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

***Listeria monocytogenes* em matadouros de aves: marcadores
sorológicos e genéticos no monitoramento de sua
disseminação**

Eb Chiarini

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof. Dra. Maria Teresa Destro

São Paulo

2007

Eb Chiarini

Listeria monocytogenes em matadouros de aves: marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Maria Teresa Destro
Orientadora/presidente

Dr. Ariel Antônio Mendes
1º. examinador

Dra. Simone Balian de Carvalho
2º. examinador

Dra. Bernadette D. G. M. Franco
3º. examinador

Dra. Susana Marta I. Saad
4º. examinador

São Paulo, 28 de maio de 2007.

*Mario ('in memorian') e Edna,
amados pais que dedicaram suas
vidas à formação da minha,
enchendo-a de exemplos de amor e
honestidade que norteiam a minha
vida. São, sem dúvida, o alicerce
desta conquista;*

*Laercio, Seila e Marcelo,
queridos irmãos sempre
presentes com palavras carinhosas
e incentivadoras.*

*Cristian,
que em todos os momentos soube confiar e
compreender as dificuldades, sempre atento
às minhas necessidades, que acreditando em
meu potencial muito me apoiou e incentivou
para que obtivesse o sucesso almejado.*

AGRADECIMENTOS

À professora Maria Teresa Destro, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho, por acreditar em mim, pelo carinho, pelo incentivo, por ajudar em meu crescimento e pelos bons exemplos de conduta ética na vida profissional.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão de bolsas de estudos que permitiram atingir o objetivo almejado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro essencial para a execução deste trabalho.

Aos matadouros-frigoríficos que permitiram as várias coletas de amostras, permitindo meu acesso às várias seções dos estabelecimentos, sem questionar a validade das mesmas na pesquisa.

Aos funcionários dos Serviços de Inspeção Federal, sempre solícitos e disponíveis no auxílio das coletas de amostras.

Aos Drs. Jeffrey M. Farber e Franco Pagotto, pela oportunidade de desenvolvimento de parte desta pesquisa no Bureau of Microbial Hazards, no Health Canada.

Aos funcionários e estagiários do Bureau of Microbial Hazards pelos ensinamentos, amizade e paciência na tentativa de me entender.

À professora Mariza Landgraf pelo apoio, pela humildade e por acreditar na capacidade de cada um.

À professora Bernadette D. G. M. Franco, pelo amor à pesquisa e à vida acadêmica, minha sincera admiração.

À Lucia e Kátia, pela amizade, carinho e ajuda no decorrer desta pesquisa.

Aos colegas, pelas várias ajudas, pelos bons momentos de convívio e pelos laços de amizade estabelecidos.

À Elaine, Jorge, Mônica e Majô, pela amizade e disponibilidade em ajudar, sempre que solicitados.

Às bibliotecárias Leila Bonadio e Maria Luiza pelo auxílio no cumprimento das normas de formatação desta tese.

Ao Eric e à Lucy Balmer, pelo incentivo constante.

A tantas pessoas que se fizeram presentes, embora não nomeadas individualmente, que me apoiaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

*A mente que se abre a uma nova idéia
jamais volta ao seu tamanho original.*
(Albert Einstein)

CHIARINI, E. *Listeria monocytogenes* em matadouros de aves: marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação. 2007. 149p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

RESUMO

O Brasil é o maior exportador de carne de frango e o terceiro maior produtor desta carne. O consumo desta fonte de proteína tem aumentado bastante nos últimos anos, tendo passado de 23,2 Kg/habitante em 1995 para 35,5 Kg/habitante em 2005. O mercado internacional tem se tornado cada vez mais exigente com relação aos padrões microbiológicos destes produtos. Pela importância das aves para a economia brasileira e por *Listeria monocytogenes* apresentar alta taxa de mortalidade, além de ser facilmente encontrada em carne de aves, decidiu-se verificar a ocorrência deste patógeno em dois matadouros, um com evisceração automática (Planta A) e outro com evisceração manual (Planta M), e traçar as possíveis rotas da disseminação do microrganismo na linha de processamento. Do total de 851 amostras coletadas de produtos, das superfícies de contato e de não contato com o produto, das mãos dos manipuladores e da água utilizada durante o processo de abate, 423 amostras foram da Planta A e 428 da Planta M. O teste VIP[®] *Listeria* foi utilizado para a triagem das amostras, sendo que aquelas positivas foram submetidas à caracterização fenotípica (provas bioquímicas e ágar cromogênico). A identificação e a tipagem das cepas foi realizada por técnicas moleculares (BAX[®] System, multiplex-PCR 16S rRNA, multiplex-PCR, ribotipagem e PFGE). *L. monocytogenes* foi isolada de 20,1% das amostras da Planta A, sendo 61,6% pertencentes ao sorogrupo 4b, 4d ou 4e; 19,2% ao sorogrupo 1/2a ou 3a; 15,2% ao sorogrupo 1/2c ou 3c; e 4,0% ao sorogrupo 1/2b, 3b ou 7. Na Planta M, 16,4% das amostras foram positivas para *L. monocytogenes*, havendo predomínio do sorogrupo

1/2a ou 3a (72,9%), seguido do sorogrupo 4b, 4d ou 4e (27,1%). Baseado nos resultados dos testes para caracterização fenotípica e genotípica, verificou-se que *L. monocytogenes* presente no produto final apresentou características semelhantes às aquelas presentes na planta, e não no animal. Apenas uma cepa foi isolada na zona suja da Planta A, piso da seção de depenagem, e todas as demais foram isoladas da zona limpa de ambas as plantas.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*. Aves. Disseminação das cepas. Tipagem molecular.

CHIARINI, E. *Listeria monocytogenes* in poultry facilities: serologic and genetic markers to trace its dissemination. 2007. 149p. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ABSTRACT

Brazil is the first exporter of chicken meat and the third producer of this kind of meat in the world. The consumption of this protein source in Brazil has been increasing, having passed from 23.2 Kg/inhabitant in 1995 to 35.5 Kg/inhabitant in 2005. The international market has become more demanding for safety of these products. Because of the importance of this food commodity to Brazilian economy and because of *Listeria monocytogenes* importance as a foodborne pathogen this study was conducted. The presence of the pathogen in two facilities, one with automatic evisceration (Plant A) and another with manual evisceration (Plant M), was evaluated to identify possible routes of microorganism dissemination in the processing line. From a total of 851 collected samples of products, food contact and non-food contact surfaces, workers' hands and water used in the process, 423 samples were from Plant A and 428 from Plant M. VIP[®] *Listeria* was used for the samples screening, positive ones were plated and suspected characteristic colonies submitted to biochemical characterization. Selected strains were submitted to identification and typing by molecular techniques (BAX[®] System, multiplex-PCR 16S rRNA, multiplex-PCR, ribotyping and PFGE). *L. monocytogenes* was isolated in 20.1% of the samples from Plant A with 61.6% belonging to serogroup 4b, 4d or 4e; 19.2% to serogroup 1/2a or 3a; 15.2% to serogroup 1/2c or 3c; and 4.0% to serogroup 1/2b, 3b or 7. From Plant M 16.4% of the samples were positive for *L. monocytogenes*, with predominance of serogroup 1/2a or 3a (72.9%) followed by serogroup 4b, 4d or 4e (27.1%). Based on the results of phenotypic and genotypic characterization, it was verified that *L. monocytogenes* present in the final product had

similar characteristics to those isolated in the plant, and not in the animals. Only one strain was isolated in the dirty zone of Plant A, on the floor of defeathering section, and all others were isolated in the clean zone of both plants.

Key words: *Listeria monocytogenes*. Poultry. Strains dissemination. Molecular typing.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	25
2. OBJETIVOS	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 MATERIAL	45
3.1.1 Amostragem das superfícies de contato com o produto	47
3.1.2 Amostragem das superfícies sem contato com o produto	48
3.1.3 Produtos	50
3.1.4 Amostras de água	51
3.1.5 Mãos dos manipuladores	51
3.2 MÉTODOS	51
3.2.1 Preparo das amostras	51
3.2.2 Pesquisa da ocorrência de <i>Listeria</i> spp.	52
3.2.3 Isolamento da <i>Listeria</i> spp.	53
3.2.4 Identificação fenotípica dos isolados de <i>Listeria</i> spp.	54
3.2.4.1 Identificação bioquímica dos isolados de <i>Listeria</i> spp. pelos métodos tradicionais	54
3.2.4.2 Avaliação dos isolados empregando-se o meio cromogênico RAPID'L.Mono TM (BioRad, EUA)	55
3.2.4.3 Perfil de resistência a antimicrobianos	55
3.2.4.3.1 Análise do perfil de resistência a antimicrobianos de difusão com discos ..	55
3.2.4.3.2 Sensibilidade dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> a antimicrobianos por <i>spiral gradient endpoint</i> – SGE (PATON <i>et al.</i> , 1990)	58
3.2.5 Identificação genotípica dos isolados de <i>L. monocytogenes</i>	60
3.2.5.1 Identificação por PCR-tempo real dos isolados de <i>L. monocytogenes</i>	60

3.2.5.2 Identificação da <i>L. monocytogenes</i> por multiplex-PCR baseado na sequência do 16S rRNA e do gene da listeriolisina (<i>hlyA</i>) (BUENAVENTURA <i>et al.</i> , 2005) ..	61
3.2.5.3 Identificação dos sorotipos de <i>L. monocytogenes</i>	63
3.2.5.3.1 Sorotipagem molecular	63
3.2.5.3.2 Sorotipagem convencional	66
3.2.5.4 Caracterização molecular da <i>L. monocytogenes</i> por ribotipagem	66
3.2.5.5 Caracterização molecular da <i>L. monocytogenes</i> por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	67
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1 Ocorrência de <i>Listeria</i> spp. em dois matadouros frigoríficos de aves	69
4.1.1 Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> na Planta A	72
4.1.2 Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> na Planta M	77
4.2 Avaliação fenotípica e genotípica dos isolados de <i>L. monocytogenes</i>	91
4.3 Perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de <i>L. monocytogenes</i>	98
4.4 Identificação sorológica dos isolados de <i>L. monocytogenes</i>	101
4.4.1 Sorotipagem molecular	101
4.4.2 Sorologia convencional	107
4.5 Perfil genético das cepas de <i>L. monocytogenes</i>	108
4.5.1 Ribotipagem	108
4.5.2 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	109
5. CONCLUSÕES	129
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
7. ANEXOS	141

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Fluxograma do abate e do processamento de cortes congelados de frango e CMS (carne mecanicamente separada), com a identificação dos pontos de coleta de amostras: A = água, P = produto, E = superfície de contato com produto, S = superfície sem contato com produto e M = mãos do manipulador	49
Figura 2. Representação dos resultados obtidos no teste VIP® <i>Listeria</i> (BioControl Systems)	53
Figura 3. Deposição do antimicrobiano pelo <i>Spiral plater</i> (Fischer Scientific, EUA), começando 13 mm do centro da placa. Deposição de corante para visualização da deposição em espiral e da diferença de concentração do agente antimicrobiano na placa	58
Figura 4. Representação esquemática da distribuição das suspensões de bactéria na placa para realização do <i>spiral gradient endpoint</i> (SGE)	59
Figura 5. Placa de ágar Mueller-Hinton inoculada com suspensões de <i>L. monocytogenes</i> em duplicatas para realização do <i>spiral gradient endpoint</i> (SGE), após 24 horas de crescimento a 37 °C	60
Figura 6. 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. Genes correspondentes ao fragmento amplificado estão indicados do lado direito. Tamanhos das bandas do peso molecular estão indicados do lado esquerdo (DOUMITH <i>et al.</i> , 2004)	65

Figura 7. Fluxograma do abate e do processamento de cortes congelados de frango e CMS (carne mecanicamente separada), com a identificação dos pontos de coleta: A = água, P = produto, E = superfície de contato com produto, S = superfície sem contato com produto e M = mãos do manipulador. Os pontos e seções marcados em azul representam locais onde houve o isolamento da <i>L. monocytogenes</i>	70
Figura 8. Distribuição das diferentes espécies de <i>Listeria</i> em dois matadouros de aves, um com evisceração automática (Planta A) e outro com evisceração manual (Planta M)	71
Figura 9. Distribuição das amostras positivas para <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> e <i>L. welshimeri</i> nos cinco grupos de amostras coletadas no matadouros com evisceração automática (Planta A)	72
Figura 10. Distribuição das amostras positivas para <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> e <i>L. welshimeri</i> nos cinco grupos de amostras coletadas em matadouro de aves com evisceração automática (Planta M)	77
Figura 11. Modelo de afiador de facas semelhante ao utilizado na Planta A	87
Figura 12. Chaira utilizada na Planta M	88
Figura 13. Perfis dos isolados obtidos empregando-se Multiplex-PCR 16S rRNA. Linhas 1 e 12, marcador de peso molecular (DNA Molecular Weight Marker XIV, Roche); linhas 2 e 3, <i>Listeria</i> spp. (cepas 750 e 751); linhas 4 a 10, <i>L. monocytogenes</i> (isolados 801, 802, 803, 804, 805, 806 e 807); e linha 11, controle negativo	94
Figura 14. Perfis encontrados na sorotipagem molecular (DOUMITH <i>et al.</i> , 2005) das cepas isoladas nos matadouros de aves. Linhas 1 e 8, marcador de peso molecular (DNA Molecular Weight Marker XIV, Roche); linha 2, sorotipo 1/2a ou 3a (cepa 421); linha 3, sorotipo 1/2b, 3b ou 7 (cepa 603); linha 4, sorotipo 1/2c ou 3c (cepa 605); linha 5, sorotipo 4b, 4d ou 4e (cepa 602); linha 6, sorotipo inespecífico (cepa 515); e linha 7, <i>L. innocua</i> (cepa 617). Consultar Tabela 9 para localização da origem das cepas	104

Figura 15. Alguns perfis de cepas submetidas à ribotipagem pelo RiboPrinter [®] , destacando os ribogrupos já existentes (*) e identificação de novos ribogrupos	109
Figura 16. Alguns dos perfis obtidos na macrorrestrição do DNA de <i>L. monocytogenes</i> com a enzima ApaI submetidas ao PFGE. Linhas 1, 8 e 15, padrão de peso molecular (<i>Salmonella</i> sorovar Braenderup, cepa H9812, digerida com a enzima XbaI), linhas 2 a 7 e 9 a 14, cepas de <i>L. monocytogenes</i> de diferentes fontes	110
Figura 17. Alguns dos perfis obtidos na macrorrestrição do DNA de <i>L. monocytogenes</i> com a enzima AscI submetidas ao PFGE. Linhas 1, 8 e 15, padrão de peso molecular (<i>Salmonella</i> sorovar Braenderup, cepa H9812, digerida com a enzima XbaI), linhas 2 a 7 e 9 a 14, cepas de <i>L. monocytogenes</i> de diferentes fontes	111
Figura 18. Dendrograma indicando a relação genética entre os isolados de <i>L. monocytogenes</i> avaliados. Azul, cepas <i>Listeria</i> spp.; verde, reação negativa de hemólise; amarelo, cepas com banda extra na sorotipagem molecular, e cor-de-rosa, cepas resistentes a três antibióticos	120

