocorrência de *Listeria* sp. nas amostras de água, dos componentes da ração e ração final empregada na produção do Novilho Superprecoce.

Tipo de amostra	Amostra	<i>Listeria</i> sp					
		Mês	Mês	Mês	Mês	Mês	Mês
		1	2	3	4	5	6
Água do bebedouro	Baia 3	-	L.i.	L.i.	-	-	-
	Baia 5	-	-	-	-	-	-
	Baia 15	L.i.	L.i.	L.i.	-	-	-
	Baia 17	-	-	L.i.	-	-	-
	Baia 1	-	L.i.	-	-	-	-
	Baia 2	L.i.	-	-	-	-	-
	Baia 10	L.i.	-	-	-	-	-
	Baia 14	-	-	-	-	-	-
Água	Baia 22	-	-	L.i.	-	-	-
	Baia 24	-	-	L.i.	-	-	-
	Caixa d'água	-	-	-	-	-	-
	Feno	-	L.i.	L.i.	-	L.i.	L.i.
	Silagem	-	L.i.	-	-	-	-
	Caroço algodão	-	L.i.	-	-	L.i.	-
	Milho	-	-	-	-	L.i.	L.i.
	Concentrado	-	-	-	-	-	-
Componentes da ração	Polpa cítrica	-	-	-	-	-	-
	Ração final	-	-	-	-	L.i.	L.i.

L.i. – *Listeria innocua*, (-) negativo

Tabela 9. Ocorrência de *Listeria* sp. nas amostras de utensílios, equipamentos e ambiente no abate das diferentes raças de Novilhos Superprecoces.

Raça	<i>Listeria</i> sp				
	Faca sangria	Faca esfolia	Serra carcaça	Piso câmara	Parede câmara
R3	-	-	-	-	-
R5	-	-	-	L.i.	-
R2	-	-	-	L.i.	L.m. e L.i.
R1	-	-	-	L.m.	L.i.

L.i. – *L. innocua*; L.m. – *L. monocytogenes*, (-) negativo

Até o presente, no Brasil, não houve trabalho similar para que se pudesse comparar os resultados obtidos, portanto as referências serão de trabalhos de outros países ou de outras espécies animais.

Várias hipóteses podem ser levantadas para explicar a ausência de *L. monocytogenes* nas fezes dos animais. Uma delas está relacionada ao fato dos animais provirem de propriedades onde a criação é feita a pasto. Esta ausência, também, foi observada por ANTONIOLLO *et al.* (2003) que analisando fezes de ovinos não detectaram *L. monocytogenes*, somente *L. welshimeri* e *L. innocua*.

Uma segunda hipótese está relacionada ao possível fornecimento de antibióticos aos animais durante o confinamento, pois vários deles chegaram debilitados e até mesmo com diagnóstico de endoparasitoses. Porém este fornecimento não nos foi comunicado formalmente, não sendo possível assim estabelecer esta ligação.

Outro fator que pode ter contribuído para a não detecção de *L. monocytogenes* nas fezes dos novilhos é a inibição da multiplicação de *L. monocytogenes* por bactérias do trato gastrointestinal e até mesmo por outras *Listeria* como, por exemplo, a *L. innocua*. YOKOYAMA *et al.* (1998), demonstraram em estudo “*in vitro*” que cepas de *L. innocua* e/ou seu filtrado têm a capacidade de inibir a multiplicação de *L. monocytogenes*, este estudo verificou ainda a presença de uma substância semelhante a uma bacteriocina.

A presença de enterobactérias também pode inibir a multiplicação de *L. monocytogenes*, conforme demonstrado por DEL CAMPO *et al.* (2001). Eles verificaram que *Enterobacteriaceae* diminuíram a população de *L. monocytogenes* em 2 a 3 log UFC/mL. Neste mesmo trabalho não houve influência de *Pseudomonas* na população de *Listeria*, sendo o primeiro um importante microrganismo psicrotrófico, assim como *L. monocytogenes*.

O meio de cultura empregado na etapa de enriquecimento seletivo das amostras também pode ter influenciado no nível de detecção de *L. monocytogenes* nas amostras. BRUHN *et al.* (2005) verificaram que ao inocularem *L. innocua* com *L. monocytogenes* em caldo de enriquecimento (LEB/UVM-I) há um predomínio da primeira sobre a segunda sendo que somente 2 a 6% das colônias isoladas posteriormente eram *L. monocytogenes*. Eles observaram ainda que os meios de enriquecimento seletivo (UVM I e UVM II) podem favorecer a multiplicação de determinadas linhagens de *L. monocytogenes*, mascarando a real composição das cepas nos alimentos. Porém, atualmente, os métodos de isolamento de *Listeria* reconhecidos internacionalmente (como por exemplo o USDA) ainda utilizam estes caldos.

Neste trabalho a ração e a silagem não foram fontes de *L. monocytogenes* aos novilhos, visto que não se isolou esta bactéria destes produtos. A silagem tem sido alvo de intensos estudos, sobretudo no exterior, onde já se demonstrou sua importância na disseminação de *L. monocytogenes* ao rebanho (PERRY e DONNELLY, 1990; DICKSON e MACNEIL, 1991; FENLON *et al.*, 1996; MANZANO

et al., 1998; BOVILL *et al.*, 2000). Uma hipótese para o fato da silagem fornecida aos animais deste estudo não estar contaminada com o patógeno pode ser o preparo mais cuidadoso desta, visto que foi produzida integralmente na FMVZ-UNESP Botucatu e supervisionada por professores da área, o que não aconteceria numa produção comercial de bovinos confinados.

Os trabalhos, de uma forma geral, mostram dados bastante variáveis com relação a presença de *L. monocytogenes* em fezes de bovinos, sendo que neste estudo nenhuma *L. monocytogenes* foi isolada nestas amostras. SIRAGUSA *et al.* (1993) nos EUA, encontraram 22% das amostras de fezes de gado confinado positivas para *Listeria* sp. e 2,2% com *L. monocytogenes*. Na Iugoslávia, BUNCIC (1991) obteve 24% de amostras com *L. monocytogenes*, na Turquia em 2003, KALENDER observou 1,53% de contaminação por *L. monocytogenes* e no Japão, OKUTANI *et al.* (2004) avaliando 244 amostras de fezes, ficou na mesma porcentagem encontrada por nós de *L. monocytogenes* nas fezes bovinas.

Como os animais não estavam excretando *L. monocytogenes* nas fezes e o patógeno também não foi encontrado nas demais amostras (ração, silagem, água e ambiente), pode-se assumir que as cepas de *L. monocytogenes* isoladas na fase de frigorificação das carcaças dos novilhos superprecoces foram provenientes do ambiente, utensílios, equipamentos e/ou pessoal do frigorífico.

Portanto, com base nos resultados deste estudo pode-se verificar que a espécie predominante foi a *L. innocua* que pode ser isolada antes e durante o confinamento, tanto das amostras individuais como de conjunto de fezes, do ambiente, da ração e da água do bebedouro dos animais. A espécie patogênica *L. monocytogenes* foi isolada somente nas carcaças após refrigeração e nas amostras coletadas dos pisos e paredes das câmaras frigoríficas, indicando que a contaminação por *L. monocytogenes* ocorreu no matadouro, através de contaminação cruzada. Este é um fato preocupante, pois, mesmo que a matéria prima, no caso os animais, cheguem para o abate isentos de *L. monocytogenes*, se

houver uma fonte de contaminação no início da área "limpa" do frigorífico e houver a transferência para a carcaça esta contaminação poderá perdurar até o produto final.

4.2. Frigorífico B

Após analisarem-se os resultados parciais do experimento com os Novilhos Superprecoces verificou-se a necessidade de se aprofundar o estudo relativo à importância do abate e processamento de bovinos na transferência de *L. monocytogenes* para a carne. Assim, optou-se por fazer um levantamento completo da disseminação desta bactéria em um frigorífico matadouro exportador desde o abate até a desossa da carcaça, verificando-se os principais pontos críticos para *L. monocytogenes*.

Portanto, após contatos com diversos matadouros escolheu-se um localizado na região noroeste do Estado de São Paulo sob Inspeção Federal e credenciado pelo Ministério da Agricultura (MAPA) para exportar seus produtos, visto que o utilizado no estudo anterior não a realizava. Denominou-se, portanto, este frigorífico como B, por motivos éticos e de sigilo.

Do total de 516 amostras analisadas após as cinco visitas ao frigorífico B, 54 (10,5%) foram positivas para *Listeria welshimeri*, 42 (8,1%) para *L. innocua* e 27 (5,2%) para *L. monocytogenes*, sendo que várias amostras foram simultaneamente positivas para mais de uma espécie (Tabela 10).

Em geral poucos pontos (9 de 37) amostrados na linha de abate estavam contaminados por *Listeria* sp., ocorrendo um aumento na frequência de isolamento à medida que se caminha para a desossa, ou seja, à medida que se inicia a área refrigerada do estabelecimento. Somente os pontos positivos para *Listeria* spp. foram utilizados para a construção da Tabela 10.

Tabela 10. *Listeria* sp. no abate e processamento de bovinos no frigorífico B durante os cinco meses de coleta.

Amostra	Coleta				
	I	II	III	IV	V
Faca esfolia 1A	-	Li	-	-	-
Carcaça 305 abate - lateral	Lm	-	-	-	-
Carcaça 268 abate - medial	-	Lw	-	-	-
Carcaça 275 abate - lateral	-	Lw	-	-	-
Carcaça 295 abate - lateral	-	Lm	-	-	-
Faca evisceração B	-	Lw	-	-	-
Escada acesso abate	-	Li	Li	Li, Lw	Lw
Piso abate 1	-	Li	Li	Li	Li
Piso abate 2	-	-	Li	Li, Lm	Li
Carcaça 1 refrigerada – lateral	-	Lw	-	-	-
Carcaça 5 refrigerada – lateral	-	Lw	-	-	-
Carcaça 8 refrigerada – medial	-	-	Lw	-	-
Carcaça 9 refrigerada – lateral	-	-	Lw	-	-
Carcaça 9 refrigerada – medial	-	-	-	Lw	-
Piso câmara fria 1	Lw	-	Lw	-	-
Parede câmara fria 1	-	-	-	Lw	-
Piso câmara fria 2	Lw	Lm	Lw	Lm	-
Parede câmara fria 2	Lw	-	Lw	Lw	Lw
Piso câmara fria 3	-	Lm	Lw	-	Lw
Parede câmara fria 3	-	-	-	Lw	Lm
Piso câmara fria 4	-	-	-	-	Lw

continua

Continuação Tabela 10

Amostra	coleta				
	I	II	III	IV	V
Corte 1	-	-	Lw	-	-
Corte 2	Li	-	-	-	-
Corte 3	Lw, Li	-	-	-	-
Corte 3	-	Lw	-	-	-
Corte 3	-	-	Lw, Li	-	-
Corte 2	-	-	-	-	Lw
Serra fita corte	-	-	Lw	-	-
Piso sala corte 1	-	-	Li, Lw	Li, Lw	Li
Piso sala corte 2	-	-	-	Li, Lw	Li
Sala desossa					
Mesa 1	Li	Li, Lw	Lw, Lm	Li	Lw, Lm
Faca 1	Lw	-	-	Lm	-
Esteira 1	Lm	Lw	Lm	Li	Lm
Luva 1	-	-	-	Lm	-
Peça de carne 1	Lw	Lw, Lm	-	Li	-
Mesa 2	Lw	Li	-	-	Li
Faca 2	Lw	-	Lm	-	-
Peça de carne 2	Lw	Lm	-	Lm	-
Esteira 2	Li, Lm	Lm	Lm	Li	Lw
Mesa 3	-	Lw	-	Li	Li
Esteira 3	-	Lw	Lw	Lw	Lw

continua

Continuação Tabela 10

Amostra	Coleta				
	I	II	III	IV	V
Luva 3	-	-	Lw	-	-
Peça de carne 3	-	-	-	-	Li
Mesa 4	-	-	Lm	Lw	Lm
Esteira 4	-	-	Lm	Lw	Lm
Faca 4	-	-	-	-	Lw
Peça de carne 4	-	-	-	-	Lm
Luva 4	-	-	-	-	Lw, Lm
Esteira 5	-	-	-	Li	Li
Esteira 6	-	-	-	Li	Li
Esteira 7	-	-	-	-	Li
Ralo 1	-	Li	Li	-	-
Ralo 2	-	Li, Lw	Lw	-	-
Piso 1	-	-	-	Li	Li
Piso 2	-	-	-	Li	-

Li – *Listeria innocua*; Lw – *L. welshimeri*; Lm – *L. monocytogenes*

A fim de facilitar a discussão, montou-se a Tabela 11, onde se restringiu a avaliação dos resultados a *Listeria monocytogenes*. Verifica-se que ademais a primeira coleta, a proporção de amostras positivas para *L. monocytogenes* manteve-se constante nas quatro coletas seguintes. Pode-se verificar também que a maioria das amostras (ambientais, utensílios e equipamentos) positivas para *L. monocytogenes* (24/27 – 88,9%) foi encontrada nas seções refrigeradas da indústria (área limpa). Somente duas das 102 amostras de carcaças examinadas foram positivas para o patógeno no dia do abate (carcaças 295 e 305), sendo que de

nenhuma das 104 amostras de carcaças refrigeradas se isolou *L. monocytogenes*. Por outro lado, quatro peças de carne prontas para a embalagem final estavam contaminadas.

Podemos verificar que na quinta coleta todos os pontos amostrados no conjunto de desossa 4 estavam contaminados com *L. monocytogenes* (Tabela 11), inclusive a peça de carne desossada nesta mesa.

Ainda com relação a área de desossa, observa-se na Tabela 11 que alguns pontos foram repetidamente positivos nas diferentes coletas realizadas. Isolou-se *L. monocytogenes* da esteira de desossa 1 na primeira, terceira e quinta coletas; da esteira de desossa 2 nas três primeiras coletas e alguns outros pontos foram positivos em duas ocasiões como o piso da câmara fria 2, a peça de carne 2, a mesa de desossa 1, a mesa e esteira 4.

Observa-se que em várias ocasiões houve o isolamento intermitente de *L. monocytogenes*, fato este que pode ser atribuído erro inerente ao processo de amostragem, onde em uma coleta toma-se um ponto contaminado e em outra no mesmo ambiente ou equipamento coleta-se outro ponto que não se mostra contaminado.

Tabela 11. Amostras positivas para *Listeria monocytogenes* nas cinco coletas realizadas no frigorífico B.

Amostra	Coleta				
	Primeira	Segunda	Terceira	Quarta	Quinta
<u>Área Suja</u>					
Carcaça 305 (C1) ^a					
Carcaça 295 (C1)					
Piso (A1)					
<u>Área Limpa</u>					
<i>Resfriamento</i>					
Piso câmara fria 2 (A4)					
Piso câmara fria 3 (A4)					
Parede câmara fria 3 (A4)					
<i>Desossa</i>					
Esteira desossa 1 (U14)					
Mesa desossa 1 (U14)					
Luva desossa 1 (U14)					
Faca desossa 1 (U14)					
Peça de carne 1 (P2)					
Esteira desossa 2 (U14)					
Faca desossa 2 (U14)					
Peça de carne 2 (P2)					
Mesa desossa 4 (U14)					
Esteira desossa 4 (U14)					
Luva desossa 4 (U14)					
Peça de carne 4 (P2)					

Quadrado vermelho – positivo, ^a Consultar Fig. 2 para localização dos pontos de coleta.

Durante a fase de abate, representada pelas amostras do primeiro dia de coleta, os equipamentos e utensílios não contribuíram para a contaminação das carcaças, visto que nenhuma faca ou equipamento amostrado apresentou *L. monocytogenes*. Somente uma amostra das facas de esfolia e uma das facas de evisceração foram positivas para *Listeria* spp. Isto demonstra que o processo utilizado de higienização das facas, imersão em água a 85 °C por aproximadamente três minutos, está sendo eficiente.

No que diz respeito às amostras de ambiente da área suja: pisos, calhas e paredes na sala de abate, das 25 amostras examinadas, somente uma de piso (A1) foi positiva para *L. monocytogenes* (Tabela 11). Portanto, estes pontos também não se mostraram críticos para a presença de *L. monocytogenes*, demonstrando que o serviço de limpeza e sanificação nesta área está sendo realizado de maneira adequada, ou que a presença de outros microrganismos possa estar inibindo a *L. monocytogenes*.

Com relação às amostras de carcaças, encontrou-se neste estudo 2% de amostras positivas. Dados encontrados na literatura e apresentados a seguir, mostram que a ocorrência de amostras positivas para *L. monocytogenes* pode variar de 0 a 20%, estando, portanto, o valor encontrado neste experimento dentro desta faixa, pois das 102 amostras de carcaças (50 no abate e 52 refrigeradas), duas estavam contaminadas por *L. monocytogenes*.

Na Austrália, VANDERLINDE *et al.* (1998) detectaram *L. monocytogenes* em 0,59% das 1063 carcaças amostradas.

Um estudo realizado na Irlanda do Norte por MADDEN *et al.* (2001) foi o que obteve a menor frequência de isolamento de *L. monocytogenes* em carcaças, pois nenhuma das 200 carcaças amostradas mostrou-se positiva para *L. monocytogenes*.

PECCIO *et al.* (2003) estudaram, durante 20 meses, a contaminação por *L. monocytogenes* em dois frigoríficos italianos, sendo um bovino e outro suíno. No matadouro bovino, das 72 amostras coletadas, sete (9,7%) estavam contaminadas

com o patógeno, sendo três de cortes de carne, uma carcaça dentre as 14 e três facas dentre as 11 amostradas. Outras amostras como mesas, serras e ralos não apresentaram contaminação. No matadouro suíno 7/68 amostras estavam contaminadas, sendo cinco de produtos cárneos e duas de equipamentos.

No Japão, OKUTANI *et al.* (2004) coletaram amostras de 4106 carcaças, sendo que 4,9% das amostras mostraram-se contaminadas por *L. monocytogenes*.

Nos EUA, três trabalhos demonstram a presença de *L. monocytogenes* em carcaças: o primeiro realizado em 1994 com 2089 carcaças de novilhos e novilhas provenientes de confinamentos indicou 4,1% das amostras positivas para *L. monocytogenes* (ANON., 1994). No segundo avaliaram-se 2112 carcaças bovinas, sendo 11,3% contaminadas (ANON., 1996) e no terceiro (RIVERA-BETANCOURT *et al.*, 2004), em 2004, observou-se uma incidência de 1,1% de carcaças com *L. monocytogenes*, valor este muito próximo ao deste estudo.

Nossos dados são diferentes de outros estudos realizados no Brasil. PICCHI *et al.* (1999) avaliaram 25 amostras de carcaças bovinas (quartos dianteiros resfriados), encontrando o maior percentual de todos os trabalhos citados, pois 20% das amostras foram positivas. No RS, LOGUERCIO *et al.* (2000) coletaram amostras de 60 carcaças e 16,3% destas estavam contaminadas por *L. monocytogenes*. No PR, BARROS *et al.* (2003a) verificaram que 9,67% das 62 amostras de carcaças albergavam o patógeno.

Diferenças na metodologia empregada para a amostragem e isolamento de *Listeria*, além dos níveis de higiene nos matadouros podem ter levado a estas disparidades de resultados. Neste estudo mesmo houve uma grande diferença na porcentagem de isolamento de *L. monocytogenes* das carcaças nos dois frigoríficos, visto que no frigorífico A 14 das 48 carcaças (29,2%) estavam contaminadas e no B somente duas de 102 (2 %) albergavam o patógeno.

Como no experimento no frigorífico B não houve a detecção de contaminação por *L. monocytogenes* nos utensílios e equipamentos na área de abate e as amostras de carcaças positivas para *L. monocytogenes* eram provenientes da porção externa das mesmas, pode-se supor que esta contaminação seja oriunda do couro do animal que no momento da esola pode ter entrado em contato com sua musculatura.

Mesmo não encontrando nem carcaça refrigerada nem amostras de corte positivas para *L. monocytogenes*, verificou-se que amostras de piso e parede das câmaras frigoríficas estavam contaminadas por *L. monocytogenes* (Tabela 11). Sendo que a câmara fria permanece a maior parte do tempo sob baixa temperatura (aproximadamente 4 °C), isto pode favorecer a instalação de *L. monocytogenes* em nichos deste local, podendo a partir deles contaminar as outras carcaças. Os funcionários encarregados de colocar e retirar as carcaças nas câmaras podem ainda carrear este microrganismo para outras áreas da empresa em suas vestimentas e botas.