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Características bioquímicas das espécies do gênero <i>Listeria</i> (modificado de PAGOTTO <i>et al.</i> , 2006)	54
Tabela 2. Perfil de resistência a antimicrobianos, por difusão em discos, das três cepas utilizadas como controles positivo e/ ou negativo	57
Tabela 3. Sequência de nucleotídeos dos oligonucleotídeos utilizados na identificação de <i>L. monocytogenes</i> pela da sequência do 16S rRNA e gene da listeriolisina (<i>hlyA</i>) com multiplex-PCR (BUENAVENTURA <i>et al.</i> , 2005)	62
Tabela 4. Interpretação dos resultados do multiplex-PCR 16S rRNA e gene da listeriolisina, de acordo com o tamanho do fragmento obtido na técnica (BUENAVENTURA <i>et al.</i> , 2005)	63
Tabela 5. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na sorotipagem molecular de <i>L. monocytogenes</i> (DOUMITH <i>et al.</i> , 2004)	64
Tabela 6. Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> e <i>L. welshimeri</i> em dois matadouros de aves, um com evisceração automática (Planta A) e outro com evisceração manual (Planta M)	71
Tabela 7. Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> (Lm), <i>L. innocua</i> (Li) e <i>L. welshimeri</i> (Lw) nos produtos coletados em matadouro de aves com evisceração automática (Planta A)	73
Tabela 8. Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> (Lm), <i>L. innocua</i> (Li) e <i>L. welshimeri</i> (Lw) nas amostras de superfícies de contato com o produto coletadas em matadouro de aves com evisceração automática (Planta A)	74
Tabela 9. Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> (Lm), <i>L. innocua</i> (Li) e <i>L. welshimeri</i> (Lw) nas amostras de superfícies sem contato com o produto coletadas em matadouro de aves com evisceração automática (Planta A)	75

Tabela 10.	Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> (Lm), <i>L. innocua</i> (Li) e <i>L. welshimeri</i> (Lw) nas amostras de mãos dos manipuladores coletadas em matadouro de aves com evisceração automática (Planta A)	76
Tabela 11.	Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> (Lm), <i>L. innocua</i> (Li) e <i>L. welshimeri</i> (Lw) nas amostras de água coletadas em matadouro de aves com evisceração automática (Planta A)	76
Tabela 12.	Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> (Lm), <i>L. innocua</i> (Li) e <i>L. welshimeri</i> (Lw) nos produtos coletados em matadouro de aves com evisceração manual (Planta M)	78
Tabela 13.	Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> (Lm), <i>L. innocua</i> (Li) e <i>L. welshimeri</i> (Lw) nas amostras de superfícies de contato com o produto coletadas em matadouro de aves com evisceração manual (Planta M)	79
Tabela 14.	Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> (Lm), <i>L. innocua</i> (Li) e <i>L. welshimeri</i> (Lw) nas amostras de superfícies sem contato com o produto coletadas em matadouro de aves com evisceração manual (Planta M)	80
Tabela 15.	Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> (Lm), <i>L. innocua</i> (Li) e <i>L. welshimeri</i> (Lw) nas amostras de mãos dos manipuladores coletadas em matadouro de aves com evisceração manual (Planta M)	81
Tabela 16.	Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> (Lm), <i>L. innocua</i> (Li) e <i>L. welshimeri</i> (Lw) nas amostras de água coletadas em matadouro de aves com evisceração manual (Planta M)	81
Tabela 17.	Identificação e caracterização fenotípica e genotípica, realizada no BMH/HC – Canadá, dos 221 isolados obtidos em dois matadouros frigoríficos e previamente identificados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF/USP como <i>L. monocytogenes</i>	93
Tabela 18.	Distribuição das amostras positivas para <i>L. monocytogenes</i> (Lm) e número de cepas obtidas em dois matadouros de aves, um com evisceração automática (Planta A) e outro com evisceração manual (Planta M), de acordo com resultados obtidos na identificação genotípica	95

Tabela 19.	Origem e identificação das 210 cepas de <i>L. monocytogenes</i> obtidas em dois matadouros de aves, um com evisceração automática (Planta A) e outro com evisceração manual (Planta M)	96
Tabela 20.	Perfil de resistência a antimicrobianos, por difusão em discos, das 210 cepas de <i>L. monocytogenes</i> obtidas em dois matadouros de aves, baseado nos critérios do NCCLS (UNITED STATES, 2003)	99
Tabela 21.	Perfil de resistência a antimicrobianos, por <i>spiral gradient endpoint</i> – SGE (PATON <i>et al.</i> , 1990), das 63 cepas de <i>L. monocytogenes</i> obtidas em dois matadouros de aves, baseado nos critérios NCCLS (UNITED STATES, 2003)	100
Tabela 22.	Distribuição dos sorotipos de <i>L. monocytogenes</i> isolados em dois matadouros de aves, um com evisceração automática (Planta A) e outro com evisceração manual (Planta M)	103
Tabela 23.	Proporção de similaridade dos fragmentos seqüenciados das 29 cepas de <i>L. monocytogenes</i> identificadas no BLAST. Destaque para as cepas que apresentaram simultaneamente seqüências genéticas de <i>L. monocytogenes</i> F2365 e <i>L. monocytogenes</i> EGD	106
Tabela 24.	Distribuição das 210 cepas de <i>L. monocytogenes</i> isoladas em dois matadouros de aves, conforme os 104 perfis combinados de PFGE obtidos com enzimas ApaI e AscI	112
Tabela 25.	Distribuição dos grupos genéticos obtidos pela análise composta dos perfis obtidos pela PFGE, após digestão com as enzimas AscI e ApaI, nas cepas de <i>L. monocytogenes</i> isoladas em dois matadouros frigoríficos, um com evisceração automática (Planta A) e outro com evisceração manual (Planta M). Cores iguais foram usadas para representar os mesmos grupos	116

1. INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é um microrganismo há muito conhecido como causador de doenças em animais, mas na década de 1980 teve seu reconhecimento como importante patógeno humano, depois de surtos de listeriose ocorridos na América do Norte e na Europa terem sido epidemiologicamente considerados de origem alimentar. Após estes surtos, que apresentaram alta letalidade, as indústrias processadoras de alimentos foram alertadas para a importância da ocorrência deste microrganismo em seus produtos.

A listeriose em humanos se caracteriza por infecções do sistema nervoso central (meningite, encefalite, meningoencefalite), bacteremia primária e septicemia, sendo que estas formas de doença pressupõem como causa primária a deficiência da resistência orgânica, como, por exemplo, em pacientes com doença de Hodgkin (BERMUDEZ *et al.*, 1984), câncer (BARNES *et al.*, 1989) e lúpus eritematoso sistêmico (FARBER e PETERKIN, 1991; HOFER *et al.*, 1998; KACZMARSKI e JONES, 1989), como também nos portadores do vírus HIV que são considerados os mais sensíveis (EWERT *et al.*, 1995), entre outros.

Adultos saudáveis podem ser portadores, apresentando sintomas desde um simples resfriado (GRAVANI, 1987) até uma gastroenterite severa (SALAMINA *et al.*, 1996; SWAMINATHAN *et al.*, 1995).

Mulheres grávidas também apresentam predisposição para a listeriose. Além de sintomas de gripe com febre aguda, pode haver decréscimo do movimento fetal e indução prematura do trabalho de parto. Diarréia, dores abdominais e dores lombares são menos comuns, mas podem ocorrer (JAY, 2000).

Portanto, gravidez, extremos de idade e depressão do sistema imunológico predis põem os indivíduos à doença (SCHLECH *et al.*, 1983; FARBER e PETERKIN, 1991). A fatalidade para o grupo de risco variou entre 29 e 44% nos três surtos ocorridos na América do Norte, na década de 1980 (BAILEY *et al.*, 1989).

São poucos os estudos clínicos realizados no Brasil, mas de três pacientes com listeriose isolou-se *L. monocytogenes* sorotipo 4b e sorotipo 1/2a, sendo que todos apresentavam meningite. Estes pacientes pertenciam aos grupos de risco, sendo um bebê com 10 dias de vida, uma criança com 8 anos de idade e uma mulher portadora de lúpus eritematoso sistêmico (HOFER *et al.*, 1998). Em outro estudo registrou-se que de cinco crianças recém-nascidas em um mesmo centro obstétrico de um hospital da Grande São Paulo, foi isolada *L. monocytogenes* do líquido cefalorraquidiano (LCR) (LANDGRAF *et al.*, 1999). Todas as cepas pertenceram ao mesmo sorotipo, L4b. A *L. monocytogenes* identificada e os sintomas característicos de meningite surgiram quatro a dez dias após o nascimento, sendo que três crianças faleceram.

Os casos isolados de listeriose são freqüentes e vêm sendo relatados, pelo menos, há quatro décadas (SCHWARTZ *et al.*, 1988). Segundo Gillespie *et al.* (2007), entre 1990 e 2004, na Inglaterra e Países de Gales, 1.933 casos de listeriose foram notificados, e entre 2001 e 2004 houve substancial aumento de casos.

De acordo com Lee (2007), os casos anuais de listeriose nos Estados Unidos da América são da ordem de 2.500, 90% destes geram hospitalizações e 20% vão a óbito; no Canadá, entre 1993 e 2003 foi registrada a média de 59 casos anuais.

Por causa da gravidade da listeriose, todos os esforços para evitar a contaminação durante o preparo de alimentos devem ser feitos, como também deve-se evitar a recontaminação do alimento pronto para o consumo. A dose infectante ainda

não está estabelecida, entretanto estima-se que seja superior a 100 UFC/g de alimento (FARBER e PETERKIN, 1991).

Os dois maiores recolhimentos da história do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), ambos de aproximadamente 35 mil toneladas cada, sendo os alimentos incriminados: cachorro quente, carne embalada e vários produtos, foram realizados devido à presença de *L. monocytogenes*. Estes, dentre outros recolhimentos ocasionados também pela presença de *L. monocytogenes*, proporcionaram perdas econômicas diretas e indiretas incalculáveis (UNITED STATES, 2006).

O USDA lançou a política de tolerância zero para *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo (RTE – *read-to-eat*). Esta atitude foi motivada pelo grande número de recolhimentos de produtos desde 1998, ano em que houve aumento no aparecimento de surtos. Desde aquela data até dezembro de 2006 foram realizados 200 recolhimentos, totalizando aproximadamente 65 mil toneladas de alimentos retirados do comércio (UNITED STATES, 2007).

Devido à alta ocorrência de *L. monocytogenes* nas aves, estas têm merecido atenção especial por parte de alguns pesquisadores.

Pini e Gilbert (1988), no Reino Unido, detectaram *L. monocytogenes* em 60% das amostras de frango resfriado e congelado examinadas.

Skovgaard e Morgen (1988) examinaram amostras de aves, coletadas em uma planta de abate na Dinamarca, e detectaram *L. monocytogenes* em 33% de amostras de fezes e em 47% de amostras de pele de pescoço.

Genigeorgis *et al.* (1989) analisaram 160 amostras de cortes de frango, sendo 50 de asa, 50 de fígado e 60 de coxa. As amostras eram procedentes de supermercados de Davis, Califórnia, EUA, e representavam três marcas nacionais. *L. monocytogenes*

foi isolada em 10%, 14% e 15% das amostras de asa, fígado e coxa, respectivamente. Em outro estudo, os mesmos pesquisadores analisaram o total de 120 amostras de asa e coxa de peru e isolaram *L. monocytogenes* em 20% e 13,3%, respectivamente (GENIGEORGIS *et al.* 1990).

Bailey *et al.* (1989) analisaram 90 carcaças inteiras de frango. As carcaças, de três marcas diferentes, foram adquiridas em mercados na região sudeste dos Estados Unidos. Das amostras foram isoladas *Listeria* sp. e *L. monocytogenes* em 38% e 23%, respectivamente.

Farber *et al.* (1989) examinaram coxas de frango, adquiridas no comércio local de Ottawa, Canadá, e detectaram *L. monocytogenes* em 56,3% das amostras analisadas.

Em Brisbane, Austrália, Varabioff (1990) analisou 80 frangos congelados, de quatro marcas diferentes, adquiridos em mercados, e 48 carcaças resfriadas das mesmas marcas, coletadas diretamente do produtor. Foi detectada *L. monocytogenes* em 15% das carcaças de frango congeladas e em 2,1% de carcaças resfriadas.

Serra *et al.* (1991) analisaram amostras de alimentos adquiridos em mercados e outros estabelecimentos em Barcelona, Espanha. De 168 amostras de carne picada, 60 eram de frango. *Listeria monocytogenes* estava presente em 18,3% destas amostras.

Na Itália, Bersani e Mioni (1991) analisaram 152 amostras de aves cruas (frango, peru e galinha d'angola), inteiras ou porcionadas, e detectaram *L. monocytogenes* em 17,1% das amostras. Além disso, analisaram também amostras de produtos de frango cozidos, isolando *L. monocytogenes* em 6,7%.

Trabalhando com carne de frango crua, originada de uma planta processadora de aves da Irlanda do Norte, Lawrence e Gilmour (1994) isolaram *L. monocytogenes* em 30% delas.

Franco *et al.* (1995) estudaram a presença de *Listeria* sp. em pedaços de frango (coxa, pele de coxa, pele de asa, peito e fígado) coletados em uma planta de processamento de aves na Galícia, Espanha. Foram analisadas 25 amostras de cada produto, com exceção de fígado, com quatro amostras. Nas amostras de fígado não foi detectada a presença de *Listeria* sp.. Nas demais, a porcentagem de isolamento de *Listeria* sp variou de 64 a 96% e de *Listeria* sp. hemolítica variou entre 52 e 84%.

Capita *et al.* (2001) isolaram *Listeria* sp. e *L. monocytogenes* de 95% e 32%, respectivamente, de carcaças resfriadas de frango adquiridas no mercado de León, na Espanha.

Na cidade do Porto, Portugal, Antunes *et al.* (2002) isolaram *L. monocytogenes* de 41% das 63 amostras de carcaça de frango adquiridas no comércio local.

Cento e cinquenta amostras de carcaças de frango, 95 amostras de frangos processados e embalados e 91 amostras de produtos embalados a vácuo oriundas de plantas processadoras de carne de frango na Noruega, no período de 1995-96, foram analisadas para verificar a frequência de *L. monocytogenes*. Setenta e cinco (50%) carcaças, 48 (51%) das carnes embaladas e 1 (1%) das carnes embaladas a vácuo foram positivas para *L. monocytogenes* (RØRVIK *et al.*, 2003).

Em estudo realizado em 3.685 amostras de alimentos crus e processados, em Navarra, Espanha, Vitas *et al.* (2004) analisaram 158 amostras de frango cru. A ocorrência de *Listeria* spp. foi detectada em 120 (75,9%). Destas amostras de frango positivas para *Listeria* spp., uma ou mais espécies de *Listeria* foram isoladas de uma mesma amostra. *L. monocytogenes* foi isolada de 57 (36,1%) amostras, *L. innocua* de 106 (67,4%), *L. welshimeri* de 6 (4,2%) e *L. seeligeri* de 2 (1,4%).

Em Gauteng, África do Sul, Van Nierop *et al.* (2005) encontraram, dentre as 99 amostras coletadas no comércio local, 19,2% de carcaças refrigeradas ou congeladas de frango, positivas para *L. monocytogenes*.

Praakle-Amin *et al.* (2006) estudaram a prevalência de *L. monocytogenes* em 240 amostras de coxas e sobrecoxas adquiridas no comércio varejista da Estônia, das quais 120 amostras eram originárias daquele país e 120 de outros países (Dinamarca, Finlândia, Hungria, Suécia e Estados Unidos da América). Das amostras originárias da Estônia, 88% foram positivas para o patógeno, prevalência significativamente maior do que das amostras oriundas dos demais países (53%) ($P < 0,001$).