O local onde houve a maior incidência de amostras positivas para *L. monocytogenes*, nos cinco meses de coleta, foi a sala de desossa na área limpa do frigorífico. Das 27 amostras contaminadas com *L. monocytogenes* 20 (74%) vieram desta sala (Tabela 11). Este fato é preocupante visto que a contaminação das peças de carne persistirá até o consumidor final, podendo acarretar em contaminações cruzadas durante seu manuseio, tanto no comércio quanto na residência.

Verifica-se ainda na Tabela 11 que os pontos amostrados na sala de desossa foram os mais frequentemente contaminados, especialmente as esteiras transportadoras das peças de carne que são construídas com material polivinílico.

NEL *et al.* (2004) pesquisando a área de desossa de um matadouro na África do Sul, verificaram uma elevada incidência de *L. monocytogenes* (52%) nas amostras de carne desossadas coletadas nas esteiras.

A higienização das esteiras, no frigorífico B é feita através da aplicação de vapor e sanificantes após a lavagem a intervalos pré-determinados, porém mesmo sofrendo estes tratamentos elas continuam albergando o patógeno. Provavelmente, como a *Listeria* tem a capacidade de formar biofilmes, e uma vez formados estes são de difícil remoção, esta contaminação continua ocorrendo.

Além disto, o tipo de superfície de contato dos equipamentos com alimentos de origem animal pode influenciar na contaminação por *L. monocytogenes* e conseqüentemente na sua disseminação para o alimento. CHASSEIGNAUX *et al.* (2002) verificaram que superfícies plásticas ou resinosas demonstraram ser mais favoráveis a esta contaminação por *L. monocytogenes* do que aquelas em aço inox.

Com base nos resultados obtidos verificou-se o baixo risco de contaminação da carcaça por *L. monocytogenes* nas etapas de abate, risco este que cresce significativamente à medida que a carcaça vai sendo frigorificada e manipulada. Pode-se, então, detectar os pontos críticos para a contaminação por esta bactéria no processamento da carne o que poderá em muito auxiliar esta indústria na tomada de medidas preventivas e imediatas para o controle da disseminação deste patógeno em suas áreas. Verifica-se que as facas, luvas, além das mesas de desossa são os principais focos de contaminação pelo patógeno, sendo necessária a tomada de medidas corretivas e posteriormente, preventivas, para evitar que a contaminação volte a ocorrer. Porém para que este estudo torne-se completo é fundamental que se utilize a análise sorológica e molecular das cepas isoladas, pois só assim pode-se realizar um diagnóstico epidemiológico fiel das fontes primárias de contaminação da carne, correlacionando as cepas ao longo do abate e processamento da carne nas suas várias áreas de manipulação.

4.3. Caracterização sorológica e molecular

- Sorologia

A análise sorológica apesar de não ser de alto poder discriminatório é utilizada mundialmente para a triagem das cepas de *L. monocytogenes* em casos de surtos ou de estudos epidemiológicos localizados, tornando-se, portanto, padrão

quando da comparação entre cepas. Devido a dificuldades na aquisição dos anti-soros comerciais japoneses, que fornecem os resultados mais específicos, buscou-se outra técnica acessível e capaz de mapear sorologicamente as cepas isoladas. Assim optou-se pela técnica de multiplex PCR.

Para a avaliação da eficiência do método de sorotipagem por multiplex PCR empregou-se cepas que haviam sido previamente sorotipadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF/USP com anti-soro comercial (Denka-Seiken). Do total de 16 cepas controle empregadas, três (uma 4b e duas 4c) não apresentaram resultados característicos esperados. As cepas 1/2a (3), 1/2b (3), 1/2c (2) e 4a (1) apresentaram resultado característico de acordo com o trabalho referência (DOUMITH *et al.*, 2004). As duas cepas 4ab não puderam ser comparadas com o trabalho de DOUMITH *et al.* (2004), pois não utilizaram cepas deste sorotipo no estudo. Das três cepas 4b analisadas, duas foram características e uma apresentou um fragmento a mais correspondente aos primers *Imo0737* (Tabela 2). Com estes resultados consideramos o método eficiente e iniciamos a tipagem das cepas isoladas neste estudo.

De um total de 180 cepas de *L. monocytogenes* isoladas das amostras dos frigoríficos A e B (Tabela 12 e 13), somente três (36a, 36b e 36c) (Tabela 13) não produziram um perfil eletroforético para a determinação dos sorotipos por multiplex PCR.

Das 87 cepas provenientes das amostras do frigorífico A tipadas, os sorotipos mais freqüentemente encontrados foram sorotipo 1/2c com 36/87 (41,4%), seguido do 4b (31/87 - 35,6%). Aos demais sorotipos 1/2b, 1/2a e 4a/c pertenceram 12, 7 e 1 cepas, respectivamente (Tabela 12).

Das 90 cepas provenientes das amostras coletadas no frigorífico B (Tabela 13), 39 (43,3%) eram do sorotipo 1/2b; 22 (24,4%) do 1/2c; 14 (15,5%) eram 4b; 10 (11,1%) do 4a/c e 5 (5,5%) do 1/2a. Somente as cepas da carcaça 305 da primeira coleta neste frigorífico não puderam ter o sorotipo determinado. De maneira geral cepas do sorotipo 1/2b puderam ser isoladas nas cinco coletas realizadas no frigorífico B, predominando, sobretudo, nas amostras da primeira e da quinta coletas.

Verifica-se, portanto, que houve diferença entre os sorotipos predominantes nos dois frigoríficos sendo que no frigorífico A foi o sorotipo 1/2c e no frigorífico B foi 1/2b.

Segundo DOUMITH *et al.* (2004) as 222 cepas de *Listeria* spp. testadas por eles apresentaram resultado característico de seu sorotipo ou espécie. Mesmo não podendo diferenciar os sorotipos 1/2a de 3a; 1/2b de 3b e 7; 1/2c de 3c; 4b de 4d e 4e; 4a e 4c de outras espécies de *Listeria*, os autores argumentam que isto não interferiria nos resultados uma vez que os sorovares 3a, 3b, 3c, 4a, 4c, 4e, 4d e 7 são raros tanto em alimentos quanto em cepas isoladas de casos clínicos de listeriose. Eles mencionam ainda 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, pertenciam aos sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b.

Uma vez que ainda são poucos os trabalhos encontrados na literatura empregando a sorologia molecular por PCR, os trabalhos citados abaixo são referentes ao método tradicional de sorotipagem.

Na Finlândia, LUNDEN *et al.* (2003) encontraram como perfil dominante em matadouro bovino e avícola, o sorotipo 1/2a (370/586 isolados) seguido do perfil 1/2c (158/586), 4b (44/586) e o sorotipo raro 3a foi encontrado em 14 isolados. Sorotipo 1/2b, o predominante no frigorífico B em nosso estudo, foi identificado em apenas 10 isolados por aqueles autores. Apesar dos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b estarem mais frequentemente associados aos surtos de listeriose, na Finlândia o 3a merece destaque já tendo sido relacionado a um surto de listeriose ligado ao consumo de manteiga por pacientes internados em um hospital naquele país (MAIJALA *et al.*, 2001).

No Brasil, HOFER *et al.* (2000) sorotiparam 96 cepas de *L. monocytogenes* provenientes de fezes de animais. Os autores verificaram que 37 eram do sorotipo 4a, 34 do 4b, 12 eram 1/2b, 5 eram 1/2a, 5 eram 4ab, 2 eram 4e e uma 3a. Nos produtos cárneos e pescados o sorotipo predominante foi o 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).

Verifica-se, portanto, a variedade de sorotipos encontrados tanto em animais quanto nos produtos e também que os sorotipos mais encontrados por outros autores também foram os deste trabalho.

Tabela 12. Sorogrupos (soroaglutinação rápida) e sorotipos (multiplex PCR segundo DOUMITH *et al.*, 2004.) dos isolados de *L. monocytogenes* provenientes do frigorífico A

Tipo de amostra	Amostra	Cepa	Sorogrupo	Sorotipo
<u>Carcças refrigeradas</u>				
R5	77e	<u>22^a</u>	4	4b
		<u>24</u>	4	4b
		3	4	4b
		9	4	4b
	77i	12	4	4b
		18	4	4b
		27	4	4b
		110	4	4b
	762e	<u>196</u>	1	1/2c
		<u>225</u>	1	1/2c
		234	1	1/2c
		255	1	1/2c
		<u>202</u>	1	1/2c
	586e	208	1	1/2c
		214	1	1/2c
		<u>308</u>	1	1/2a
		217	4	4b
	772i	235	4	4b
		240	4	4b
		245	4	4b
		<u>247</u>	1	1/2b
R1	852e	<u>282</u>	1	1/2b
		300	1	1/2b
		394	1	1/2b
		400	1	1/2b
	513e	<u>259</u>	1	1/2c
		263	1	1/2c
		<u>294</u>	1	1/2a
		404	1	1/2a
		413	1	1/2a
	404i	<u>373</u>	4	4b
		<u>377</u>	4	4b
		383	4	4b
		386	4	4b
	621e	<u>265</u>	1	1/2c
		<u>279</u>	1	1/2c
		324	1	1/2a
		368	1	1/2a
	784i	<u>436</u>	1	1/2a
		<u>443</u>	4	4a/c
		458	1	1/2c

continua

Cont. Tabela 12

Cont. Tabela 12

Tipo de amostra	Amostra	Cepa	Sorogrupo	Sorotipo	
R3	362e	31	4	4b	
		79	4	4b	
		91	4	4b	
		<u>97</u>	4	4b	
		163	4	4b	
		172	4	4b	
		181	4	4b	
		<u>34</u>	1	1/2c	
		<u>46</u>	1	1/2c	
		61	1	1/2c	
	Beloe	112	1	1/2c	
		124	1	1/2c	
		133	1	1/2c	
		175	1	1/2c	
		178	1	1/2c	
		<u>49</u>	1	1/2c	
		58	1	1/2c	
		<u>67</u>	1	1/2c	
	B55e	121	1	1/2c	
		<u>146</u>	1	1/2c	
		157	1	1/2c	
		160	1	1/2c	
		166	1	1/2c	
		<u>70</u>	1	1/2c	
		<u>78</u>	1	1/2c	
		42	1	1/2c	
	B48e	96	1	1/2c	
		132	1	1/2c	
		153	1	1/2c	
		156	1	1/2c	
		170	1	1/2c	
	<u>Ambiente</u>				
			190	4	4b
			194	4	4b
			230	4	4b
	Piso câm. frig.		257	4	4b
			410	4	4b
			416	4	4b
			422	4	4b
		435	4	4b	
		<u>472</u>	1	1/2b	
		<u>476</u>	1	1/2b	
		479	1	1/2b	
Parede câm. Frig.		483	1	1/2b	
		484	1	1/2b	
		487	1	1/2b	
		490	1	1/2b	

^a Cepas sublinhadas utilizadas para a PFGE.

Tabela 13. Sorotipos dos isolados de *L. monocytogenes* provenientes do frigorífico B

Coleta	Amostra	Cepa	Sorogrupo	Sorotipo
1	Carcaça 305 (C1)	<u>36a^a</u>	-	NS
		36b	-	NS
		36c	-	NS
	Esteira desossa1 (U14)	<u>82a</u>	1	1/2b
		82b	1	1/2b
		82c	1	1/2b
		82d	1	1/2b
	Esteira desossa2 (U14)	<u>87a</u>	1	1/2b
		87b	4	4a/c
		87c	1	1/2b
		87d	1	1/2b
2	Piso câmara frigor.3 (A4)	<u>25</u>	4	4b
		<u>26</u>	4	4b
		27	4	4b
		28	4	4b
	Esteira des.2 (U14)	<u>57</u>	1	1/2c
		<u>58</u>	4	4a/c
		59	4	4a/c
		60	1	1/2c
	Carcaça 295 (C1)	<u>97</u>	1	1/2b
		98	1	1/2b
		99	1	1/2b
		100	1	1/2b
	Piso câm. frig. 2 (A4)	<u>113</u>	4	4b
		<u>114</u>	4	4b
		115	4	4b
		116	4	4b
	Peça carne 2 (P2)	<u>129</u>	4	4a/c
		<u>130</u>	4	4a/c
		131	4	4a/c
	Peça carne 1 (P2)	132	4	4a/c
		<u>154</u>	1	1/2a

continua

Cont. Tabela 13

Coleta	Amostra	Cepa	Sorogrupo	Sorotipo
3	Faca desossa 2 (U14)	105	1	1/2a
		106	1	1/2a
		107	1	1/2a
		108	1	1/2a
	Mesa desossa 4 (U14)	113	1	1/2c
		114	1	1/2c
		115	1	1/2c
		116	1	1/2c
	Mesa desossa 1 (U14)	122	1	1/2b
		127	1	1/2b
	Esteira desossa 1 (U14)	137	4	4b
		138	4	4b
		139	4	4b
		140	4	4b
	Esteira des. 2 (U14)	153	1	1/2b
		154	1	1/2b
		155	1	1/2b
		156	1	1/2b
	Esteira des. 4 (U14)	169	1	1/2b
		170	1	1/2b
		171	1	1/2b
		172	1	1/2b
4	Piso câm. frig. 2 (A4)	89	1	1/2c
		90	1	1/2c
		91	1	1/2c
		92	1	1/2c
	Peça carne 2 (P2)	98	4	4a/c
		99	4	4a/c
		100	4	4a/c
	Luva desossa 1 (U14)	102	1	1/2c
		103	1	1/2c
		104	1	1/2c
		105	1	1/2c
	Faca des. 1 (U14)	110	1	1/2c
		111	1	1/2c
		112	1	1/2c
		113	1	1/2c
	Piso (A1)	183	1	1/2b
		188	1	1/2b

continua

Cont. Tabela 13

Coleta	Amostra	Cepa	Sorogrupo	Sorotipo
5	Parede câm. frig. 3 (A4)	<u>81</u>	1	1/2c
		<u>82</u>	1	1/2c
		<u>83</u>	1	1/2c
		<u>84</u>	1	1/2c
	Mesa desossa 4 (U14)	<u>8</u>	1	1/2b
		<u>9</u>	1	1/2b
		<u>10</u>	1	1/2b
		<u>11</u>	1	1/2b
	Mesa des. 1 (U14)	<u>37</u>	1	1/2b
		<u>38</u>	1	1/2c
	Peça carne 4 (P2)	<u>44</u>	1	1/2b
		<u>45</u>	1	1/2b
		<u>46</u>	1	1/2b
		<u>47</u>	1	1/2b
		<u>51</u>	1	1/2b
	Esteira des. 4 (U14)	<u>52</u>	1	1/2b
		<u>53</u>	1	1/2b
		<u>54</u>	1	1/2b
	Luva des. 4 (U14)	<u>127</u>	1	1/2b
	Esteira des.1 (U14)	<u>133</u>	1	1/2b
		<u>134</u>	4	4b
		<u>135</u>	1	1/2b
		<u>136</u>	4	4b

NS – não sorotipável; ^a Cepas sublinhadas utilizadas para PFGE.

- Perfil de macrorestrição

Um total de 75 cepas provenientes dos dois frigoríficos estudados, escolhidas para representar todas as amostras positivas para *L. monocytogenes*, foram analisadas por PFGE empregando-se duas enzimas. Duas cepas foram escolhidas para cada amostra positiva para *L. monocytogenes*, com exceção da amostras: frigorífico A: carcaça 362 – Simental e piso da câmara fria; frigorífico B: carcaça 305, esteira 1 (I coleta), esteira 2 (I coleta), peça 1 (II coleta) e luva 4 (V coleta), onde se utilizou somente uma cepa por amostra.

Nas Tabelas 12 e 13 estão sublinhadas as 75 cepas que foram utilizadas para serem examinadas por PFGE.

Como resultado obtiveram-se 15 perfis *Asc I* (1 a 15) (Figura 6), 13 perfis *Apa I* (A a M) (Figura 7), tendo sido considerada significativa para a análise a diferença de uma banda entre os perfis. Somente uma cepa (36a - carcaça 305) não foi tipável pela enzima *ApaI*, mas foi susceptível a *Ascl*, gerando o perfil 6 que por este motivo não foi utilizado na determinação dos grupos clonais.

Com a *Ascl* as cepas produziram de 4 (perfil 8) a 13 (perfil 12) fragmentos que variaram entre 40 a 746 Kpb (Figura 6 e Tabela 14) e com a *ApaI* de 6 (perfil L) a 13 (perfil G) bandas de 55 a 536 Kpb (Figura 7 e Tabela 15).

Combinando-se os resultados obtidos com as duas enzimas obteve-se 21 perfis compostos (Tabela 16).

Definidos os perfis compostos construiu-se o dendrograma (Figura 8) empregando-se o programa NTSyspc 2.0 e utilizando-se o coeficiente de Dice.

Figura 6. Perfis PFGE obtidos com a enzima *Ascl* (1 a 15) para as cepas de *L. monocytogenes* isoladas nos frigoríficos A e B. PM: marcador de peso molecular (Kpb).

Figura 7. Perfis PFGE obtidos com a enzima *Apal* (A a M) para as cepas de *L. monocytogenes* isoladas nos frigoríficos A e B. PM: marcador de peso molecular (Kpb).

Tabela 14. Representação esquemática dos perfis PFGE obtidos com a enzima Ascl.

	Perfis Asc I														
Peso Kpb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
746		■	■	■		■	■		■	■	■	■		■	
714	■				■			■					■		■
656				■											
632													■		
600			■												
487				■				■							
469		■			■		■								■
460	■														
443												■			
422					■	■									
408		■	■			■	■		■	■	■			■	
381				■					■					■	■
368		■					■								
359	■				■				■	■	■	■		■	■
345		■					■								
339	■									■	■	■			
330			■												
303						■		■							
290	■														
279					■				■	■		■		■	■
246							■								
241	■	■	■	■	■				■	■	■	■		■	■
205						■							■		
178						■							■		
163								■							
124	■				■				■	■	■	■	■	■	■
114	■		■	■	■				■	■	■	■	■	■	■
99		■					■								
72	■	■	■	■	■		■		■	■	■	■		■	
66	■		■						■	■	■	■			■
57			■						■	■	■	■		■	■
49			■						■	■	■	■		■	■
40	■	■		■	■		■		■	■	■	■		■	■

Tabela 15. Representação esquemática dos perfis PFGE obtidos com a enzima *Apal*.

Perfis <i>Apal</i>													
Peso Kpb	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
536													
443													
430													
390													
382													
379													
370													
337													
325													
320													
298													
294													
289													
274													
262													
249													
248													
236													
228													
220													
185													
177													
170													
165													
159													
155													
152													
150													
143													
134													
126													
123													
114													
111													
109													
105													
98													
93													
89													
85													
81													
77													
71													
67													
60													
58													
57													
55													

Figura 8 – Relação filogenética das cepas de *L. monocytogenes* isoladas de amostras de carcaças, ambiente, equipamentos e utensílios nos frigoríficos A e B e determinados por PFGE. I a VII correspondem aos grupos clonais.

Estabelecendo-se como linha de corte o coeficiente de 55% para a similaridade entre os isolados, pode-se dividir as 75 cepas provenientes dos dois frigoríficos em sete grupos clonais, identificados como I a VII na Figura 8 e Tabela 16.

Tabela 16. Distribuição das cepas de *L. monocytogenes* de acordo com o grupo clonal.