A produção e o consumo de carne de frango têm aumentado consideravelmente ao redor do mundo, uma vez que esta fonte protéica tornou-se uma das mais baratas na atualidade e, certamente, a mais econômica entre as proteínas cárneas. O Brasil ocupa o terceiro lugar na produção mundial de carne de frango, atrás dos Estados Unidos da América e da China e, desde 2004, é o maior exportador mundial desta carne (ASSOCIAÇÃO, 2007).

A carne de aves é uma importante fonte de proteína para a população brasileira, com consumo estimado em 35,5 Kg hab/ano em 2005 (BRASIL, 2007). Neste mesmo ano foram abatidas 4.426.733.994 de cabeças de frango, representando aumento da ordem de 9,5%, com relação ao ano anterior (2004) (ASSOCIAÇÃO, 2007).

Apesar da grande produção brasileira de carne de frango e da posição de destaque que o país ocupa no panorama mundial, os dados sobre a presença de *Listeria* spp. em aves no Brasil ainda são escassos; mas alguns estudos têm sido realizados com estes e também com outros produtos cárneos.

Nunes (1994) analisou 80 amostras adquiridas no comércio de Goiânia, GO, sendo 20 amostras de carcaças congeladas, 20 de carcaças resfriadas, 20 de peitos e 20 de coxas com sobrecoxas. Foi isolada *L. monocytogenes* em 35% do total das amostras analisadas, sendo 50%, 15%, 50%, 25%, respectivamente.

Kabuki (1997) examinou dez amostras de peito de frango e vinte amostras de carcaça, ambas resfriadas, provenientes do comércio varejista da cidade de Campinas, SP. Foi isolada *L. monocytogenes* de 90% das amostras. Utilizando o método do Número Mais Provável (NMP), quantificou-se *Listeria* sp. e *L. monocytogenes* nas referidas amostras. Nas amostras de peito, o NMP, tanto de *Listeria* sp. quanto de *L. monocytogenes*, variou entre < 0,3 e 93/g; para as amostras de carcaça variou entre < 9 e $2,8 \times 10^3$ /carcaça.

Em um matadouro de frango no sul do Brasil, Reiter *et al.* (2005) analisaram 645 amostras de superfície, água e produtos de frango (carcaças, vísceras e partes). *L. monocytogenes* foi encontrada em 230 (35,6%) das amostras analisadas. A maioria das amostras positivas foi: 15 (100%) das 15 amostras de peito congelado, 14 (93,3%) das 15 amostras de asas congeladas, 25 (83,3%) das 30 amostras de peito refrigerado, 24 (80%) das 30 amostras de asas refrigeradas, 23 (76,7%) das 30 amostras de pele de peito, 9 (60%) das 15 amostras de coxas e sobrecoxas congeladas, e 15 (50%) das 30 amostras de coxas e sobrecoxas refrigeradas. Doze em 30 amostras de água do *chiller* e 10 em 30 amostras da água da escaldagem foram positivas para *L. monocytogenes*.

Barbalho *et al.* (2005) analisaram 66 amostras de carcaças de frango em diversos estágios da linha de abate, 37 amostras de luvas e de mãos dos manipuladores e 18 amostras de água do pré-*chiller* e *chiller*, em um matadouro na Bahia. *L. monocytogenes* foi isolada em 3/21 (14,3%) amostras de carcaças

embaladas, sendo do sorotipo 1b e 1c, e 4/37 (11,8%) amostras das luvas e mãos dos manipuladores, sorotipo 1b.

A ocorrência de *Listeria* spp. foi também avaliada por Bersot *et al.* (2001) em 30 amostras de mortadela de cinco marcas comerciais diferentes adquiridas no comércio varejista de São Paulo, tendo sido encontrados 26,7% de amostras com *L. monocytogenes*. Também verificaram que *L. monocytogenes* inoculadas no produto cru não puderam ser isoladas quando o processamento térmico atingiu 74 °C, independentemente da formulação das mortadelas. Bersot (2000) também verificou que as mortadelas fatiadas e embaladas a vácuo mantidas sob refrigeração são susceptíveis a multiplicação de *L. monocytogenes* durante a vida-de-prateleira, indicando que houve contaminação no fatiamento das mortadelas.

Amostras de carnes 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%.

Especial atenção deve receber os produtos prontos para consumo, uma vez que geralmente não são submetidos ao tratamento térmico antes da ingestão, o que permitiria a eliminação da *Listeria*. Quantificando *L. monocytogenes* em salames fatiados embalados a vácuo de marcas e tipos diferentes, Sakate *et al.* (2003) encontraram, nas 45 amostras analisadas, 3 (6,7%) com população de 9,2 NMP/g, sendo dois isolados pertencentes ao sorotipo 1/2a e um ao sorotipo 1/2b.

Além dos produtos alimentícios, alguma atenção tem sido dada às plantas processadoras de alimentos, as quais podem contribuir para a contaminação do produto final, muitas vezes pela contaminação cruzada (CHARLTON *et al.*, 1990; DESTRO *et al.*, 1996; KLAUSNER e DONNELLY, 1991; PRITCHARD *et al.*, 1995; WALKER *et al.*, 1991).

No Reino Unido, Hudson e Mead (1989) examinaram uma planta de abate de aves, sendo as amostras de aves coletadas em 3 etapas do processamento: logo após o abate (pele do pescoço e penas), durante a evisceração (ceco) e antes da embalagem (pele do pescoço). Com o auxílio de zaragatoas foram coletadas amostras de utensílios e equipamentos: engradados, depenadeira, abridor automático de carcaças, cortador da pele do pescoço, transportador para o *chiller* e transportador para a área de embalagem. Água também foi amostrada, tendo sido coletada dos escaldadores, do dreno da linha de evisceração e do *chiller*. Não foi detectada *L. monocytogenes* na pele do pescoço nem em cecos das aves recém-abatidas. Como encontraram *L. monocytogenes* em 50% das carcaças prontas para embalagem, os pesquisadores concluíram que os equipamentos e outras superfícies de contato, contaminados com o microrganismo, foram os responsáveis pela contaminação.

Após terem encontrado *L. monocytogenes* em amostras de cortes de aves, Genigeorgis *et al.* (1989) estudaram a influência das diferentes etapas de processamento na contaminação das carcaças. *L. monocytogenes* foi isolada de 12,5% das amostras de água do *chiller*, 6,3% das amostras de água de lavagem das moelas e em 18,8% das amostras de carne mecanicamente separada. Os autores verificaram que estas etapas do processamento contribuíram para a contaminação das aves. Neste mesmo estudo, a prevalência de *L. monocytogenes* em mãos e luvas de manipuladores das aves após o pré-resfriamento, o corte das carcaças e o empacotamento dos cortes foi de 20%, 45,5% e 59%, respectivamente.

Varabioff (1990) analisou 32 amostras de água de quatro matadouros de frango, sendo 16 amostras de água quente e 16 de água do *chiller*. Nenhuma das amostras de água quente foi positiva para *L. monocytogenes*, mas a água do *chiller* apresentou 6,2% de positividade.

Loncarevic *et al.* (1994), num estudo da ocorrência de espécies de *Listeria* na Suécia, analisaram 323 amostras de pele de pescoço de frango. As amostras foram coletadas em duas plantas de processamento, sendo 124 amostras da Planta A (62 pré-chiller e 62 pós-chiller) e 199 amostras da Planta B (99 pré-chiller e 100 pós-chiller). Nenhuma amostra coletada na Planta B foi positiva para *L. monocytogenes*. Na Planta A, 58% das amostras pós-chiller foram positivas para *L. monocytogenes*. Apesar do uso de água clorada, com 10 ppm de cloro residual, nas diferentes etapas do processamento anteriores ao pré-resfriamento, foi verificado que as carcaças foram contaminadas nesta etapa.

Lawrence e Gilmour (1994), trabalhando em planta processadora de produtos cozidos de frango, detectaram a presença de *L. monocytogenes* em 26% das amostras ambientais da área de processamento de produtos crus e em 15% das amostras ambientais da área de cozimento. Embora não tenham detectado *L. monocytogenes* no produto cozido, a presença de *Listeria* spp. em 8% dessas amostras evidencia uma possível contaminação pós-processamento.

Ojeniyi *et al.* (1996), na Dinamarca, analisaram 3.080 amostras provenientes de sete matadouros abrangendo: cama de frango, frango antes do abate, durante as diferentes etapas de processamento e produtos de frango, equipamentos e ambiente. *L. monocytogenes* foi isolada de 8% das amostras analisadas, sendo que as amostras com contaminações mais frequentes foram pele do pescoço antes do pré-resfriamento (22,5%) e após o pré-resfriamento (41,9%). Os resultados do estudo indicaram que a principal fonte de contaminação dos frangos e produtos de frango foi, provavelmente, a limpeza e a desinfecção inadequadas da linha de processamento e ambiente dos matadouros, uma vez que a positividade para *L. monocytogenes* nos frangos vivos foi muito baixa.

Miettinen *et al.* (2001), na Finlândia, examinando amostras do ambiente, do produto cru e do produto pronto para o consumo, de dois matadouros de aves, isolaram *L. monocytogenes* de 1 a 19% das amostras colhidas nas etapas de pré-resfriamento por ar refrigerado, na máquina de remoção da pele e na esteira transportadora do frango para a embalagem. Analisaram ainda cortes de frango adquiridos no mercado local, tendo sido isolada *L. monocytogenes* em 62% destas amostras. Foram encontrados três sorotipos (1/2a, 1/2c e 4b) pertencentes a 14 pulsotipos diferentes empregando-se eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* – PFGE), sendo estes diferentes nos dois matadouros.

Preocupados com a contaminação cruzada entre ambiente e produto final, Berrang *et al.* (2005), nos EUA, analisaram 75 amostras coletadas ao longo de 12 meses, em uma planta processadora de frango e produtos cozidos. Nesta planta, as seções eram divididas com paredes e os funcionários não podiam transitar entre as mesmas, além de usarem uniformes de cores diferentes para fácil visualização da troca de função. *L. monocytogenes* foi detectada em ralos na seção de produtos crus, após a higienização pré-operação, e em ralos em ambos os setores, assim como em produtos crus e cozidos, após 8 horas de operação. O microrganismo também foi isolado de produto cru e de produto cozido, mas não houve detecção de *L. monocytogenes* em superfícies de contato com o produto cozido. Três a quatro cepas residentes foram detectadas em produtos crus no mesmo ponto durante o ano de coletas, sugerindo que o produto cru foi a fonte de contaminação de *L. monocytogenes* na planta processadora.

As matérias-primas alimentícias contaminadas, provenientes dos frigoríficos, podem levar microrganismos patogênicos às plantas processadoras de carne de frango, ao varejo e até mesmo ao refrigerador doméstico, tornando-se assim fonte de contaminação cruzada para outros alimentos. Isto foi demonstrado em pesquisa

realizada na Grécia, na qual verificou-se a contaminação por *L. monocytogenes* em refrigeradores comerciais e domésticos (SERGELIDIS *et al.*, 1997).

Por causa da ubiquidade da *L. monocytogenes*, e da alta taxa de mortalidade (20% a 30%) da doença para indivíduos sensíveis (DOUMITH *et al.*, 2005), vários países têm desenvolvido políticas que variam da tolerância zero ao estabelecimento de valores aceitáveis de *L. monocytogenes* para alguns produtos, especialmente aqueles prontos para o consumo (PAGOTTO *et al.*, 2006).

Alimentos como laticínios e produtos cárneos necessitam de análise rápida e de métodos de alta sensibilidade para detecção e identificação de patógenos antes da sua distribuição.

As características genotípicas dos isolados têm sido cada vez mais estudadas e, à medida que estes estudos avançam, mais questionamentos surgem a respeito da confiabilidade dos resultados obtidos por meio da caracterização fenotípica dos isolados. Strom (1998), Doumith *et al.* (2004a), Doumith *et al.* (2004b), Zhang e Knabel (2005), dentre outros, relatam descobertas no genoma da *L. monocytogenes* que têm suscitado novas pesquisas nesta área. Além destas novas metodologias moleculares, novos protocolos têm surgido na tentativa de elucidar os constantes questionamentos dos pesquisadores.

Somer e Kashi (2003) desenvolveram uma Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), baseada na sequência do DNA da subunidade do 16S rRNA, para a detecção de *Listeria* spp. e a identificação de *L. monocytogenes* em alimentos.

A partir do protocolo da PCR desenvolvido por Somer e Kashi (2003), Buenaventura *et al.* (2005) desenvolveram um protocolo acrescentando um par de oligonucleotídeos complementar ao gene da listeriolisina, gene este de alta especificidade para a *L. monocytogenes*. Este protocolo teve o objetivo de diminuir o tempo de

identificação do patógeno, uma vez que a PCR pode ser aplicada a partir de colônias isoladas dos meios de enriquecimento seletivo para *Listeria* spp., e, dependendo dos resultados, não há a necessidade de confirmação por provas bioquímicas. Esta técnica diminui o tempo da análise e, como consequência, o custo das mesmas.

Outra aplicação das técnicas moleculares é na sorotipagem das cepas. Pesquisadores vêm desenvolvendo métodos baseados na PCR para sorotipar a *L. monocytogenes* isolada de casos clínicos e/ou de alimentos (BORUCK e CALL, 2003; DOUMITH *et al.*, 2004a; JINNEMAN e HILL, 2001), pois esta metodologia tem resposta rápida quando comparada à sorologia tradicional. A PCR é vantajosa em relação à sorologia convencional porque esta possui limitações quanto ao custo e disponibilidade dos anti-soros. Já a metodologia molecular tem menor custo e os reagentes são de fácil acesso (DOUMITH *et al.*, 2004a).

Há também um sistema comercial de detecção de patógenos baseado na PCR, BAX[®] System (DuPont Qualicon, EUA), pelo qual se realizam análises de amostras de alimentos e ambientais, com resultados em tempo real; porém, o custo ainda é alto.

Nas últimas décadas, métodos tradicionais de tipagem de cepas (como tipagem por bacteriófagos e sorotipagem) têm sido complementados ou substituídos em muitos laboratórios por métodos moleculares como ribotipagem, métodos baseados em PCR, e análise de padrões de restrição do DNA cromossomal por PFGE. Estas técnicas têm sido amplamente utilizadas em estudos epidemiológicos de doenças de origem alimentar, possibilitando, desta maneira, a comparação em âmbito molecular das cepas isoladas tanto dos indivíduos acometidos quanto dos alimentos por estes ingeridos (TENOVER *et al.*, 1995).

Estas técnicas, que inicialmente eram empregadas apenas na elucidação de surtos, ganharam importância também na avaliação da distribuição da contaminação de patógenos em plantas processadoras de alimentos.

A ribotipagem, outra metodologia molecular para tipagem de bactérias, baseia-se na existência de seqüências altamente conservadas do RNA da unidade menor dos ribossomos (rRNA 16S) das bactérias. A molécula rRNA 16S, encontrada em todas as bactérias, tornou-se padrão universal para identificação e classificação de bactérias (MORETTI, 2006). Apesar de ser uma técnica muito eficiente, apresenta como desvantagem o longo tempo gasto na sua execução. Como alternativa à ribotipagem tradicional tem-se o sistema RiboPrinter® (DuPont Qualicon) que, de maneira automatizada e padronizada, realiza a ribotipagem e permite a comparação dos resultados com o banco de dados do equipamento (AARNISALO *et al.*, 2003). O poder discriminatório da ribotipagem realizada no sistema automatizado, RiboPrinter®, foi satisfatório para traçar as fontes de contaminação em plantas processadoras de carne, aves e pescado na Finlândia, Noruega, Suécia, Ilhas Faroe e Islândia, apontando claramente os locais onde era necessária a melhoria da higienização (SUIHKO *et al.*, 2002).