Perfil composto	Experimento	Amostra	Grupo
1A	A	Carcça 77eR – R5	I
3A	A	Parede câm. frigor.	I
9A	B	Esteira 1 – coleta 1	I
	B	Esteira 2 – col. 1	I
	B	Esteira 2 – col. 3	I
	B	Esteira 1 – col. 5	I
10A	B	Esteira 4 – col. 5	I
	B	Peça 4 – col. 5	I
	B	Luva 4 – col. 5	I
	B	Mesa 4 – col. 5	I
11A	B	Carcça 295e – col.2	I
4A	A	Carc. 852eR – R1	I
11D	B	Piso abate – col. 4	II
12M	B	Esteira 4 – col. 3	II
14B	B	Mesa 1 – col. 5	II
15E	B	Esteira 1 – col. 5	II
3G	A	Carc. 362eR – R3	III
	A	Piso câm. frig.	III
4G	A	Carc. 404iR – R1	III
	B	Piso câm. 2 – col. 2	IV
5K	B	Piso câm. 3 – col. 2	IV
	B	Esteira 1 – col. 3	IV
14I	B	Mesa 1 – col. 3	IV
	A	Carc. 762eR – R1	V
	A	Carc. 586eR – R1	V
	A	Carc. 513eR – R1	V
2C	A	Carc. 621eR – R1	V
	A	Carc. BeloeR – R3	V
	A	Carc. B55eR – R3	V
	A	Carc. B48eR – R3	V
	B	Parede câm. 3 – col. 4	V
7C	B	Luva 1 – col. 4	V
	B	Faca 1 – col. 4	V
	B	Mesa 1 – col. 5	V
	A	Carc. 586eR – R1	V
2F	A	Carc. 513eR – R1	V
	A	Carc. 784iR – R1	V
	B	Esteira 2 – col. 2	V
7F	B	Mesa 4 – col.3	V
	B	Piso câm. 2 – col. 4	V
8H	B	Esteira 2 – col. 2	VI
	B	Peça 2 – col. 4	VI
8J	B	Peça 2 – col. 2	VI
13L	B	Peça 1 – col. 2	VII
	B	Faca 2 – col. 3	VII

Pela Tabela 17 verifica-se que houve, na maioria dos casos, a prevalência de um determinado sorotipo em cada grupo clonal. Nos grupos I e II prevaleceram as cepas pertencentes ao sorotipo 1/2b, sendo somente uma cepa do sorotipo 4b em cada um dos grupos. No grupo III, que foi restrito ao frigorífico A, a totalidade das cepas foi do sorotipo 4b. Somente uma cepa não pertencia ao sorotipo 4b no grupo IV restrito ao frigorífico B, sendo ela 1/2b. O grupo V que foi comum aos dois frigoríficos teve comportamento distinto nos dois casos. No frigorífico A apesar da maioria das cepas ser do sorotipo 1/2c, houve também cepas 1/2a e 4a/c e no frigorífico B, 100% das cepas deste grupo pertenciam ao sorotipo 1/2c. Nos grupos VI e VII também houve o predomínio de um sorotipo, o 4a/c e o 1/2a, respectivamente, sendo estes dois grupos também restritos ao frigorífico B.

A similaridade entre o grupo genético e o sorotipo foi verificada também por GIOVANNACCI *et al.* (1999) que verificaram que somente em um grupo PFGE houve a presença de mais de um sorotipo (1/2c e 3c).

Tabela 17. Relação entre o grupo genético e o sorotipo das cepas de *L. monocytogenes* isoladas nos frigoríficos A e B

Amostra	Grupo clonal	Sorotipo
Frigorífico A		
Carcça 77e	I	4b
Carc. 852e	I	1/2b
Parede câm. fria	I	1/2b
Carc. 362e	III	4b
Carc. 404i	III	4b
Piso câm. fria	III	4b
Carc. 762e	V	1/2c
Carc. 586e	V	1/2c, 1/2a
Carc. 513e	V	1/2c, 1/2a
Carc. 621e	V	1/2c
Carc. 784i	V	1/2a, 4a/c
Carc. Beloe	V	1/2c
Carc. B55e	V	1/2c
Carc. B48e	V	1/2c
Frigorífico B		
Carcça 295	I	1/2b
Esteira 1 – col. 1	I	1/2b
Esteira 1 – col. 5	I	1/2b
Esteira 2 – col. 1	I	1/2b
Esteira 2 – col. 3	I	1/2b
Mesa 4 – col. 5	I	1/2b
Esteira 4 – col. 5	I	1/2b
Luva 4	I	1/2b
Peça 4	I	1/2b
Piso abate 2	II	1/2b
Esteira 1 – col. 5	II	4b
Mesa 1 – col. 5	II	1/2b
Esteira 4 – col.3	II	1/2b
Piso câm. fria 2 – col. 2	IV	4b
Piso câm. fria 3 – col. 2	IV	4b
Esteira 1 – col. 3	IV	4b
Mesa 1 – col. 3	IV	1/2b
Piso câm. fria 2 – col. 4	V	1/2c
Parede câm. fria 3 – col. 5	V	1/2c
Mesa 1 – col. 5	V	1/2c
Luva 1 – col. 4	V	1/2c
Faca 1 – col. 4	V	1/2c
Esteira 2 – col. 2	V	1/2c
Mesa 4 – col. 3	V	1/2c
Esteira 2 – col. 2	VI	4a/c
Peça 2 – col. 2	VI	4a/c
Peça 2 – col. 4	VI	4a/c
Peça 1 – col. 2	VII	1/2a
Faca 2 – col. 3	VII	1/2a

Conforme pode ser visto na Tabela 18, houve o predomínio de cepas do grupo V nos isolados obtidos no matadouro A, onde das 16 amostras positivas para *L. monocytogenes*, 10 (62,5%) possuíam cepas deste grupo e as seis restantes foram divididas igualmente entre os grupos I e III.

Tabela 18. Distribuição dos grupos clonais dos isolados de *L. monocytogenes* no matadouro A (abate dos Novilhos Superprecoces)

Amostra	Perfil composto	Grupo
Carcça 77eR – R5	1A (2) ^a	I
Carcça 852eR – R1	4A (2)	I
Carc. 362eR – R3	3G (1)	III
Carc. 404iR – R1	4G (2)	III
Carc. 762eR – R1	2C (2)	V
Carc. 586eR – R1	2C (1)	V
Carc. 513eR – R1	2C (1)	V
Carc. 621eR – R1	2C (2)	V
Carc. 586eR – R1	2F (1)	V
Carc. 513eR – R1	2F (1)	V
Carc. 784iR – R1	2F (2)	V
Carc. BeloeR – R3	2C (2)	V
Carc. B55eR – R3	2C (2)	V
Carc. B48eR – R3	2C (2)	V
Parede câm. fria	3A (2)	I
Piso câm. fria	3G (1)	III

Carc. – carcaça; câm. - câmara

^a Número de cepas.

Verifica-se ainda que no abate dos novilhos da raça R1 no frigorífico A, pode-se isolar *L. monocytogenes* destes mesmos três grupos.

As amostras obtidas das carcaças dos R3 apresentaram os grupos III e V e dos R5 somente do grupo I. Já os isolados de ambiente da câmara frigorífica apresentaram grupos diferentes, I na parede e III no piso. Nota-se ainda que duas carcaças (77eR – R5 e 852eR – R1) apresentaram cepas do mesmo grupo encontrado na parede da câmara frigorífica e outras duas carcaças (362eR – R3 e 404iR – R1) cepas do mesmo grupo encontrado no piso. Outro detalhe a observar é que mesmo com os animais sendo abatidos em meses diferentes, os mesmos

grupos genéticos apareceram em diferentes carcaças de diferentes raças (p.e. Grupo V em carcaças dos R1 e dos R3).

Pelos resultados encontrados para as cepas obtidas no abate e refrigeração dos Novilhos Superprecoces pode-se verificar que cepas de *L. monocytogenes* presentes no ambiente de refrigeração estavam contaminando carcaças ali estocadas, provavelmente por contato direto com as paredes ou por aerossóis. Esta última hipótese é suportada pela realização de enxágüe do piso com jatos d'água de alta pressão quando da coleta de amostras neste local, além de ter sido verificado um grande acúmulo de resíduos e sangue no piso da câmara frigorífica.

Como houve a contaminação por *L. monocytogenes* de mesmo grupo genético (Grupo III) em diferentes dias de abate, visto que animais R1 foram ao abate aos sete meses de confinamento e os R3 aos quatro meses, pode-se supor que cepas pertencentes a este grupo tenham melhor capacidade adaptativa ao ambiente, formando biofilmes e assim possibilitando a contaminação cruzada.

Mesmo com o grupo V não sendo detectado nas amostras de ambiente, verificou-se que houve a contaminação de carcaças de diferentes raças (R1 e R3) por este grupo clonal, o que pode ser devido a outras fontes de contaminação dentro do frigorífico, que não puderam ser identificadas.

A Tabela 19 apresenta a distribuição dos grupos clonais das cepas de *L. monocytogenes* isoladas nas cinco coletas realizadas no frigorífico B. Os grupos I e V foram os mais freqüentes sendo detectados 9 (32,1%) e 7 (25%) vezes, respectivamente. O grupo II, 4 vezes, os grupos IV e VI apareceram com a mesma freqüência (3 vezes) e o VII, duas vezes.

Na primeira coleta houve uma cepa (36a) obtida de carcaça (305) que não pode ser tipada pela enzima *Apal* devido a constante degradação de seu DNA durante a PFGE, ressaltando que esta mesma cepa quando submetida a restrição pela enzima *Ascl* forneceu o perfil 6 que não foi considerado no dendrograma. Nesta mesma coleta isolou-se *L. monocytogenes* de outras duas amostras (esteiras de desossa 1 e 2) que pertenciam ao grupo I (Tabela 19).

Na segunda coleta as amostras do piso das câmaras frigoríficas 2 e 3 continham cepas de um mesmo grupo (IV), e a esteira de desossa 2 e a peça de

carne processada nesta mesma mesa possuíam, as duas, cepas do grupo VI. Ainda na esteira de desossa 2, puderam ser isoladas cepas dos grupos V e I. Nas amostras da carcaça e na peça de carne 1, os grupos presentes foram, respectivamente, I e VII (Tabela 19).

Durante a terceira coleta, das seis amostras positivas para *L. monocytogenes*, duas possuíam cepas pertencentes ao grupo IV (esteira e mesa de desossa 1) e as demais estavam distribuídas entre os diferentes grupos (I, II, V e VII).

As cepas isoladas das amostras da quarta coleta pertenciam a três grupos diferentes, sendo seis ao V, duas ao II e duas ao VI (Tabela 19). As cepas do grupo V foram isoladas das amostras do piso da câmara fria 2, da luva de desossa 1 e da faca de desossa 1.

Na quinta coleta observa-se que as 17 cepas das sete amostras puderam ser distribuídas em três grupos (Tabela 19). Em duas amostras pode-se observar a presença de mais de um grupo genético, sendo o I e II na esteira de desossa 1 e o II e V na mesa de desossa 1. Verificou-se ainda que o grupo V estava presente tanto nas amostras da parede da câmara fria 3 como na mesa de desossa 1. O grupo I foi o predominante nesta coleta, tendo sido encontrado em cinco amostras (esteira de desossa 1, mesa de desossa 4, esteira de desossa 4, luva de desossa 4 e peça de carne 4) (Tabela 19).