A PFGE é outra técnica que vem sendo largamente empregada nos países desenvolvidos. Nos EUA 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 está 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 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 à conclusão que a PFGE tem maior poder discriminatório.

Ferramenta versátil, a PFGE tem se mostrado útil na comparação entre cepas à primeira vista distintas, conforme foi demonstrado por Senczek *et al.* (2000). Em uma planta processadora de carne bovina na Suíça, num período de dois anos, estes pesquisadores obtiveram 131 isolados de *Listeria* spp. e, destes, após o emprego da PFGE, utilizando as enzimas de restrição *ApaI* e *SmaI*, obtiveram 15 pulsotipos de *L. monocytogenes*, 20 de *L. innocua* e 6 de *L. welshimeri*, de um total de 89 isolados, 35 e 7, respectivamente. Dentre os isolados de *L. monocytogenes*, o pulsotipo B foi predominante no ambiente da área de processamento, enquanto o pulsotipo E predominou nos produtos cárneos.

Chasseignaux *et al.* (2001), em duas plantas processadoras na França, uma de aves e outra de suínos, isolaram 502 cepas de *L. monocytogenes*. Após restrição do DNA e análise por PFGE, obtiveram 37 genótipos diferentes com a enzima *ApaI* e 35 com *SmaI*. A combinação destes genótipos resultou em 50 pulsotipos diferentes. Com estes dados puderam concluir que a contaminação em ambas as plantas ocorreu por clones capazes de sobreviver no ambiente durante alguns meses. Entretanto, outros clones foram encontrados apenas durante o processamento, mas não após a higienização, indicando contaminação contínua na planta. Os pesquisadores verificaram ainda que diferentes genótipos foram associados a ambas as plantas.

Ainda mostrando a importância da PFGE na caracterização da *L. monocytogenes*, 295 cepas pertencentes à coleção de culturas do Departamento de Alimentos e Higiene Ambiental, da Universidade de Helsinki, Finlândia, foram estudadas por Autio e colaboradores (2002). Cepas isoladas de diversos alimentos de 41 produtores de 10 países foram caracterizadas por PFGE. Após a combinação dos resultados obtidos pela macrorrestrição por *ApaI* e *AscI*, detectou-se 66 pulsotipos diferentes. Dez pulsotipos foram comuns a dois ou mais tipos de produtos e 17 pulsotipos foram detectados em alimentos de mais de um produtor sem relação aparente entre eles. Pulsotipos semelhantes de *L. monocytogenes* foram obtidos em produtos de países diferentes ao longo de vários anos. Alguns pulsotipos foram obtidos várias vezes do mesmo produto e do mesmo produtor, sugerindo a persistência das cepas na planta processadora.

Também na Finlândia, em plantas processadoras de bovinos e de aves, Lunden *et al.* (2003) isolaram 596 cepas de *L. monocytogenes*, que, após análise por PFGE, originaram 47 pulsotipos combinados, sendo 42 com a enzima *AscI* e 38 pulsotipos com a *ApaI*. A combinação dos pulsotipos resultou em 47 perfis diferentes. Com estes resultados concluíram que algumas cepas persistentes apareceram em várias áreas de processamento, enquanto cepas não persistentes foram identificadas com maior frequência em um único local amostrado.

Boruki *et al.* (2004), também utilizando a PFGE em cepas de *L. monocytogenes* isoladas de propriedades rurais e cepas isoladas em casos esporádicos e surtos de doenças em humanos, verificaram que aquelas propriedades eram reservatórios de *L. monocytogenes* causadoras de doença, pois 23% das cepas isoladas das propriedades e de casos/surtos tinham o mesmo perfil genético.

Estudo realizado sobre a diversidade genética de cepas isoladas de cortes de frangos adquiridos na Estônia, originários daquele país ou importados, utilizando PFGE,

mostrou que cepas com o mesmo pulsotipo estavam presentes em produtos da Estônia, ao longo de 12 meses. Onze pulsotipos diferentes foram obtidos de produtos da Estônia, quatro pulsotipos da Dinamarca, dois da Finlândia e quatro da Hungria. Os pesquisadores (PRAAKLE-AMIN *et al.*, 2006) encontraram cepas com o mesmo pulsotipo em produtos da Estônia e produtos importados, porém eles acreditam ter havido contaminação cruzada no local de venda, uma vez que os cortes estavam expostos à venda sem embalagem e poderiam ter sido contaminados pelos manipuladores no momento da venda.

Em estudos realizados por Rodrigues *et al.* (2002), em indústria processadora de ‘nuggets’ de frango em São Paulo, isolou-se *L. monocytogenes* de 92,9% da matéria-prima recebida (peito de frango). Andricheto (2000), estudando as cepas isoladas por Rodrigues *et al.* (2002), concluiu que *L. monocytogenes* de determinado perfil genético presente naquela matéria-prima era resistente às condições de processamento, tendo sido isolada também no produto final. Ele verificou ainda que cepas deste perfil foram capazes de colonizar o ambiente e que a matéria-prima foi a principal fonte de contaminação de ‘nuggets’ de frango.

O avanço no desenvolvimento de técnicas moleculares para a identificação de cepas de *L. monocytogenes* possibilita rastrear a disseminação do patógeno dentro de uma planta processadora de alimentos. Também auxilia na detecção da presença de cepas persistentes colonizando a indústria, formando biofilmes, podendo desta maneira contaminar continuamente os alimentos ali processados (AUTIO *et al.*, 2002; BERRANG *et al.*, 2005; LUNDÉN *et al.*, 2003; MIETTINEN *et al.*, 2001; SENCZEK *et al.*, 2000).

A ocorrência e o comportamento de *L. monocytogenes* em alimentos têm sido bastante estudados, com grande número de trabalhos publicados em diversos países. Estudos em produtos avícolas têm sido realizados, mas estudos na linha de produção de

cortes congelados de frango, abrangendo desde a recepção das aves no matadouro até o produto acabado, incluindo levantamento na carne mecanicamente separada (CMS), matéria-prima de muitos produtos industrializados, não foram encontrados na revisão bibliográfica realizada.

Frente aos resultados obtidos por Andrigheto (2000), no qual a fonte de contaminação dos ‘nuggets’ foi a matéria-prima recebida, aliado à escassez de estudos abrangendo toda a linha de processamento de aves, é que se propôs este estudo.

2. OBJETIVOS

- ✓ Avaliar e comparar a ocorrência de *L. monocytogenes* em diferentes pontos da produção de cortes congelados de frango, em dois matadouros com processos de evisceração diferentes;
- ✓ Avaliar a diversidade genética das cepas de *L. monocytogenes* isoladas;
- ✓ Correlacionar a diversidade das cepas com a distribuição nas indústrias;
- ✓ Avaliar a presença de *L. monocytogenes* em carne mecanicamente separada (CMS).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Foram analisadas 851 amostras provenientes de dois matadouros frigoríficos de aves, exportadores de carne de frango e submetidos ao Serviço de Inspeção Federal (SIF), pertencentes à mesma classificação no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), ou seja, submetidos às mesmas exigências quanto às normas higiênico-sanitárias. A diferença entre os matadouros está na linha de abate: em um a evisceração é automatizada (Planta A) e no outro é manual (Planta M).

Na Planta A, onde a evisceração é automática, este processo é efetuado por intermédio de uma série de máquinas, que executam a remoção da cloaca com obstrução do reto, abertura abdominal, eventração das vísceras abdominais e torácicas e lavagem interna e externa da carcaça. Na Planta M, antes da eventração manual das vísceras abdominais e torácicas, a cloaca é retirada frango a frango por pistola para esta finalidade, manejada por funcionário, e a abertura abdominal manual é executada com auxílio de faca. Após a eventração manual e a inspeção sanitária, a carcaça também é lavada interna e externamente em chuveiro com água sob pressão.

Os matadouros estão localizados na região sudeste do Brasil, distantes, em linha reta, aproximadamente 330 km. A Planta A abate em torno de 130.000 aves/dia e a Planta M, 70.000 aves/dia, distribuídas em dois turnos de abate, tendo o primeiro turno início às 5 horas e o segundo em torno das 13 horas. Em ambas as plantas o terceiro turno de trabalho é destinado à higienização, que é executada por equipe de funcionários das próprias empresas.

Os lotes de frangos destinados ao abate em ambas as plantas variaram entre 13.000 e 25.000 aves, de ambos os sexos, porém os lotes eram sexados para facilitar a

programação da produção. As aves foram criadas no sistema de integração, na qual a indústria forneceu os pintinhos de um dia, os insumos e a assistência técnica ao produtor integrado, e este criou as aves até a idade de abate.

Foram realizadas oito coletas no período de um ano, sendo quatro coletas em cada matadouro. Na Planta A, as coletas foram realizadas nos meses de março, abril, junho e julho de 2004 e, na Planta M, nos meses de outubro e dezembro de 2003 e maio e agosto de 2004. As amostras foram coletadas nas diferentes etapas de produção, desde a chegada dos animais ao matadouro (gaiolas de transporte) até o produto final (cortes congelados de frango e carne mecanicamente separada – CMS). As coletas foram realizadas durante o processo de abate no primeiro turno de trabalho, começando às 7 horas e finalizando em torno das 14 horas. As amostras foram coletadas em seções localizadas na zona suja, desde a recepção dos animais até a seção de escadagem e depenagem, e na zona limpa, desde a seção de evisceração até a área de expedição dos produtos no frigorífico (BRASIL, 1998).

O transporte das amostras entre os matadouros e o laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP foi realizado em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, sendo que o início das análises se deu imediatamente após a chegada ao laboratório, não excedendo 9 horas após a coleta.

Na Figura 1 tem-se a representação esquemática do processo de abate de aves com indicação dos pontos amostrados. Foram examinadas amostras de superfície de contato com o produto (E), de superfícies onde não ocorre contato com o produto (S), produtos (P), mãos dos manipuladores (M) durante o processamento na seção de evisceração, CMS e na sala de cortes; e água (A) utilizada nas diferentes etapas do processo.

3.1.1. Amostragem das superfícies de contato com o produto

Para a coleta das amostras de superfícies foram utilizadas esponjas (Biotrace Int. Bioproducts e Nasco), umedecidas com caldo neutralizante ou com 10 mL de caldo Letheen (Difco, EUA).

Amostras foram coletadas com esponjas utilizando-se um gabarito de 100 cm² nos seguintes pontos: *depenadeira* (E1), *saída do chiller* (E4), *esteira de pendura* (E5), *esteira* na sala de cortes (E7), *esteira transportadora de dorsos* para CMS (E13), superfícies da *máquina de extração de CMS* (E14 e E15) e superfície interna dos *monoblocos brancos* pós higienização (E12, Anexo 1). Foram amostrados cinco pontos em um mesmo equipamento, utilizando a mesma esponja (total 500 cm²), sendo esta acondicionada em bolsa plástica estéril.

As *tábuas* de corte de altileno (E6, Anexo 2) foram amostradas com esponja, utilizando-se um gabarito, em uma única região de 100 cm². As amostras foram analisadas individualmente.

As *facas* (E8, Anexo 3) tiveram toda a superfície da lâmina de corte, de ambos os lados, amostradas com esponja e foram analisadas individualmente.

Também fazendo uso das esponjas, foram coletadas amostras da *máquina de corte* de asas (E10).

As *luvas de aço* (E11) utilizadas na sala de cortes foram amostradas logo após o uso por aproximadamente 4 horas de trabalho. Foram colocadas individualmente em sacos plásticos contendo 100 mL de solução salina estéril (0,85% NaCl, Synth, Brasil) e fricionadas durante 1 minuto, sendo então retiradas.

O *utensílio de coleta* (E16), utilizado para facilitar o manuseio da CMS na saída da máquina, foi amostrado esfregando-se uma esponja em toda superfície de contato com o produto.

Os *ganchos* no qual se faz a pendura das carcaças, tanto na seção de evisceração (E3) quanto na sala de cortes (E9, Anexo 4), foram amostrados com esponjas na superfície onde há o contato com as coxas (evisceração) e com o pescoço das aves (sala de cortes). Cada amostra foi composta por cinco ganchos, utilizando-se uma mesma esponja para a coleta. O mesmo procedimento foi adotado para os “pegadores” da evisceradora automática na Planta A.

3.1.2. Amostragem das superfícies sem contato com o produto

Cinco *gaiolas sujas* (S1) e cinco *limpas* (S2) tiveram as superfícies internas amostradas em cinco pontos utilizando-se uma única esponja, fazendo uso de um gabarito de 100 cm², totalizando 500 cm². As amostras foram acondicionadas individualmente em bolsas plásticas estéreis.

Utilizando-se uma única esponja, foram coletadas cinco subamostras de 100 cm² cada (totalizando 500 cm²), em cada um dos seguintes pontos: do *piso* das seções de depenagem (S3), evisceração (S4), sala de cortes (S7), CMS (S13); da *calha de respingo* na evisceração (S6) e na sala de cortes (S9); das *esteiras na entrada* (S15) e na *saída do túnel* (S16) de congelamento (Planta A), *carrinhos/paletes* (S14) para acondicionamento de produtos em túnel semicontínuo (Planta M); das *canaletas de drenagem* na evisceração (S5, Anexo 5); e na sala de cortes (S8).

Figura 1. Fluxograma do abate e do processamento de cortes congelados de frango e CMS (carne mecanicamente separada), com a identificação dos pontos de coleta de amostras: A = água, P = produto, E = superfície de contato com produto, S = superfície sem contato com produto e M = mãos dos manipuladores.

As *chairas* (S11, Anexo 6), os *afiadores* de facas (S12) (estes presentes apenas na Planta A) e o *raspador de esteira* (S10) tiveram toda sua superfície amostrada com esponja, que foi acondicionada (individualmente, em bolsa plástica estéril) e analisada.

3.1.3. Produtos

Cada amostra deste grupo foi composta por 3 unidades/porções analisadas individualmente.

As *carcaças após a depenadeira* (P1), *antes* (P2) e *após* (P3) o *chuveiro* localizado no final da linha de evisceração e após a *saída do tanque de resfriamento (chiller)* (P4, Anexo 7), os *cortes resfriados de frango* (P5, Anexo 8), os *cortes congelados de frango* (P8) e os *dorsos para CMS* (P6) foram amostrados pelo método de lavagem em saco plástico contendo 200 mL de solução salina estéril (0,85% NaCl) (CAPITA *et al.*, 2004), sendo friccionados em toda a superfície externa durante um minuto. Após este procedimento foram devolvidos para a linha de processamento.

Aproximadamente 250 gramas de CMS (P7) foram coletados em bolsas plásticas de amostragem estéreis. Na Planta A, a CMS é transportada por tubulação flexível diretamente da máquina até o congelador de placas, local onde procedeu-se a coleta das amostras. Entretanto, na Planta M, a CMS é acondicionada em sacos plásticos, o peso é padronizado e a mesma é transportada para o túnel de congelamento, imediatamente após a pesagem, não permanecendo muito tempo na seção. Nesta planta, a coleta foi realizada na saída da máquina de CMS. Em ambas as plantas as seções de CMS são climatizadas a 10 °C, conforme exigências da legislação em vigor (BRASIL, 2000). A higienização dos equipamentos obedece, segundo as empresas, ao estabelecido nos respectivos manuais de boas práticas de fabricação, dentro das prerrogativas da legislação.