Analisando os resultados obtidos no frigorífico B, com base na distribuição dos grupos clonais ao longo das cinco coletas, observa-se que as cepas do grupo I estavam presentes na área suja e na desossa, podendo estar sendo veiculadas no interior do frigorífico através de carcaças contaminadas ou pelo pessoal que pode transitar de uma área a outra, apesar destas serem fisicamente separadas. Em dois casos este grupo foi encontrado em mais de uma coleta em um mesmo ponto: esteira de desossa 1 e 2 (Tabela 19), podendo ter formado biofilme e se tornar residente, apesar dos procedimentos de limpeza e higienização. Outro resultado a

salientar foi a presença de cepas do grupo I em todas as amostras provenientes do conjunto de desossa 4 na quinta coleta, inclusive na carne.

Apenas quatro amostras continham cepas do grupo II. No entanto, como no caso do grupo I, uma amostra era proveniente da área suja e as demais da desossa.

O grupo IV ficou restrito a área refrigerada do frigorífico, porém em áreas separadas. Este grupo estava presente em amostras dos pisos de duas câmaras frigoríficas, na esteira de desossa 1 e na mesa de desossa 1 (Tabela 19). Apesar de serem fisicamente separadas, há trânsito entre uma área e outra, pois as carcaças estocadas nas câmaras são conduzidas manualmente para a área de desossa o que pode possibilitar a contaminação destas áreas.

Após o grupo I, as cepas do grupo V foram mais frequentemente identificadas estando presentes em sete amostras, restritas às áreas limpas. Estas cepas também podem estar mais adaptadas a estes ambientes.

As três amostras contendo cepas do grupo VI foram provenientes da área de desossa e mais especificamente do conjunto 2. Em duas coletas pode-se isolar cepas deste grupo da carne desossada na esteira que possuía cepas deste mesmo grupo, caracterizando assim uma provável contaminação cruzada.

O grupo VII só ocorreu na área de desossa, em dois pontos de conjuntos diferentes, sendo um deles preocupante pois se trata de peça de carne (Tabela 19). Provavelmente cepas deste grupo não são persistentes, pois não foram isoladas do ambiente indicando não estarem adaptadas.

Tabela 19. Distribuição dos grupos clonais de *L. monocytogenes* isolados no frigorífico B

Amostra	Coleta				
	Primeira	Segunda	Terceira	Quarta	Quinta
<u>Área Suja</u>					
Carcaça 305	NT (1)				
Carcaça 295		I (2)			
Piso				II (2)	
<u>Área Limpa</u>					
- Resfriamento					
Piso câmara fria 2		IV (2)		V (2)	
Piso câmara fria 3		IV (2)			
Parede câmara fria 3					V (2)
- Desossa					
Esteira desossa 1	I (1)		IV (2)		I (1), II (1)
Mesa desossa 1			IV (2)		II (1), V (1)
Luva desossa 1				V (2)	
Faca desossa 1				V (2)	
Peça de carne 1		VII (1)			
Esteira desossa 2	I (1)	V (1), VI (1)	I (2)		
Faca desossa 2			VII (2)		
Peça de carne 2		VI (2)		VI (2)	
Mesa desossa 4			V (2)		I (2)
Esteira desossa 4			II (2)		I (2)
Luva desossa 4					I (1)
Peça de carne 4					I (2)

NT – não tipável; (n) – número de cepas

Na literatura nacional ainda não existem trabalhos estudando a epidemiologia e características moleculares de *L. monocytogenes* em matadouros bovinos para que se possam comparar os nossos resultados. Mesmo internacionalmente foram

encontrados poucos estudos em matadouros, sendo a maioria focalizada no abate de suínos e de aves.

Assim, HEIR *et al.* (2004) estudando a epidemiologia de *L. monocytogenes* em 4 matadouros de bovinos na Noruega, empregando a PFGE, verificaram a presença de vários grupos genéticos tanto na área de carne crua como após o tratamento térmico. Aqueles autores observaram, ainda, isolados com o mesmo perfil eletroforético em diferentes frigoríficos. Situação semelhante foi observada neste estudo, visto que os grupos genéticos I e V foram comuns aos frigoríficos A e B que possuem localização geográfica distinta.

A contaminação cruzada e a persistência de certas cepas de *L. monocytogenes* foi verificada por LUNDEN *et al.* (2003). Eles analisaram, por PFGE, cepas de *L. monocytogenes* obtidas em três matadouros bovinos e um avícola da Finlândia. Coletando amostras de ambiente, de produtos crus e processados e verificaram que dos 47 pulsotipos (Ascl + Apal), 35 foram restritos a um determinado matadouro, 7 foram comuns a dois e cinco apareceram nos três. Dezenove pulsotipos foram considerados persistentes e 28 não persistentes. Eles também verificaram que o mesmo pulsotipo que contaminava um equipamento, estava presente no produto processado naquele local.

Durante um período de 20 meses, PECCIO *et al.* (2003) utilizaram o método PFGE para traçar a contaminação por *L. monocytogenes* em um matadouro bovino e um suíno da Itália. Eles coletaram amostras de ambiente, utensílios, equipamentos, carcaças e carne. Utilizando somente a análise do polimorfismo dado pela macro-restrição com a enzima Ascl, eles observaram que as cepas isoladas de carne crua, carcaça e das facas do matadouro bovino apresentavam somente um perfil genético, enquanto que as cepas isoladas de amostras de carne crua, processada e equipamentos no matadouro suíno pertenciam a seis perfis diferentes, não havendo relação entre as cepas isoladas de carnes e as de equipamentos. Entretanto, o emprego de uma única enzima de restrição deve ser avaliado com cautela. Em nosso estudo a utilização de duas enzimas se mostrou muito útil para tipar as cepas isoladas nos dois frigoríficos levando a uma melhor discriminação entre as cepas e, portanto, melhorando a eficiência do método.

O método de PFGE pode ser desenvolvido com uma ou várias enzimas de macro-restrição. SENCZEK *et al.* (2000) estudaram, por dois anos, a disseminação de *Listeria* spp. em um matadouro suíço relacionando geneticamente as cepas com o uso das enzimas *Sma*I e *Apa*I. Os 89 isolados de *L. monocytogenes* analisados originaram 15 perfis compostos (A a O), sendo que o perfil B foi o prevalente (33/36) na área de processamento A (presunto fatiado), mas também pode ser isolado na área B (presunto inteiro) e em outros produtos cárneos.

Em nosso estudo verificou-se que cepas de um mesmo grupo genético estavam disseminadas nos dois frigoríficos, no caso cepas dos grupos I e V. Porém, houve também aquelas específicas do frigorífico A (grupo III) e do frigorífico B (grupos II, IV, VI e VII). Resultado semelhante foi encontrado no trabalho de GIOVANNACCI *et al.* (1999) que estudando a disseminação de *L. monocytogenes* em cinco matadouros suínos na França ao longo de um ano, verificaram através de PFGE que dentre os 287 isolados houve um grupo genético predominante nos matadouros e ainda que houve um grupo que estava disseminado nos diferentes frigoríficos.

Isto, também, foi verificado por AUTIO *et al.* (2000), na Finlândia, onde pesquisaram a contaminação por *L. monocytogenes* em 10 pequenos matadouros de suínos utilizando para a tipagem a PFGE. Os 58 isolados obtidos forneceram 18 pulsotipos, sendo que dois ou mais pulsotipos puderam ser observados em mais de um matadouro.

Também já se demonstrou, através de PFGE, que em frigorífico de pescados os mesmos grupos genéticos encontrados na matéria prima e equipamentos durante o processamento de salmão defumado foram encontrados nos produtos finais (GUDMUNDSDÓTTIR *et al.*, 2005).

Portanto, as técnicas de tipagem molecular, como a PFGE, têm sido utilizadas largamente para traçar a disseminação de bactérias ao longo da cadeia produtiva de alimentos, auxiliando, assim, programas de controle de qualidade do tipo Boas Práticas de Manipulação, Procedimentos Operacionais Padrão de Higienização e Análise de Riscos e Pontos Críticos de Controle.

5. CONCLUSÕES

Pode-se concluir, portanto, que o confinamento dos bovinos no projeto Novilho Superprecoce não elevou o risco de contaminação e disseminação de *L. monocytogenes* pelos animais das diferentes raças. Não se observaram pontos de contaminação para o patógeno na produção primária, ficando claro que a principal fonte de contaminação das carcaças está na área limpa dos matadouros e não no abate. Observou-se que cepas de *L. monocytogenes*, de mesmo perfil genético, presentes no ambiente e utensílios desta área passam a contaminar a carne e que a maioria das cepas isoladas pertence a sorotipos relacionados à listeriose humana, indicando o potencial de veiculação do patógeno por carne bovina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARNISALO, K., AUTIO, T., SJOBERG, A-M., LÚNDEN, J., KORKEALA, H., SUIHKO, M-L. Typing of *Listeria monocytogenes* isolates originating from the food processing industry with automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **J. Food Prot.**, v.66, n.2, p.249-255, 2003.
- ABIEC – **Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne**. On-line: <http://www.abiec.com.br/abiec/estatisticas/corte.htm> (2005)
- ALBENONES, M. J.; TIMO, I.S. Bactérias do gênero *Listeria* em carne e água residuária de lavagem de carcaça de um matadouro frigorífico e em carne bovina moída comercializada na cidade de Goiânia. **Tese apresentada à Universidade de São Paulo**. 144pp. São Paulo, 1991.
- ANDRIGHETO, C. Disseminação de *Listeria monocytogenes* em uma linha de produção de nuggets congelados de frango. **Tese apresentada à Universidade de São Paulo**. 51pp. São Paulo, 2000.
- ANÔNIMO, Recommendations by the National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods: The ecology of *Listeria monocytogenes*, USDA, FSIS, Washington, D.C. **Int. J. Food Microbiol.** v.14, n.3/4, p.194-201, 1991.
- ANÔNIMO - FDA/CFSAN, EUA, **Bad Bug Book** - Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook: *Listeria monocytogenes*, 1992. On-line: <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap6.html>
- ANÔNIMO - **UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE**. Nationwide Beef Microbiological Baseline Data Collection Program: Steers and Heifers. 39pp. Jan. 1994.