3.1.4. Amostras de água

Foram coletados, em garrafas plásticas estéreis contendo tiosulfato de sódio 1%, 300 mL de *água do tanque de lavagem de gaiolas* (A1) transportadoras de aves vivas, do *tanque de escaldagem* (A2) e dos tanques de pré-resfriamento (*pré-chiller*) (A3) e de resfriamento (*chiller*) (A4) por imersão.

3.1.5. Mãos dos manipuladores

A amostragem foi realizada diretamente das *mãos* ou das luvas dos manipuladores (M1 a M3). Os funcionários introduziram as mãos, com ou sem as luvas, em sacos plásticos contendo 100 mL de solução salina estéril (0,85% NaCl) (DESTRO *et al.*, 1996) e as mesmas foram friccionadas por um minuto. Cinco manipuladores, em cada seção, tiveram as mãos amostradas, exceto na seção de CMS da Planta M, onde o número de funcionários no setor era menor do que cinco. As amostras foram analisadas individualmente.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Preparo das amostras

Todos os meios de cultura e antibióticos utilizados foram adquiridos da Oxoid (Inglaterra), exceto quando especificado no texto.

Para as amostras de produtos (cortes resfriados e congelados, carcaças nas diversas etapas do processo), mãos de manipuladores, luvas de aço e água, procedeu-se a centrifugação do volume total da solução salina (200 mL, 100 mL e 200 mL, respectivamente) em 1.000 g por 15 minutos (Centrífuga Sorvall Instruments, RC-5B,

rotor GSA, DuPont, EUA), ressuspensando-se o sedimento em 100 mL de caldo Fraser modificado (Difco) acrescido de 8M Cloreto de Lítio (Sigma, EUA) – mFB+LiCl. Alíquotas de 25 g de CMS foram pesadas, adicionadas a 225 mL de mFB+LiCl e homogeneizadas em homogeneizador de pistão (Seward 400, Inglaterra). As demais amostras, superfície com contato e sem contato com o produto, que foram coletadas com esponjas estéreis, receberam 90 mL de mFB+LiCl nas próprias bolsas estéreis e foram homogeneizadas no mesmo equipamento.

3.2.2. Pesquisa da ocorrência de *Listeria* spp.

Para a triagem das amostras foi empregado o teste imunoenzimático *Visual Immuno Precipitate* (VIP® *Listeria*, BioControl Systems, EUA) para detecção do gênero *Listeria*. Foi seguido o protocolo preconizado pelo fabricante: enriquecimento primário em mFB+LiCl, com incubação a 30 °C por 28 horas. O enriquecimento secundário foi realizado pela transferência de 1 mL de mFB+LiCl para 9 mL de caldo tamponado para enriquecimento de *Listeria* (BLEB) acrescido de MOPS (MOPS ácido livre e MOPS sal sódico - Sigma) com incubação a 30 °C por 24 horas. A seguir, procedeu-se conforme descrito para o teste VIP® *Listeria*.

Uma alíquota de um mL da amostra de BLEB foi transferida para tubo de ensaio e inativada em banho-maria a 100 °C por 5 minutos. Deste caldo inativado, 0,1 mL foi transferido para a cavidade do VIP® *Listeria*, os testes mantidos à temperatura ambiente e a leitura foi realizada 10 minutos depois. O antígeno alvo, se presente, reage com os reagentes específicos para formar um complexo cromogênico antígeno-anticorpo (Figura 2).

Figura 2. Representação dos resultados obtidos no teste VIP[®] *Listeria* (BioControl Systems).

3.2.3. Isolamento da *Listeria* spp.

As amostras com resultado positivo no teste VIP[®] foram repicadas, a partir do caldo BLEB+MOPS, em placas contendo ágar seletivo para *Listeria* – Formulação Oxford acrescida de suplemento seletivo para *Listeria*, e ágar base Palcam acrescido de suplemento seletivo Palcam. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas. Três colônias características de cada placa de Oxford e Palcam foram submetidas à purificação em ágar soja tripticase adicionado de 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE) e incubadas a 37 °C por 24 horas. As placas foram examinadas sob iluminação inclinada transmitida (método de Henry), empregando-se uma lupa (Olympus, Japão) para verificar a presença das colônias características de *Listeria* spp. (azuis esverdeadas e com aspecto de vidro moído).

3.2.4. Identificação fenotípica dos isolados de *Listeria* spp.

3.2.4.1. Identificação bioquímica dos isolados de *Listeria* spp. pelos métodos tradicionais

Para a identificação, uma colônia de cada placa de TSA-YE foi selecionada e transferida com agulha de níquel-cromo para placas contendo ágar púrpura de bromocresol (Difco) adicionado dos carboidratos (1%), xilose (INLAB, Brasil), dextrose (Synth), manitol (Difco) e ramnose (INLAB); ágar sangue de cavalo (7%) e uma placa de TSA-YE. Simultaneamente, inoculou-se em tubos de ensaio contendo ágar motilidade (Difco). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e o teste motilidade a 25 °C por até 7 dias (PAGOTTO *et al.*, 2005). Para a identificação empregou-se as características listadas por Pagotto *et al.* (2006) (Tabela 1).

Tabela 1 – Características bioquímicas das espécies do gênero *Listeria* (modificado de PAGOTTO *et al.*, 2006).

Espécie	Carboidratos				β-hemólise
	Dextrose	Xilose	Ramnose	Manitol	
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	-	+
<i>L. innocua</i>	+	-	d ^a	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	+	-	-	+
<i>L. ivanovii</i>	+	+	-	-	+
<i>L. welshimeri</i>	+	+	d	-	-
<i>L. grayi</i>	+	-	-	+	-
<i>L. murrayi</i>	+	-	d	+	-

^a Símbolo padrão: +, ≥ 90% positivo; -, ≥90% negativo; d, 11-89% das cepas são positivas.

^b Nem todas as cepas de *L. monocytogenes* exibem β-hemólise – a cepa ATCC 15313 não é hemolítica em sangue de cavalo, carneiro e bovino.

^c Um halo fraco ou múltiplos halos de hemólise usualmente são exibidos pelas cepas de *L. ivanovii*.

Quando necessário, as cepas foram testadas empregando-se o API[®] *Listeria* (BioMérieux[®], França).

As cepas isoladas e identificadas de *L. monocytogenes* foram estocadas após multiplicação em caldo soja tripticase (TSB), a 37 °C por 24 horas, e acondicionadas em criotubo acrescidas de glicerol estéril (20%) a -70 °C, para posterior caracterização fenotípica adicional e genotípica.

3.2.4.2. Avaliação dos isolados empregando-se o meio cromogênico RAPID'L.MonoTM (BioRad, EUA)

Os isolados previamente identificados como *L. monocytogenes* foram semeados em meio cromogênico RAPID'L.MonoTM. A diferenciação das espécies neste ágar baseia-se na detecção da atividade da fosfolipase C e na capacidade de metabolizar xilose. A colônia de *L. monocytogenes* apresenta-se com coloração azul sem formação de halo.

3.2.4.3. Perfil de resistência a antimicrobianos

3.2.4.3.1. Análise do perfil de resistência a antimicrobianos de difusão com discos

A análise de difusão com discos foi realizada segundo Kirby-Bauer (BAUER *et al.*, 1966) e baseada no protocolo CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*) (*National Committee for Clinical Laboratory Standards* NCCLS – UNITED STATES, 2003).

Uma colônia isolada de cada cepa foi inoculada em 5 mL do caldo ISO-sensitest e incubada a 37 °C por 16 a 18 horas. Após este período, alíquotas do caldo foram adicionadas a 5 mL do mesmo meio até obter padrão de turbidimetria de 0,5 pela escala McFarland. Este

novo meio foi espalhado com zaragatoa estéril, em duplicatas, em placas contendo ágar Mueller-Hinton. Após secagem do inóculo, discos (Oxoid) dos 15 antimicrobianos relacionados a seguir foram colocados sobre o ágar com o auxílio do dispensador de discos. Antibióticos avaliados: ampicilina (10 µg), vancomicina (30 µg), kanamicina (30 µg), gentamicina (10 µg), estreptomicina (10 µg), tobramicina (10 µg), eritromicina (15 µg), tetraciclina (30 µg), minociclina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), clindamicina (2 µg), rifampicina (5 µg), trimetoprina (5 µg) e componentes sulfonamida (300 µg).

Como controles positivos e negativos utilizou-se cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 e *Escherichia coli* ATCC® 25922 (Tabela 2) conforme recomendação da CLSI (UNITED STATES, 2003).

O diâmetro das zonas de inibição foi medido em mm, com auxílio de régua, sendo considerados sensíveis apenas os diâmetros superiores a 7 mm, pois este é o diâmetro dos discos de antibióticos.

Tabela 2 – Perfil de resistência a antimicrobianos, por difusão em discos, das três cepas utilizadas como controles positivo e/ou negativo.

Agente antimicrobiano	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>P. aeruginosas</i> (ATCC 27853)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)
β-Lactâmicos – Penicilinas			
Ampicilina (10 µg)	S ^a	R ^b	S
Glicopeptídeos			
Vancomicina (30 µg)	S	R	R
Aminoglicosídeos			
Kanamicina (30 µg)	S	R	S
Gentamicina (10 µg)	S	S	S
Estreptomicina (10 µg)	S	I ^c	S
Tobramicina (10 µg)	S	S	S
Macrolídeos			
Eritromicina (15 µg)	S	R	R
Tetraciclinas			
Tetraciclina (30 µg)	S	R	S
Minociclina (30 µg)	S	R	S
Quinolonas			
Ciprofloxacina (5 µg)	S	S	S
Outros			
Cloranfenicol (30 µg)	S	R	S
Clindamicina (2 µg)	S	R	R
Rifampicina (5 µg)	S	R	R
Trimetoprina (5 µg)	S	R	S
Componentes sulfonamida (300 µg)	S	I	S

^a Sensível

^b Resistente

^c Resistência intermediária

3.2.4.3.2. Sensibilidade dos isolados de *L. monocytogenes* a antimicrobianos por *spiral gradient endpoint* – SGE (PATON *et al.*, 1990)

Figura 3. Deposição do antimicrobiano pelo *Spiral plater* (Fischer Scientific, EUA), começando 13 mm do centro da placa. Deposição de corante para visualização da deposição em espiral e da diferença de concentração do agente antimicrobiano na placa.

Sessenta e três cepas de *L. monocytogenes* que apresentaram sensibilidade intermediária aos antibióticos no teste de difusão com discos foram submetidas ao SGE. Os resultados foram avaliados conforme o CLSI (UNITED STATES, 2003).

Considera-se cepa com sensibilidade intermediária as que se situam numa ‘zona tampão’ da sensibilidade do microrganismo a um determinado antibiótico, cuja resposta ao tratamento clínico pode ser favorável ou não.

Soluções de antibióticos foram espalhadas em placas contendo ágar Mueller-Hinton, por intermédio do *Spiral plater* (Fischer Scientific, EUA) (Figura 3), e deixadas secar abertas em fluxo laminar contínuo.

Uma colônia de cada cepa a ser analisada, isolada de placas de TA, foi inoculada em 50 mL de caldo Mueller-Hinton e incubada a 37 °C por 16 a 18 horas. Alíquotas desta suspensão foram transferidas para tubos contendo 5 mL de caldo Mueller-Hinton, até atingir a turbidez padrão de 0,5 na escala McFarland. Com o auxílio de zaragatoa estéril de algodão umedecido na suspensão fez-se o espalhamento em riscos da periferia para o centro da placa previamente preparada, conforme Figura 4, respeitando o diâmetro de 13 mm no centro, sem a deposição do inóculo. As placas foram inoculadas a 37 °C por 24 horas e os testes foram realizados em duplicatas, em lados opostos da placa. Na Figura 5 tem-se uma placa após incubação.

Figura 4. Representação esquemática da distribuição das suspensões de bactéria na placa para realização do *spiral gradient endpoint* (SGE).

Figura 5. Placa de ágar Mueller-Hinton inoculada com suspensões de *L. monocytogenes* em duplicatas para realização do *spiral gradient endpoint* (SGE), após 24 horas de crescimento a 37 °C.

3.2.5. Identificação genotípica dos isolados de *L. monocytogenes*

3.2.5.1. Identificação por PCR-tempo real dos isolados de *L. monocytogenes*

Todas as cepas selecionadas como *L. monocytogenes* foram submetidas à identificação molecular por meio do BAX[®] System (DuPont Qualicom), para confirmação dos resultados. O procedimento adotado foi o preconizado pelo fabricante, descrito a seguir. A partir de tubos de TSB inoculados com as cepas e incubados a 37 °C, *overnight*, retirou-se uma alíquota de 5 µL e transferiu-se para microtubos, onde foi combinado com 200 µL de solução de protease em tampão fosfato, presente no *kit*, aquecendo-se a mistura a 55 °C por 60 minutos. Após este período, as amostras foram aquecidas a 95 °C por 10 minutos, transferindo-se, então, os tubos para um bloco de resfriamento, com temperatura de 2 a 8 °C, onde permaneceram por 5 minutos. Após o resfriamento, 50 µL foram transferidos para os tubos de PCR que acompanham o *kit*.

Nesses tubos, na forma peletizada, encontram-se os oligonucleotídeos, os dNTPs, a *Taq*, o corante fluorescente, o controle interno e demais reagentes necessários para a PCR.

Os tubos foram transferidos para o termociclador/detector, onde o programa pré-estabelecido no equipamento foi executado. Ao final do ciclo de amplificação e detecção, o equipamento automaticamente exibe os resultados, no monitor do microcomputador, como positivo ou negativo.

3.2.5.2. Identificação da *L. monocytogenes* por multiplex-PCR baseado na sequência do 16S rRNA e do gene da listeriolisina (*hlyA*) (BUENAVENTURA *et al.*, 2005)

Após incubação das cepas por 48 horas a 30 °C em TA, uma colônia isolada de cada cepa foi ressuspensa em 100 µL de água ultrapura estéril, submetida à temperatura de 95 °C por 5 min, resfriada em banho de gelo por 10 minutos e estocada a -20 °C até a amplificação por PCR. Esta etapa foi realizada para a lise das células e liberação do DNA.

As reações foram realizadas em 25 µL, sendo que para cada reação utilizou-se 2 U *Taq* DNA polimerase; 2 µL do lisado de células; 0,25 mM dNTPs; 3,5 mM MgCl₂; 1,0X tampão da *Taq*, 4 pares de oligonucleotídeos (Sigma) nas concentrações de 100 mM, LIS-F, LIS-R, MONO5-F, MONO7-F, MG-F, IVA-F, HLYA-A e HLYA-B (Tabelas 3 e 4). O controle negativo foi realizado substituindo-se o lisado de células por 2 µL de água ultrapura estéril.

Tabela 3 – Sequência de nucleotídeos dos oligonucleotídeos utilizados na identificação de *L. monocytogenes* pela sequência do 16S rRNA e gene da listeriolisina (*hlyA*) com multiplex-PCR (BUENAVENTURA *et al.*, 2005).

Oligonucleotídeos por nome	Sequência dos oligonucleotídeos (5' – 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Alíquota por reação (μM)
LIS-F	AGC TTG CTC TTC CCA AGT	400	0.3
LIS-R	AAG CAG TTA CTC TTA TCC T	400	0.3
MONO5-F	GCT AAT ACC GAA TGA TAA GA	287	1.2
MONO7-F	GGC TAA TAC CGA ATG ATG AA	287	1.2
MG-F	GCT TGC TCC TTT GGT CG	400	0.2
IVA-F	AGC TTG CTC TTC CAA TGT	400	0.2
HLYA-A	CAT TAG TGG AAA GAT GGA ATG	730	0.3
HLYA-B	GTA TCC TCC AGA GTG ATC GA	730	0.3

A amplificação foi conduzida em termociclador MasterCycle® PCR (Eppendorf Scientific, Alemanha) sob o programa: 5 min a 95 °C para desnaturação inicial, seguida de 40 ciclos a 95 °C por 0,45 min, 58 °C por 0,45 min e 72 °C por 0,45 min, e um ciclo final a 72 °C por 7 min. Um microlitro do produto da amplificação foi adicionado a um μL de *loading buffer* (BioRad), que foram separados em gel de agarose LE (Roche, Alemanha) a 1,0% em TBE 1,0X (Tris-Boreto-EDTA - Sigma), adicionado de 0,2 μL de brometo de etídio (BioRad). A eletroforese foi realizada em cuba horizontal Mini Gel Electrophoresis System Gel XL Plus (Labnet International Inc., EUA), a 100 Volts por 30 min, contendo TBE 0,5X (Sigma) adicionado do corante brometo de etídio. A imagem, sob luz ultravioleta, foi registrada com o sistema BioRad Gel Doc 1000, e a fotografia impressa no equipamento Mitsubishi P91W (Japão).

Tabela 4 – Interpretação dos resultados do multiplex-PCR 16S rRNA e gene da listeriolisina, de acordo com o tamanho do fragmento obtido na técnica (BUENAVENTURA *et al.*, 2005).

Tamanho do fragmento			Interpretação*	Ações subsequentes
730 pb	400 pb	287 pb		
-	-	-	Não <i>L. monocytogenes</i> , não <i>Listeria</i> spp.	Final da análise
-	+	-	Não <i>L. monocytogenes</i> , <i>Listeria</i> spp.	Final da análise
+	+	+	<i>Listeria monocytogenes</i>	Confirmar bioquimicamente

* Para resultados não consistentes com a tabela, deve-se repetir o multiplex-PCR e fazer testes bioquímicos.

3.2.5.3. Identificação dos sorotipos de *L. monocytogenes*

3.2.5.3.1. Sorotipagem molecular

As duzentas e dez cepas de *L. monocytogenes* isoladas foram repicadas em placas contendo ágar TA e incubadas a 30 °C por 48 horas.

A tipagem molecular das cepas foi realizada utilizando o método multiplex-PCR como descrito previamente por Doumith *et al.* (2004a). A sequência dos oligonucleotídeos está apresentada na Tabela 5.

O preparo do DNA foi feito por meio da lise das células de *L. monocytogenes*. Para isto, 3 a 5 colônias foram adicionadas a 50 µL de uma solução de 0,25% Dodecil Sulfato de Sódio (SDS – Sigma) – 0,05 N NaOH e incubadas a 99 °C por 15 minutos em bloco aquecedor (VWR Scientific Products, EUA). Após este período adicionou-se 100 µL de água ultrapura estéril. Esta solução foi estocada a -20 °C até o momento do uso.

As reações foram realizadas em 100 µL, sendo que para cada reação utilizou-se 2 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen); 2 µL do lisado de células; 0,2 mM dNTPs (Roche, Alemanha); 2 mM de MgCl₂ (Invitrogen); tampão da *Taq* 1X (Invitrogen), e os

5 pares de oligonucleotídeos (Sigma) nas concentrações: 1 μ M de *lmo0737*, de ORF2819 e de ORF2110; 1,5 μ M de *lmo1118* e 0,2 μ M de *prs* (Tabela 5). O controle negativo foi realizado substituindo-se o lisado de células por 2 μ L de água ultrapura estéril. A amplificação foi conduzida em termociclador MasterCycle[®] PCR (Eppendorf Scientific, Alemanha) sob o programa: 3 min a 94 °C para desnaturação inicial, seguida 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. Dois microlitros do produto da amplificação foram adicionados a 1 μ L de *loading buffer* (BioRad), que foram separados em gel de agarose LE (Roche) a 1,0% em TBE 1,0X (Tris-Boreto-EDTA - Sigma), adicionado de 0,2 μ L de brometo de etídio (BioRad). A eletroforese foi realizada e a imagem registrada conforme item 4.2.5.2.

Tabela 5 – Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na sorotipagem molecular de *L. monocytogenes* (DOUMITH *et al.*, 2004a).

Gene alvo	Sequência dos oligonucleotídeos (5'–3')	Tamanho do fragmento (pb)	Especificidade para <i>L. monocytogenes</i> (sorotipo)
<i>lmo0737</i>	For*: AGGGCTTCAAGGACTTACCC Rev: ACGATTTCTGCTTGCCATTC	691	<i>L. monocytogenes</i> sorotipo 1/2a, 1/2c, 3a e 3c
<i>lmo1118</i>	For: AGGGGTCTTAAATCCTGGAA Rev: CGGCTTGTTTCGGCATACTTA	906	<i>L. monocytogenes</i> sorotipo 1/2c e 3c
ORF2819	For: AGCAAAATGCCAAACTCGT Rev: CATCACTAAAGCCTCCCATTG	471	<i>L. monocytogenes</i> sorotipo 1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e
ORF2110	For: AGTCCATCCCTTACTTTGGAC Rev: CATCCATCCCTTACTTTGGAC	597	<i>L. monocytogenes</i> sorotipo 4b, 4d e 4e
<i>prs</i>	For: GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG Rev: CAAAGAAACCTTGATTGCGG	370	Todas as espécies de <i>Listeria</i>

* For: direto; Rev: inverso

Figura 6. 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. Genes correspondentes ao fragmento amplificado estão indicados do lado direito. Tamanhos das bandas do peso molecular estão indicados do lado esquerdo (DOUMITH *et al.*, 2004a).

Os perfis dos produtos da amplificação após eletroforese foram comparados aos padrões apresentados na Figura 6, que contém os perfis característicos de cada sorotipo. Conforme Doumith *et al.* (2004a), considerou-se sorotipo 1/2a e 3a (grupo 1) aquele perfil em qual houve amplificação de 2 fragmentos, um de 691 pb (*lmo0737*) e outro de 370 pb (*prs*); 1/2c e 3c (grupo 2) com 3 fragmentos, um de 906 pb (*lmo1118*), um de 691 pb (*lmo0737*) e o terceiro de 370 pb (*prs*); 1/2b e 3b (grupo 3) com fragmentos de 471 pb (ORF2819) e 370 pb (*prs*); 4b, 4d e 4e (grupo 4), também com 3 fragmentos de 597 pb (ORF2110), 471 pb (ORF2819) e de 370 pb (*prs*); 4a e 4c produzem somente um tipo de fragmento, o correspondente ao *prs*. As espécies *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri* apresentam apenas um fragmento de 370 pb (DOUMITH *et al.*, 2004a).

3.2.5.3.2. Sorotipagem convencional

Para a confirmação dos resultados obtidos na sorotipagem molecular, e para esclarecimentos de dúvidas geradas nos perfis moleculares obtidos, foi realizada a sorologia convencional empregando-se anti-soro Denka Seiken (Tokyo, Japan), procedendo-se de acordo com orientação do fabricante.

Para esta avaliação empregou-se em um subgrupo dos isolados, composto por 53 cepas escolhidas aleatoriamente dentre as *L. monocytogenes*.

3.2.5.4. Caracterização molecular da *L. monocytogenes* por ribotipagem

Esta caracterização foi realizada empregando-se o RiboPrinter[®] (DuPont Qualicon), segundo as recomendações do fabricante, descritas a seguir.

Após crescimento das cepas em TA, incubadas a 30 °C por 24 horas, foi feita uma suspensão de bactérias em microtubo contendo tampão da amostra presente no *kit*, que foi homogeneizada em agitador em vórtice. Alíquotas de 30 µL desta suspensão foram transferidas para o contêiner apropriado, que foi inserido no bloco aquecedor a 80 °C por 25 minutos, depois resfriado por 10 minutos. Esta etapa visa a morte das células e a inativação das nucleases e proteases, preparando para a lise química. Às amostras foram acrescentadas alíquotas dos reagentes de lise A e B, presentes no *kit*.

As amostras foram colocadas no RiboPrinter[®], onde o programa pré-estabelecido no equipamento foi executado. Ao final da execução do programa, a eletroforese foi executada em gel, este foi corado e a imagem registrada no computador acoplado ao equipamento.

3.2.5.5. Caracterização molecular da *L. monocytogenes* por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

A caracterização molecular das 210 cepas de *L. monocytogenes* foi realizada usando a PFGE, com as enzimas de restrição AscI e ApaI (ambas Roche), seguindo o protocolo desenvolvido e padronizado por Graves e Swaminathan (2001) e descrito a seguir.

As cepas foram inoculadas em placas contendo TA e incubadas a 37 °C por 24 horas. Alíquotas de colônias foram ressuspensas em 2 mL de tampão TE [10 mM Tris-HCl: 1 mM EDTA (Roche)] que foram utilizadas para determinar a absorvância a 610 nm (MicroScan Turbidity Meter, Dade Behring Inc., EUA), sendo a densidade óptica corrigida para a faixa entre 1,3 a 1,4. Foram então transferidos 240 µL desta suspensão para microtubos contendo 60 µL de lisozima (Roche), sendo o tubo incubado em banho-maria a 37 °C por 10 min.

Ao tubo com as células tratadas foram adicionados 300 µL da solução SDS [(1,2% SeaKenGold Agarose (Cambex Bio Science Rockland Inc., EUA), 1% SDS, 0,2 mg/mL proteinase K (Roche)]. Após a homogeneização, volumes adequados foram distribuídos nos moldes acrílicos (BioRad) para formação dos blocos.

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 constante (160 rpm), os blocos foram estocados em tampão TE em refrigerador até a restrição enzimática.

Porções de cerca de 1/6 dos blocos foram retiradas com lâminas e submetidas à digestão com as enzimas de macrorrestrição, ApaI ou AscI, em seus respectivos tampões, sendo incubadas a 30 °C, por 5 horas, e a 37 °C, por 4 horas, respectivamente.

Os produtos da macrorrestrição foram separados por eletroforese em gel de agarose (Agarose SeaKem Gold 1% em tampão TBE 0,5X), empregando-se o equipamento Chef Master™ (BioRad) com os parâmetros: 200 Volts, tempo de 20 horas e pulsos de 4 a 40 segundos interpolados. O gel foi corado em solução de brometo de etídio (1 µL/mL), a imagem foi registrada sob luz ultravioleta, empregando-se o sistema BioRad Gel Doc 1000, e a fotografia impressa no equipamento Mitsubishi P91W. Os dendrogramas foram construídos utilizando-se o programa BioNumerics (BioRad).

Salmonella sorovar Braenderup, cepa H9812, foi utilizada como referência para padrão de peso molecular (HUNTER *et al.*, 2005). Os blocos contendo o DNA deste microrganismo foram preparados da mesma maneira que os blocos contendo DNA de *L. monocytogenes*, sendo a macrorrestrição realizada com a enzima XbaI, 37 °C por 2 horas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ocorrência de *Listeria* spp. em dois matadouros frigoríficos de aves

Nos dois matadouros deste estudo, 851 amostras foram coletadas sendo 423 provenientes da Planta A e 428 amostras da Planta M. Das 851 amostras, o total de 2.728 cepas foi isolado e submetido aos testes bioquímicos.

Na Figura 7 tem-se fluxograma do processo de abate de aves com a indicação dos pontos amostrados e de onde foi possível isolar *L. monocytogenes*.

Pelos resultados das provas bioquímicas obteve-se na Planta A (evisceração automática) 85 (20,1%) amostras positivas para *L. monocytogenes* dentre as 423 analisadas nesta planta, 205 (48,5%) positivas para *L. innocua* e 14 (3,3%) para *L. welshimeri*. Enquanto, na Planta M, na qual a evisceração é manual, 70 (16,4%) amostras das 428 coletadas foram positivas para *L. monocytogenes*, 250 (58,4%) positivas para *L. innocua* e 4 (0,9%) para *L. welshimeri* (Tabela 6).

Os resultados obtidos neste estudo podem ter sido influenciados pelo horário de realização da coleta de amostras (primeiro turno). Whyte *et al.* (2004) verificaram grande interferência no horário de amostragem na frequência de amostras positivas para *L. monocytogenes* em frangos. Segundo os autores, amostras coletadas no segundo turno apresentaram frequência de contaminação 1,38 vezes mais elevada que as do primeiro turno.

Figura 7. Fluxograma do abate e do processamento de cortes congelados de frango e CMS (carne mecanicamente separada), com a identificação dos pontos de coleta: A = água, P = produto, E = superfície de contato com produto, S = superfície sem contato com produto e M = mãos do manipulador. Os pontos e seções marcados em azul representam locais onde houve o isolamento da *L. monocytogenes*.

Tabela 6 – Ocorrência de *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. welshimeri* em dois matadouros de aves, um com evisceração automática (Planta A) e outro com evisceração manual (Planta M).

Espécie	Planta A (423 amostras)		Planta M (428 amostras)	
	Amostras positivas	%	Amostras positivas	%
<i>L. monocytogenes</i>	85	20,1	70	16,4
<i>L. innocua</i>	205	48,5	250	58,4
<i>L. welshimeri</i>	14	3,3	4	0,9

Observa-se que a proporção de amostras positivas para *L. monocytogenes* e *L. welshimeri* foi ligeiramente maior na Planta A (20,1% e 3,3%, contra 16,4% e 0,9% na Planta M, respectivamente), enquanto que a maior proporção de amostras positivas para *L. innocua* foi encontrada na Planta M, 58,4% (Tabela 6 e Figura 8).

Figura 8. Distribuição das diferentes espécies de *Listeria* em dois matadouros de aves, um com evisceração automática (Planta A) e outro com evisceração manual (Planta M).

4.1.1. Ocorrência de *L. monocytogenes* na Planta A

Na Figura 9 tem-se a distribuição das amostras positivas para as três espécies do gênero *Listeria* detectadas na Planta A.

Figura 9. Distribuição das amostras positivas para *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. welshimeri* nos cinco grupos de amostras coletadas no matadouro com evisceração automática (Planta A).

Na Planta A, das amostras de produtos analisadas – ou seja, carcaça após depenagem (P1), carcaça antes (P2) e após (P3) o chuveiro no final da seção de evisceração, carcaça resfriada (P4) coletada após o *chiller*, dorso para CMS (P6), CMS (P7), cortes resfriados (P5) e cortes congelados (P8)–, 13 (14,4%) amostras (de 90 coletadas) foram positivas para *L. monocytogenes*, 47 (52,2%) para *L. innocua* e 2 (2,2%) para *L. welshimeri*, conforme exposto na Tabela 7.

Tabela 7 – Ocorrência de *L. monocytogenes* (Lm), *L. innocua* (Li) e *L. welshimeri* (Lw) nos produtos coletados em matadouro de aves com evisceração automática (Planta A).