- ANÔNIMO - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. Nationwide Beef Microbiological Baseline Data Collection Program: Cows and Bulls. 33pp., fev. 1996.
- ANÔNIMO - Centers of Disease Control and Prevention, Atlanta, USA. **Listeriosis**. Media Relations, 25/12/1998.
- ANÔNIMO - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. Microbiology Laboratory Guidebook: Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg, and Environmental Samples. 29/04/2002.
- ANTONIOLO, P.C., BANDEIRA, F.S., JANTZEN, M.M., DUVAL, E.H., SILVA, W.P. Prevalence of *Listeria* spp. In feces and carcasses at a lamb packing plant in Brazil. **J. Food Prot.**, v.66, n.2, p.328-330, 2003.
- 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.
- AUTIO T, SATERI T, FREDRIKSSON-AHOMAA M, RAHKIO M, LUNDEN J, KORKEALA H. *Listeria monocytogenes* contamination pattern in pig slaughterhouses. **J. Food Prot.**, v.63, n.10, p.1438-1442, 2000.
- BARROS, M.A.F.; BELOTI, V.; HAGA, M.M.; CAVALETI, L.; D'OVÍDIO, L.; MONTEIRO, F.A.; DA SILVA, L.H.C., Detecção de *Listeria* sp. em carne em *in natura* e embutidos comercializados na região do norte do Paraná. Anais do **XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Florianópolis, novembro, 2003a.
- BARROS, M.A.F.; BELOTI, V.; HAGA, M.M.; CAVALETTI, L.; D'OVÍDIO, L.; MONTEIRO, F.A.; MANOEL, A.V.B. *Listeria* spp.: ocorrência em equipamentos e ambientes de processamento de carne bovina. Anais do **XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Florianópolis, novembro, 2003b.

- BERSOT, L.S., LANDGRAF, M., FRANCO, B.D.G.M., DESTRO, M.T. Production of mortadella: behavior of *Listeria monocytogenes* during processing and storage conditions. **Meat Science**, v.57, p.13-17, 2001.
- BORUCKI, M.K., PEPPIN, J.D., WHITE, D., LOGE, F., CALL, D.R. Variation in Biofilm Formation among Strains of *Listeria monocytogenes*. **App. Environ. Microbiol.**, v.69, n.12, p. 7336–7342, 2003.
- BORUCKI, M.K., REYNOLDS, J., GAY, C.C., MCELWAIN, K.L., KIM, S.H., KNOWLES, D.P., HU, J. Dairy farm reservoir of *Listeria monocytogenes* sporadic and epidemic strains. **J. Food Prot.**, v.67, n.11, p.2496-2499, 2004.
- BOVILL, R., BEW, J., COOK, N., DAGOSTINO, M., WILKINSON, N., BARANYI, J. Predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature. **Int. J. Food Microbiol.** v.59, p.157-165, 2000.
- BRIGIDO, B.M., FREITAS, V.P.S., MAZON, E.M.A., PISANI, B., PRANDI, M.A.G., PASSOS, M.H.C.R. Avaliação da 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)**, 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. **App. Environ. Microbiol.**, v.71, n.2, p.961-967, 2005.
- BUNCIC, S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in slaughtered animals, in meat, and in meat products in Yugoslavia. **Int. J. Food Microbiol.** v.12, p.173-180, 1991.
- BYUN, S-K., JUNG, S.C., YOO, H.S. Random amplification of polymorphic DNA typing of *Listeria monocytogenes* isolated from meat. **Int. J. Food Microbiol.**, v.69,p.227–235, 2001.

- CALIL, E.M.B. Incidência de *Listeria* spp em amostra de alface lisa (*Lactuca sativa*) comercializadas na cidade de São Paulo e na água de irrigação de propriedades produtoras Município de Ibiúna, SP. Dissertação apresentada para obtenção do título de MESTRE junto à **Fac. de Saúde Pública da USP**. 66p., São Paulo, 1997.
- CATÃO, R. M. R., CEBALLOS, B. S. O. Frequência de *Listeria* spp. 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.
- CDC – **Center of Disease Control and Prevention** - USA. On-line: (http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/listeriosis_g.htm - acessado em 12/09/2005).
- CHASSEIGNAUX, E., GERAULT, 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.
- CHIARINI, E.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T. Occurrence *Listeria monocytogenes* the broiler industry. **XV International Symposium on Problems of Listeriosis**. Uppsala, Sweden, September 12-15, 2004.
- CLIVER, D.O. **Foodborne Diseases** Academic Press, Inc. San Diego 395pp., 1990.
- CORRÊA, W.M., CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos** 2ª Ed. ED. MEDSI Ltda. Rio de Janeiro 843pp., 1992.
- CULLOR, J.S. Common pathogens that cause foodborne disease: Can they be controlled on the dairy? **Veterinary Medicine**, v.2, p.185-194, 1995.

- DEL CAMPO, J., CARLIN, F., NGUYEN-THE, C. Effects of Epiphytic *Enterobacteriaceae* and Pseudomonads on the Growth of *Listeria monocytogenes* in Model Media. **J. Food Prot.**, v. 64, n. 5, p.721-724, 2001.
- DESTRO, M.T. Incidence and significance of *Listeria* in fish and fish products from Latin America. **Int. J. Food Microbiol.** v.62, p.191-196, 2000.
- DICKSON, J.S., MACNEIL, M.D. Contamination of beef tissue surfaces by cattle manure inoculated with *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.** v.54, n.2, p.102-104, 1991.
- DOUMITH, M., BUCHRIESER, C., GLASER, P., JACQUET, C., MARTIN, P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, n.8, p.3819-3822, 2004.
- DYKES, G.A., MOORHEAD, S.M. Survival of osmotic and acid stress by *Listeria monocytogenes* strains of clinical or meat origin. **Int. J. Food Microbiol.** v.56, p.161-166, 2000.
- FENLON, D.R. Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. **J. Appl. Bacteriol.** v.59, p.537-543, 1985.
- FENLON, D.R., WILSON, J., DONACHIE, W. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. **J. Appl. Bacteriol.** v.81, n.6, p.641-650, 1996.
- FILGUEIRAS, O. Jovem, enxuto e com peso de boi. **Pesquisa Fapesp**, v.12, p.60-64, 2000.
- 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.

- FRYE, D.M., ZWEIG, R., STURGEON, J., TORMEY, M., LECAVALIER, M., LEE, I., LAWANI, L., MASCOLA, L. An Outbreak of Febrile Gastroenteritis Associated with Delicatessen Meat Contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Clin. Infect. Dis.**, n.15, v.35, p.943-949, 2002.
- GIOVANNACCI, I., RAGIMBEAU, C., QUEGUINER, S., SALVAT, G., VENDEUVRE, J-L., CARLIER, V., ERME, G. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. **Int. J. Food Microbiol.**, v.53, p.127-140, 1999.
- GRAVES, L.M., SWAMINATHAN, B. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. **Int. J. Food Microbiol.** v.65, p.55-62, 2001.
- GUDMUNDSDOTTIR S, GUDBJORNSDOTTIR B, LAUZON HL, EINARSSON H, KRISTINSSON KG, KRISTJANSSON M. Tracing *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon and its processing environment in Iceland using pulsed-field gel electrophoresis. **Int. J. Food Microbiol.**, v.101, n.1, p.41-51, 2005.
- HARVEY, J., NORWOOD, D.E., GILMOUR, A. Comparison of repetitive element sequence-based PCR with multilocus enzyme electrophoresis and pulsed field gel electrophoresis for typing *Listeria monocytogenes* food isolates. **Food Microbiol.**, v.21, p.305–312, 2004.
- HEIR, E., LINDSTEDT, B-A., RØTTERUD, O-J., VARDUND, T., KAPPERUD, G., NESBAKKEN, T. Molecular epidemiology and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* from meat processing plants and human infections. **Int. J. Food Microbiol.**, v.96, n.1, p.85-96, 2004.
- HEREDIA, N., GARCÍA, S., ROJAS, G., SALAZAR, L. Microbiological Condition of Ground Meat Retailed in Monterrey, Mexico. **J. Food Prot.**, v.64, n.8, p.1249-1251, 2001.

- HOFER, E., NASCIMENTO, R.S., OLIVEIRA, M.A. Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, n.2, p.173-177, 1998.
- HOFER, C.B., MELLES, C.E.A., HOFER, E. *Listeria monocytogenes* in renal transplant recipients. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.41, n.6, p.375-377, 1999.
- HOFER, E., RIBEIRO, R., FEITOSA, D.P. Species and Serovars of the Genus *Listeria* Isolated from Different Sources in Brazil from 1971 to 1997. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.95, n.5, p.615-620, 2000.
- JOHNSON, J.L. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from meat, poultry and egg products. In: **USDA-FSIS Microbiology Laboratory guidebook**. 3^a Ed., v.1, 1998.
- JOHNSTON, A.M. Animal health and food safety. **British Med. Bull.**, v.56, n.1, p.51-61, 2000.
- KALAC, P. A review of some aspects of possible association between feeding of silage and animal health. **British Veter. Jour.**, v.138, p.314-315, 1982.
- KALENDER, H. Detection of *Listeria monocytogenes* in Faeces from Chickens, Sheep and Cattle in Elaziğ Province. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**, v.27, p.449-451, 2003.
- 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.1, p.63-67, 1999.
- LEME-MARQUES, E.G., CRUZ, C.D., DESTRO, M.T. Caracterizacion fenotipica y genotipica de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de casos clínicos en la region de Campinas, SP, Brasil. **XVII Congresso Latinoamericano de Microbiologia**, Buenos Aires, Argentina, 18 a 21 outubro de 2004. (resumo)

- LOGUÉRCIO, A.P., ALEIXO, J.A.G., SILVA, W.P. Isolamento e identificação de *Listeria* spp em carcaças bovinas resfriadas. In: **XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2000, Fortaleza. XVII CBCTA - Livro de Resumos. Fortaleza: SBCTA, 2000. v. 1. p. 4.
- LOW, J.C., DONACHIE, W. A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. **The Veterinary Journal**, v.153, p.9-29, 1997.
- LUNDÉN, J.M., MIETTINEM, M.K., AUTIO, T.J., KORKEALA, H.J. Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. **J. Food Prot.**, v.63, n.9, p.1204-1207, 2000.
- LUNDÉN, J.M., AUTIO, T.J., SJÖBERG, A-M., KORKEALA, H.J. Persistent and Nonpersistent *Listeria monocytogenes* Contamination in Meat and Poultry Processing Plants. **J. Food Prot.**, v.66, n.11, p.2062–2069, 2003.
- MADDEN, R.H., ESPIE, W.E., MORAN, L., MCBRIDE, J., SCATES, P. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on beef carcasses in Northern Ireland. **Meat Science**, v.58, p.343-346, 2001.
- MAIJALA, R., LYYTIKAINEN, O., JOHANSSON, T., AUTIO, T., AALTO, T., HAAVISTO, L., HONKANEN-BUZALSKI, T. Exposure of *Listeria monocytogenes* within an epidemic caused by butter in Finland. **Int. J. Food Microbiol.**, v.70, p.97–109, 2001.
- 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. **Int. J. Food Microbiol.** v.42, p.207-212, 1998.
- MASCOLA, L., SORVILLO, F., GOULET, V., HALL, B., WEAVER, R., LINNAN, M. Fecal carriage of *Listeria monocytogenes*: Observations during a community-wide, common-source outbreak. **Clinical Infectious Diseases** v.15, p.557-558, 1992.
- MCLAUCHLIN, J., LOW, J.C. Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational disease of veterinarians and farmers. **Veterinary Record**, v.135, p.615-617, 1994.