Amostras (número)	Lm (%)	Li (%)	Lw (%)
P1-Carcaça após a depenagem (12)	0	0	0
P2-Carcaça antes do chuveiro (12)	2 (16,7)	4 (33,3)	0
P3-Carcaça após o chuveiro (12)	0	0	0
P4-Carcaça resfriada (12)	2 (16,7)	5 (41,7)	0
P6-Dorso para CMS (12)	1 (8,3)	12 (100,0)	2 (16,7)
P7-CMS (12)	3 (25,0)	11 (91,7)	0
P5-Cortes resfriados (12)	2 (16,7)	10 (83,3)	0
P8-Cortes congelados (6)	3 (50,0)	5 (83,3)	0
Total (90) (%)	13 (14,4)	47 (52,2)	2 (2,2)

Nas superfícies que têm contato com produto (depenadeira (E1), evisceradora (E2), esteira transportadora de carcaças após o *chiller* (E5), ganchos da nória da evisceração (E3) e da sala de cortes (E9), saída do *chiller* (E4), tábuas de cortes (E6), esteira na sala de cortes (E7), facas (E8), máquina de cortes (E10), esteira de transporte de dorsos para a CMS (E13), entrada (E14) e saída (E15) da máquina de CMS, utensílio de coleta de CMS (E16), luvas de aço (E11) e monoblocos brancos (E12)), na Planta A, a positividade de amostras para *L. monocytogenes* foi de 31 (19,6%) amostras das 158 analisadas, *L. innocua* em 83 (52,5%) amostras e *L. welshimeri* em 2 (1,3%) amostras (Tabela 8).

Tabela 8 – Ocorrência de *L. monocytogenes* (Lm), *L. innocua* (Li) e *L. welshimeri* (Lw) nas amostras de superfícies de contato com o produto coletadas em matadouro de aves com evisceração automática (Planta A).

Amostras (número)	Lm (%)	Li (%)	Lw (%)
E1-Depenadeira (0)	-	-	-
E2-Evisceradora (3)	0	1 (33,3)	0
E5-Esteira após <i>chiller</i> (4)	1 (25,0)	1 (25,0)	1 (25,0)
E3-Ganchos evisceração (20)	2 (10,0)	2 (10,0)	0
E4-Saída <i>chiller</i> (4)	1 (25,0)	1 (25,0)	0
E6-Tábua (20)	4 (20,0)	14 (70,0)	0
E7-Esteira sala de cortes (8)	1 (12,5)	7 (87,5)	0
E8-Facas (20)	5 (25,0)	11 (55,0)	0
E9-Ganchos sala cortes (20)	5 (25,0)	9 (45,0)	0
E10-Máquina cortes (4)	1 (25,0)	2 (50,0)	0
E13-Esteira transp. dorso (4)	0	4 (100,0)	0
E14-Entrada dorso máq. CMS (4)	1 (25,0)	3 (75,0)	0
E15-Saída CMS (4)	1 (25,0)	3 (75,0)	0
E16-Utensílio coleta CMS (3)	0	1 (33,3)	0
E11-Luvas de aço (20)	5 (25,0)	20 (100,0)	1 (5,0)
E12-Monoblocos brancos (20)	3 (15,0)	3 (15,0)	0
Total (158) (%)	31 (19,6)	83 (52,5)	2 (1,3)

Nas superfícies da Planta A onde não ocorre o contato com o produto (gaiolas transportadoras de frangos vivos, sujas (S1) e limpas (S2); calha da evisceração (S6); pisos das seções de depenagem (S3); CMS (S13); evisceração (S4) e sala de cortes (S7); canaleta de drenagem (S5); esteira de entrada (S15) e saída (S16) do túnel contínuo de congelamento; chairas (S11); afiadores de facas (S12); calha de respingo da sala de cortes (S9) e raspador de esteira (S10)), a positividade de amostras com *L. monocytogenes*

foi de 27 (27,3%) amostras em 99 analisadas, *L. innocua* esteve presente em 47 (47,5%) amostras e *L. welshimeri* em 4 (4,0%) (Tabela 9).

Tabela 9 – Ocorrência de *L. monocytogenes* (Lm), *L. innocua* (Li) e *L. welshimeri* (Lw) nas amostras de superfícies sem contato com o produto coletadas em matadouro de aves com evisceração automática (Planta A).

Amostras (número)	Lm (%)	Li (%)	Lw (%)
S1-Gaiola suja (20)	0	2 (10,0)	0
S2-Gaiola após lavagem (20)	0	2 (10,0)	0
S3-Piso depenagem (4)	1 (25,0)	3 (75,0)	0
S4-Piso evisceração (4)	3 (75,0)	4 (100,0)	0
S5-Canaleta drenagem evisceração (3)	0	1 (33,3)	0
S6-Calha evisceração (4)	2 (50,0)	3 (75,0)	1 (25,0)
S7-Piso sala cortes (4)	2 (50,0)	3 (75,0)	1 (25,0)
S8-Canaleta drenagem sala cortes (4)	3 (75,0)	3 (75,0)	1 (25,0)
S9-Calha respingo (1)	0	0	0
S10-Raspador esteira (3)	0	3 (100,0)	0
S11-Chairra (1)	1 (100,0)	1 (100,0)	0
S12-Afiador facas (20)	8 (40,0)	11 (55,0)	1 (5,0)
S13-Piso CMS (4)	3 (75,0)	4 (100,0)	0
S14-Carrinho/paleta (0) *	-	-	-
S15-Esteira de entrada do túnel (3)	3 (100,0)	3 (100,0)	0
S16-Esteira de saída do túnel (4)	1 (25,0)	4 (100,0)	0
Total (99) (%)	27 (27,3)	47 (47,5)	4 (4,0)

* Amostra inexistente neste matadouro.

Das 60 amostras de mãos dos manipuladores da seção de evisceração (M1), da sala de cortes (M2) e da seção de CMS (M3) da Planta A, 13 (21,7%) amostras foram

positivas para *L. monocytogenes*, 24 (40,0%) positivas para *L. innocua* e 6 (10,0%) positivas para *L. welshimeri* (Tabela 10).

Tabela 10 – Ocorrência de *L. monocytogenes* (Lm), *L. innocua* (Li) e *L. welshimeri* (Lw) nas amostras de mãos dos manipuladores coletadas em matadouro de aves com evisceração automática (Planta A).

Amostras (número)	Lm (%)	Li (%)	Lw (%)
M1-Evisceração (20)	2 (10,0)	2 (10,0)	0
M2-Sala cortes (20)	8 (40,0)	12 (60,0)	5 (25,0)
M3-CMS (20)	3 (15,0)	10 (50,0)	1 (5,0)
Total (60) (%)	13 (21,7)	24 (40,0)	6 (10,0)

Ainda na Planta A, nas 16 amostras de água coletadas do lavador de gaiolas (A1), escaldagem (A2), pré-chiller (A3) e chiller (A4), foi detectada a presença de *L. monocytogenes* em 1 (6,3%) amostra do pré-chiller. *L. innocua* foi detectada em 3 (18,8%) amostras (Tabela 11). Outras espécies não foram detectadas.

Tabela 11 – Ocorrência de *L. monocytogenes* (Lm), *L. innocua* (Li) e *L. welshimeri* (Lw) nas amostras de água coletadas em matadouro de aves com evisceração automática (Planta A).

Amostras	Lm (%)	Li (%)	Lw (%)
A1-Lavador gaiolas (4)	0	1 (25,0)	0
A2-Escaldagem (4)	0	0	0
A3-Pré-chiller (4)	1 (25,0)	0	0
A4-Chiller (4)	0	2 (50,0)	0
Total (16) (%)	1 (6,3)	3 (18,8)	0 (0)

4.1.2. Ocorrência de *L. monocytogenes* na Planta M

As amostras positivas para *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. welshimeri* na Planta M estão apresentadas na Figura 10.

Figura 10. Distribuição das amostras positivas para *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. welshimeri* nos cinco grupos de amostras coletadas em matadouro de aves com evisceração manual (Planta M).

Na Planta M, dentre as 93 amostras coletadas de produtos, isolou-se *L. monocytogenes* em 18 (19,4%) amostras e *L. innocua* em 72 (77,4%) amostras, não tendo sido isolada outras espécies de *Listeria* (Tabela 12).

Tabela 12 – Ocorrência de *L. monocytogenes* (Lm), *L. innocua* (Li) e *L. welshimeri* (Lw) nos produtos coletados em matadouro de aves com evisceração manual (Planta M).

Amostras (número)	Lm (%)	Li (%)	Lw (%)
P1-Carcaça após a depenagem (9)	0	0	0
P2-Carcaça antes do chuveiro (12)	1 (8,3)	9 (75,0)	0
P3-Carcaça após o chuveiro (12)	2 (16,7)	5 (41,7)	0
P4-Carcaça resfriada (12)	1 (8,3)	10 (83,3)	0
P6-Dorso para CMS (12)	3 (25,0)	12 (100,0)	0
P7-CMS (12)	5 (41,7)	12 (100,0)	0
P5-Cortes resfriados (12)	4 (33,3)	12 (100,0)	0
P8-Cortes congelados (12)	2 (16,7)	12 (100,0)	0
Total (93) (%)	18 (19,4)	72 (77,4)	0 (0)

Nas 156 amostras de superfícies onde ocorre contato com o produto, a positividade foi de 27 (17,3%) para *L. monocytogenes*, 95 (60,9%) para *L. innocua* e 3 (1,9%) para *L. welshimeri*, sendo que neste matadouro não existem amostras de evisceradora (E2) por se tratar de uma planta com evisceração manual (Planta M) (Tabela 13).

Tabela 13 – Ocorrência de *L. monocytogenes* (Lm), *L. innocua* (Li) e *L. welshimeri* (Lw) nas amostras de superfícies de contato com o produto coletadas em matadouro de aves com evisceração manual (Planta M).

Amostras (número)	Lm (%)	Li (%)	Lw (%)
E1-Depenadeira (3)	0	0	0
E2-Evisceradora (0)*	-	-	-
E5-Esteira pendura (4)	0	1 (25,0)	0
E3-Ganchos evisceração (20)	1 (5,0)	7 (35,0)	0
E4-Saída <i>chiller</i> (4)	0	1 (25,0)	0
E6-Tábua (20)	4 (20,0)	13 (65,0)	0
E7-Esteira sala cortes (8)	2 (25,0)	7 (87,5)	0
E8-Facas (20)	4 (20,0)	13 (65,0)	0
E9-Ganchos sala cortes (20)	3 (15,0)	13 (65,0)	0
E10-Máquina cortes (1)	1 (100,0)	1 (100,0)	0
E13-Esteira transp. dorso (4)	2 (50,0)	4 (100,0)	0
E14-Entrada dorso máq. CMS (4)	2 (50,0)	4 (100,0)	0
E15-Saída CMS (4)	1 (25,0)	3 (75,0)	0
E16-Utensílio coleta CMS (4)	2 (50,0)	3 (75,0)	0
E11-Luvas de aço (20)	2 (10,0)	12 (60,0)	0
E12-Monoblocos brancos (20)	3 (15,0)	13 (65,0)	3 (15,0)
Total (156) (%)	27 (17,3)	95 (60,9)	3 (1,9)

* Amostra inexistente neste matadouro.

A presença de *L. monocytogenes* nas 110 amostras de superfícies onde não há contato com o produto, coletadas na Planta M, foi em 18 (16,4%) amostras, *L. innocua* em 45 (40,9%) e *L. welshimeri* em uma amostra (0,9%) (Tabela 14). Nesta planta, de evisceração manual, as amostras da esteira de entrada (S15) e saída (S16) do túnel de congelamento foram substituídas por amostras dos carrinhos (S14) do túnel de congelamento, uma vez que possui túnel semicontínuo para esta finalidade. Também

não foi realizada a coleta de amostras de afiador de facas (S12), pois esta planta apenas faz o uso de chairas, diferentemente da Planta A.

Tabela 14 – Ocorrência de *L. monocytogenes* (Lm), *L. innocua* (Li) e *L. welshimeri* (Lw) nas amostras de superfícies sem contato com o produto coletadas em matadouro de aves com evisceração manual (Planta M).

Amostras (número)	Lm (%)	Li (%)	Lw (%)
S1-Gaiola suja (20)	0	0	0
S2-Gaiola após lavagem (20)	0	4 (20,0)	0
S3-Piso depenagem (4)	0	0	0
S4-Piso evisceração (4)	1 (25,0)	3 (75,0)	0
S5-Canaleta drenagem evisceração (4)	0	2 (50,0)	0
S6-Calha evisceração (4)	1 (25,0)	1 (25,0)	0
S7-Piso sala cortes (4)	2 (50,0)	4 (100,0)	0
S8-Canaleta drenagem sala cortes (4)	1 (25,0)	4 (100,0)	0
S9-Calha respingo (3)	1 (33,3)	3 (100,0)	0
S10-Raspador esteira (1)	1 (100,0)	1 (100,0)	0
S11-Chairas (17)	2 (11,8)	10 (58,8)	0
S12-Afiador facas (0)*	-	-	-
S13-Piso CMS (5)	3 (60,0)	5 (100,0)	0
S14-Carrinho/paleta (20)	6 (30,0)	8 (40,0)	1 (5,0)
S15-Entrada túnel (0)*	-	-	-
S16-Saída túnel (0)*	-	-	-
Total (110) (%)	18 (16,4)	45 (40,9)	1 (0,9)

* Amostra inexistente neste matadouro.

Nesta planta, onde a evisceração é manual, nas mãos dos manipuladores detectou-se a presença de *L. monocytogenes* em 7 (13,2%) das 53 amostras analisadas e *L. innocua* em 29 (54,7%) (Tabela 15).

Tabela 15 – Ocorrência de *L. monocytogenes* (Lm), *L. innocua* (Li) e *L. welshimeri* (Lw) nas amostras de mãos dos manipuladores coletadas em matadouro de aves com evisceração manual (Planta M).

Amostras (número)	Lm (%)	Li (%)	Lw (%)
M1-Evisceração (20)	0	9 (45,0)	0
M2-Sala cortes (20)	3 (15,0)	12 (60,0)	0
M3-CMS (13)	4 (30,8)	8 (61,5)	0
Total (53) (%)	7 (13,2)	29 (54,7)	0 (0)

Das amostras de água coletadas na Planta M, a única espécie encontrada foi *L. innocua* em 9 (56,3%) das 16 amostras coletadas (Tabela 16).

Tabela 16 – Ocorrência de *L. monocytogenes* (Lm), *L. innocua* (Li) e *L. welshimeri* (Lw) nas amostras de água coletadas em matadouro de aves com evisceração manual (Planta M).

Amostras (número)	Lm (%)	Li (%)	Lw (%)
A1-Lavador gaiolas (4)	0	2 (50,0)	0
A2-Escaldagem (4)	0	0	0
A3-Pré-chiller (4)	0	3 (75,0)	0
A4-Chiller (4)	0	4 (100,0)	0
Total (16) (%)	0 (0)	9 (56,3)	0 (0)

Nos produtos, a maior frequência de amostras positivas para *L. monocytogenes* e *L. innocua* foi detectada na Planta M (19,4% e 77,4%, respectivamente) (Tabela 12), enquanto na Planta A as percentagens foram 14,4% e 52,2%, respectivamente. *L. welshimeri* foi detectada apenas nas amostras de dorso para CMS da Planta A (16,7%) (Tabela 7).