- MENA, C., ALMEIDA, G., CARNEIRO, L., TEIXEIRA, P., HOGG, T., GIBBS, P.A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. **Food Microbiol.**, v.21, p.213–216, 2004.
- MOLTZ, A.G., MARTIN, S.E. Formation of Biofilms by *Listeria monocytogenes* under Various Growth Conditions. **J. Food Prot.**, v.68, n.1, p.92-97, 2005.
- NEL, S., LUES, J.F.R., BUYS, E.M., VENTER, P. Bacterial populations associated with meat from the deboning room of a high throughput red meat abattoir. **Meat Science**, v.66, p.667–674, 2004.
- NESBAKKEN, T., KAPPERUD, G., CAUGANT, D.A. Pathways of *Listeria monocytogenes* contamination in the meat processing industry. **Int. J. Food Microbiol.**, v.31, p.161-171, 1996.
- NORRUNG, B., ANDERSEN, J.K., SCHLUNDT, J. Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. **Int. J. Food Microbiol.** v.53, p.195-203, 1999.
- OKUTANI, A., OKADA, Y., YAMAMOTO, S., IGIMI, S. Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan. **Int. J. Food Microbiol.**, v.93, p.131– 140, 2004.
- PECCIO, A., AUTIO, T., KORKEALA, H., ROSMINI, R., TREVISANI, M. *Listeria monocytogenes* occurrence and characterization in meat-producing plants. **Lett. Appl. Microbiol.** , v.37, p.234–238, 2003.
- PELL, A.N. Manure and Microbes: Public and Animal Health Problem? **J. Dairy Sci.** v.80, p.2673-2681, 1997.
- PERRIN, M., BEMER, M., DELAMARE, C. Fatal Case of *Listeria innocua* Bacteremia. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, n.11, p. 5308–5309, 2003.
- PERRY, C.M., DONNELLY, C.W. Incidence of *Listeria monocytogenes* in silage and its subsequent control by specific and nonspecific antagonism. **J. Food Prot.**, v.53, n.8, p.642-647, 1990.

- PETERSEN, L., MADSEN, M. *Listeria* spp. in broiler flocks: recovery rates and species distribution investigated by conventional culture and the EiaFoss method. **Int. J. Food Microbiol.** v.58, p.113-116, 2000.
- PICCHI, V.; SILVA, E. O. T. R.; SOUZA, S. L. P.; BALIAN, S. C. Isolamento e identificação de *Listeria* spp, em quartos dianteiros de bovinos desossados. **Higiene Alimentar**, v.13, n.63, p.38-42, 1999.
- RIVERA-BETANCOURT, M., SHACKELFORD, S.D., ARTHUR, T.M., WESTMORELAND, K.E., BELLINGER, G., ROSSMAN, M., REAGAN, J.O., KOOHMARAIE, M. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in Two Geographically Distant Commercial Beef Processing Plants in the United States. **J. Food Prot.**, v.67, n.2, p.295–302, 2004.
- ROCOURT, J., JACQUET, CH., REILLY, A. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. **Int. J. Food Microbiol.** v.62, p.197-209, 2000.
- RORVIK, L.M., YNDESTAD, M. *Listeria monocytogenes* in foods in Norway. **Int. J. Food Microbiol.** v.13, p.97-104, 1991.
- RYSER, E.T., MARTH, E.H. ***Listeria, Listeriosis, and Food Safety***. 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc. 738P. New York, USA, 1999.
- SAKATE, R.I., SANTOS, F.L., BRANDÃO, S.C.C. Elaboração e Planejamento do Sistema HACCP para Estábulo Leiteiro. **Higiene Alimentar**, v.13, n.65, p.30-36, 1999.
- SAKATE, R.I., ARAGON, L.I., RAGHIANTE, F., LANDGRAF, M., FRANCO, B.D.G.M., DESTRO, M.T. Quantificação de *Listeria monocytogenes* em salames fatiados embalados a vácuo. **Archivos Latinoamericanos de Nutrition**, v.53, n.2, p.184-187, 2003.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T., eds. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. v.3.

- SANAA, M., POUTREL, B.; MENARD, J.L.; SERIEYS, F. Risk factors associated with contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* in dairy farms. **J. Dairy Sci.** , v.76, p.2891-2898, 1993.
- 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. **J. Food Prot.**, v.67, n.7, p.1417-1428, 2004.
- SCHUCHAT, A., SWAMINATHAN, B., BROOME, C.V. Epidemiology of human listeriosis. **Clin. Microbiol. Review**, v.4, p.169-183, 1991.
- SCHWAB, J.P., EDELWEISS, M.I.A. Identificação de *Listeria monocytogenes* em placentas humanas e espécimes de aborto pela técnica de imunohistoquímica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 2, p.111-114, 2003.
- SENCZEK, D., STEPHAN, R., UNTERMANN, F. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from a meat processing plant over a 2-year period. **Int. J. Food Microbiol.**, v.62, p.155-159, 2000.
- SERGELIDIS, D., ABRAHIM, A., SARIMVEI, A., PANOULIS, C., KARAIOANNOGLOU, Pr., GENIGEORGIS, C. Temperature distribution and prevalence of *Listeria* spp. in domestic, retail and industrial refrigerators in Greece. **Int. J. Food Microbiol.**, v.34, p.134-137, 1997.
- SIRAGUSA, G.R., DICKSON, J.S., DANIELS, E.K. Isolation of *Listeria* spp. from feces of feedlot cattle. **J. Food Prot.**, v.56, n.2, p.102-105/109, 1993.
- SKIDMORE, A. G. Listeriosis at Vancouver General Hospital, 1965-79. **Canadian Medical Association**, v.125, p.1217-1221, 1981.

- SLUTSKER, L., SCHUCHAT, A. Listeriosis in humans *in* : RYSER, E.T., MARTH, E.H. eds. ***Listeria, Listeriosis and Food Safety***. Food Science and Technology. New York, Marcel Dekker, Inc. p.75-95, 1999.
- 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. **J. Food Prot.**, v.67, n.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 Decontamination Washings and Its Subsequent Inactivation with Sanitizers. **J. Food Prot.**, v.65, n.11, p.1717-1727, 2002.
- SUIHKO, M-L., SALO, S., NICLASSEN, O., GUDBJÖRNSDÓTTIR, B., TORKESSON, G., BREDHOLT, S., SJÖBERG, A-M., GUSTAVSSON, P. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from the meat, poultry and seafood industries by automated ribotyping. **Int. J. Food Microbiol.**, v.72, p.137-146, 2002.
- TAVARES-NETO, J., OLIVEIRA, G.F., COUTO-JUNIOR, A., ANDRADE, J., HOFER, E. Inquerito soro-epidemiológico antilisteria em Uberaba, MG. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.29, n.1, p.41-45, 1996.
- TÚÑON, G.I.L., VANETTI, M.C.D. Isolamento de *Listeria* em indústrias de laticínios . **VI Congresso Latinoamericano de Microbiologia de Alimentos**, LAS-ICMSF/DAMYC-AAM, Buenos Aires, Argentina, 20 a 24 de novembro de 2000 (resumo – C-10).
- WIEDMANN, M., BRUCE, J.L., KNORR, R., BODIS, M., COLE, E.M., MCDOWELL, C.I., MCDONOUGH, P.L., BATT, C.A. Ribotype Diversity of *Listeria monocytogenes* Strains Associated with Outbreaks of Listeriosis in Ruminants. **J. Clin. Microbiol.**, v.34, n.5, p.1086–1090, 1996.
- WINTER, P., SCHILCHER, F., BAGO, Z., SCHODER, D., EGERBACHER, M., BAUMGARTNER, W., WAGNER, M. Clinical and Histopathological Aspects of

Naturally Occurring Mastitis Caused by *Listeria monocytogenes* in Cattle and Ewes. **J. Vet. Med. B.**, v.51, p.176-179, 2004.

VALK, H., VAILLANT, V., JACQUET, C., ROCOURT, J., LE QUERREC, F., STAINER, F., QUELQUEJEU, N., PIERRE, O., PIERRE, V., DESENCLOS, J-C., GOULET, V. Two Consecutive Nationwide Outbreaks of Listeriosis in France, October 1999–February 2000. **American Journal of Epidemiology**, v.154, n.10, p.944-950, 2001.

VANDERLINDE, P.B., SHAY, B., MURRAY, J. Microbiological Quality of Australian Beef Carcass Meat and Frozen Bulk Packed Beef. **J. Food Prot.** v.61, n. 4, p. 437-443, 1998.

ZANARDI, A.M.P. Avaliação da qualidade microbiológica de refeições servidas a bordo de aeronaves. Tese doutorado. **Fac. Saúde Pública/USP**, 101pp., 2002.

YOKOYAMA, E., MARUYAMA, S., KATSUBE, Y. Production of bacteriocin-like-substance by *Listeria innocua* against *Listeria monocytogenes*. **Int. J. Food Microbiol.**, v.40, p.133–137, 1998.