Na Planta A, das 12 amostras de cortes resfriados e das seis amostras de cortes congelados analisadas, duas (16,7%) e três (50,0%), respectivamente, foram positivas para *L. monocytogenes* (Tabela 7). Já na Planta M a maior positividade foi obtida nos cortes resfriados, quatro (33,3%), e nos cortes congelados, duas (16,7%) (Tabelas 12).

Em ambas as plantas a maior ocorrência de produtos positivos para *L. monocytogenes* foi obtida em amostras coletadas após a etapa de resfriamento por imersão, na zona limpa do matadouro, que indica possível disseminação do microrganismo nesta zona. No resfriamento por imersão, as carcaças são mergulhadas em tanques contendo água gelada e gelo, sendo a temperatura mantida no máximo a 16 °C, no primeiro estágio (*pré-chiller*), e a 4 °C no segundo estágio (*chiller*) do resfriamento. Como o objetivo desta etapa é a diminuição da temperatura das carcaças, estas devem sair dos resfriadores com temperatura máxima de 7 °C, temperatura que permite a multiplicação de microrganismos psicrotróficos. Desta forma, os produtos na sala de cortes, climatizada a 10 °C, ficam expostos a condições favoráveis para a multiplicação de *L. monocytogenes*.

Resultados semelhantes foram encontrados por Miettinen e colaboradores (2001) que, das amostras provenientes de dois abatedouros na Finlândia, isolaram *L. monocytogenes* das amostras coletadas após o sistema de resfriamento. Entretanto, o sistema de resfriamento empregado não era por imersão, e sim aéreo. Em sistemas de resfriamento por imersão, alguns pesquisadores isolaram *L. monocytogenes* com maior frequência após esta etapa do processamento (BARBALHO *et al.*, 2005; HUDSON e MEAD, 1989; REITER *et al.*, 2005).

Na Planta M houve maior frequência de amostras positivas para *L. innocua* e *L. welshimeri* (60,9% e 1,9%, respectivamente) em relação à Planta A (52,5% e 1,3%, respectivamente), quando se analisou amostras de superfícies onde ocorre contato com

produto (Tabelas 8 e 13). *L. monocytogenes* foi mais freqüente em superfícies de contato na Planta A (19,6%) do que naquelas da Planta M (17,3%).

Apesar das facas e das tábuas de corte serem trocadas a cada 2 horas de trabalho, e em ambas as plantas utilizarem o sistema de facas com cabos de cores diferentes a cada troca, observou-se grande ocorrência de *L. monocytogenes* neste utensílio, sendo de 20% nas tábuas de ambas as plantas e de 25% e 20% nas facas da Planta A e da Planta M, respectivamente (Tabelas 8 e 13). Como a superfície do cabo das facas e das tábuas é rugosa, estes resultados indicam que a higienização das mesmas não foi efetiva para a remoção dos microrganismos, havendo possibilidade de formação de biofilme nestas superfícies.

Ocorrência de *L. monocytogenes* também pôde ser observada nos ganchos de pendura das carcaças na sala de cortes, 25% na Planta A e 15% na Planta M (Tabelas 8 e 13), enquanto nos ganchos da nória da seção de evisceração a freqüência foi de 10% e 5%, Plantas A e M, respectivamente. Estes resultados corroboram os resultados obtidos com os produtos e reforçam a tese de que em locais mais limpos, com possibilidade de menor presença de microrganismos competidores, e em temperaturas mais amenas, a *L. monocytogenes* encontra condições favoráveis para sua sobrevivência e multiplicação.

As luvas de aço representaram maior risco de contaminação dos produtos na Planta A, na qual obteve-se 25% de amostras positivas para a *L. monocytogenes*, do que na Planta M, na qual a ocorrência do patógeno nas luvas foi de 10% (Tabelas 8 e 13). Este equipamento individual de proteção fica em contato direto com o produto é utilizado continuamente durante aproximadamente quatro horas de trabalho, sendo higienizado somente no intervalo das refeições, almoço e jantar, e no final do turno de trabalho, em setor e por funcionário específico para esta tarefa. A troca deste

equipamento com maior frequência talvez seja uma alternativa para a diminuição do risco de contaminação do produto.

Na Planta M, a maior frequência de positividade da CMS para *L. monocytogenes* (41,7%) em relação à Planta A (25%) pode ser explicada pela maior frequência do patógeno dos dorsos (25% Planta M e 8,3% Planta A) (Tabelas 12 e 7) e também pela maior contaminação das superfícies onde há contato com o produto neste setor. A esteira transportadora do dorso, a entrada do dorso na máquina de CMS e o utensílio de coleta e acerto da massa de CMS tiveram 50% das amostras positivas na Planta M, enquanto na Planta A a positividade para o patógeno foi de 0%, 25% e 0%, respectivamente para os pontos anteriores (Tabelas 8 e 13). A possível influência que o transporte/acondicionamento pode ter na presença do patógeno na CMS foi minimizada pela coleta das amostras ter sido realizada imediatamente após a produção.

Os resultados obtidos neste estudo são diferentes dos obtidos por Ramos *et al.* (2006) nos EUA. Os autores verificaram que 57 (38%) das 150 amostras de CMS de peru foram positivas para *L. monocytogenes*.

A velocidade de abate e o dimensionamento das instalações estão adequados para o volume de frangos abatidos diariamente. O tempo que uma ave demora da recepção até o respectivo dorso chegar na seção de CMS é semelhante em ambas as plantas, não havendo desta maneira diferenças significativas no tempo de processamento. Foi informado, em ambos os matadouros, que a higienização da máquina de extração de CMS é realizada nos intervalos das refeições, ou seja, no meio de cada turno de trabalho, apenas com jatos de água. No final das atividades do segundo turno de abate (no terceiro turno), a higienização é executada com mais rigor, fazendo uso de detergentes e sanitizantes adequados para esta finalidade, pois neste horário tem-

se maior disponibilidade de tempo para higienização mais acurada, inclusive das partes internas da máquina.

Mesmo a legislação brasileira autorizando a utilização da CMS somente para a elaboração de produtos cárneos industrializados cozidos específicos (BRASIL, 2000), a presença de *L. monocytogenes* na CMS nas amostras de ambas as plantas (25,0% na Planta A e 41,7% na Planta M) é um risco para a introdução do patógenos em linha de processamento de produtos cozidos. Apesar do patógeno ser destruído pelo tratamento térmico adequado dos produtos, não se pode menosprezar a possibilidade de contaminar a linha de processamento pela CMS caso ocorram falhas nos procedimentos operacionais padrão.

Nas superfícies onde não ocorre contato com o alimento, a positividade para *L. monocytogenes* na Planta A foi 1,5 vez maior do que na Planta M, para *L. innocua* foi 1,06 vez e para *L. welshimeri* foi 4,0 vezes maior (Tabelas 9, Planta A, e 14, Planta M).

Reiter *et al.* (2005) analisaram amostras de superfícies de contato e não contato com o produto coletadas em matadouro frigorífico da região sul do Brasil e encontraram 3,3% de amostras positivas para *L. monocytogenes* em esteiras transportadoras e gaiolas de transporte de aves, porcentagem significativamente menor do que as encontradas neste estudo, que foram 23,4% e 16,8% em superfícies com contato e sem contato com o alimento, respectivamente (Tabelas 8 e 9, Planta A, e Tabelas 13 e 14, Planta M). Por outro lado, no mesmo estudo, os pesquisadores encontraram positividade para *L. monocytogenes* em amostras de produtos coletados ao longo da linha de processamento, variando de 10 a 100%, valores sensivelmente superiores aos do presente estudo, que foi de 14,4% na Planta A (Tabela 7) e 19,4% na Planta M (Tabela 12). Os percentuais encontrados neste estudo são mais próximos daqueles encontrados por Barbalho *et al.* (2005), no qual 14,3% das amostras foram positivas

para *L. monocytogenes* em carcaças procedentes de uma planta processadora de frangos no Estado da Bahia.

Pelos dados apresentados nas Tabelas 9 e 14, referentes às amostras coletadas em superfícies onde não há contato com o produto, pode-se observar a maior frequência de amostras positivas para *L. monocytogenes* nas áreas limpas (a partir do ponto S4) em ambos matadouros. Detectou-se a presença do patógeno em 75% (9/12) dos pontos amostrados na zona limpa da Planta A e 90,0% (9/10) na Planta M. Entretanto, na zona suja da Planta M, a *L. monocytogenes* não esteve presente nos pontos amostrados, mas na Planta A esteve em 33,3%. Estes dados evidenciam a maior facilidade de isolamento deste patógeno em áreas limpas e com temperaturas mais baixas.

Como já mencionado anteriormente, ambos os matadouros fazem a troca das facas a cada duas horas de trabalho, mas o que chamou a atenção foi a alta ocorrência de amostras positivas para *L. monocytogenes* (40%) nos afiadores de facas (S12) utilizados somente na Planta A (Tabela 9). Nesta planta é utilizado um modelo de afiador de facas com base de altileno e duas barras móveis de aço inoxidável, de dimensões aproximadas de 25 cm x 15 cm. Na Figura 11 tem-se um modelo semelhante, porém inteiramente construído em aço inoxidável. Além da maior dificuldade de higienização, este modelo de afiador possui uma área maior que a chaira possibilitando o alojamento dos microrganismos, que no manuseio podem ser transferidos também para as mãos dos manipuladores. Este equipamento tem contato indireto com o produto, através da faca, porém observa-se quantidade de facas com a presença da *L. monocytogenes* na Planta A, 25% (5/20), ligeiramente maior em relação à Planta M, 20% (4/20) (Tabelas 8 e 13). Estes afiadores ficam apoiados sobre a superfície fixa das esteiras transportadoras de produtos, podendo entrar em contato com o mesmo e se tornar foco de contaminação. Em somente uma das visitas à Planta A foi encontrada uma chaira (Figura 12) em uso

na sala de cortes, e nesta também foi possível isolar o patógeno. Na Planta M, apenas a chaira é utilizada para afiar as facas, sendo este utensílio de fácil higienização e com menor área de contato. A frequência de chairas positivas para *L. monocytogenes* nesta planta foi de 11,8% (2/17).

A presença de *L. monocytogenes* em todas as amostras analisadas da esteira de entrada dos produtos embalados no túnel contínuo de congelamento (S15) na Planta A (Tabela 9), e em 25% (1/4) das amostras da esteira de saída deste túnel (S16), não era esperada, uma vez que neste ponto os produtos já estão acondicionados na embalagem primária e na parte inferior da embalagem secundária. Já na Planta M (Tabela 14), a presença do microrganismo foi observada em 30% (6/20) das amostras dos carrinhos utilizados no transporte e manutenção dos produtos embalados no túnel estático de congelamento. A presença da *L. monocytogenes* nestes carrinhos sugere higienização mal feita destes, das mãos dos operadores ou contaminação cruzada, pois nestes locais os produtos já receberam a embalagem primária e parte da secundária. Na segunda coleta realizada na Planta M, isolou-se *L. monocytogenes* de carrinhos recém pintados que estavam aguardando a colocação de produtos em caixas para serem encaminhados ao túnel de congelamento.

Figura 11. Modelo de afiador de facas semelhante ao utilizado na Planta A.

Figura 12. Chaira utilizada na Planta M.

Também foi observada a presença da *L. monocytogenes* em locais como piso da evisceração (S4) (75% e 25%, Planta A e M, respectivamente), piso da sala de cortes (S7) (50% em ambas), canaleta de drenagem (S8) (75% e 25%) e piso da seção de CMS (S13) (75% e 60%) (Tabelas 9 e 14), que podem constituir um foco de contaminação pelo patógeno. Conclusões semelhantes às deste trabalho foram apresentadas pelos pesquisadores Berrang *et al.* (2002), estudando plantas processadoras de frangos (EUA), e Senczek *et al.* (2000), numa planta de bovinos (Suíça).

De acordo com Berrang *et al.* (2002), a *L. monocytogenes* presente no ambiente representa um risco de contaminação, uma vez que este patógeno pode ser transferido para o produto a qualquer momento do processo, quando houver falha na higienização ou o acúmulo de produtos na linha de processamento.

Das amostras de mãos dos manipuladores, a maior frequência de amostras positivas para *L. monocytogenes* e para *L. welshimeri* foi detectada na Planta A, 21,7% e 10,0%, respectivamente, enquanto na Planta M obteve-se 13,2% e 0% (Tabelas 10 e 15). A positividade de *L. monocytogenes* obtida na Planta M foi semelhante à encontrada por Barbalho *et al.* (2005), 11,8%. No mesmo estudo, *L. innocua* foi identificada em 40,5% das amostras – resultados semelhantes foram encontrados neste estudo, 40,0% das amostras foram positivas para o microrganismo na Planta A e frequência um pouco maior foi encontrada na Planta M, 54,7%.

Na Planta M, onde o processo de evisceração é manual, não foi isolada *L. monocytogenes* das mãos dos manipuladores alocados na seção de evisceração, mesmo estes tendo contato direto e constante com as vísceras abdominais no momento da eventração das carcaças. O procedimento de lavagem constante das mãos mostrou-se eficiente para o controle do patógeno nas mãos destes manipuladores, o que contribuiu para diminuir riscos de contaminação cruzada.

Outro fator que pode ter contribuído para a não detecção da *L. monocytogenes* nas mãos dos manipuladores da evisceração é que outros patógenos autóctones dos intestinos das aves poderiam estar presentes, interferindo no seu isolamento. Como se sabe, a *L. monocytogenes* não é boa competidora. Deve-se destacar ainda que a temperatura das vísceras abdominais e torácicas, nesta etapa do abate, é elevada, em torno de 38 °C. Esta temperatura pode favorecer outros microrganismos em detrimento a *L. monocytogenes*.

Da totalidade de amostras de água examinadas de ambas as plantas, *L. monocytogenes* foi identificada em uma (A3 - pré-chiller) da Planta A (Tabela 11). Já a percentagem para *L. innocua* em amostras de água do pré-chiller na Planta M foi 75% (Tabela 16), no chiller 100%, enquanto na Planta A *L. innocua* foi detectada em 50% das amostras de água do chiller. *L. welshimeri* não foi identificada nas amostras de água coletadas em ambas as plantas.

A ausência de *L. monocytogenes* nas amostras de água na Planta M corrobora o resultado encontrado por Barbalho *et al.* (2005) que, em nove amostras de água do pré-chiller e nove amostras de água do chiller, não detectaram a presença do patógeno.

Uma vez que *L. innocua* foi a espécie predominante em todos os tipos de amostras analisadas, pode-se inferir que esta espécie está mais adaptada ao ambiente do matadouro. Outra hipótese a ser levantada é que a *L. innocua* pode ter se multiplicado

em velocidade maior, sobrepondo a taxa de crescimento da *L. monocytogenes* no meio seletivo utilizado. Este comportamento foi observado por Bruhn *et al.* (2005) ao avaliarem o caldo de enriquecimento formulação UVM (*University of Vermont medium*). Entretanto, os enriquecimentos utilizados neste estudo foram o caldo Fraser modificado acrescido de cloreto de lítio e o caldo tamponado para enriquecimento de *Listeria* acrescido de MOPS.

A *L. innocua* é a espécie mais freqüentemente co-isolada de diversos tipos de amostras analisadas (ANTUNES *et al.*, 2002; BARBALHO *et al.*, 2005; VITAS *et al.*, 2004).

A maior freqüência de isolamento de *L. innocua* em todos os tipos de amostras coletadas deve ser interpretada com cuidado. Não só porque a presença desta espécie de *Listeria* pode ser relacionada à uma possível presença da *L. monocytogenes*, mas também porque a *L. innocua* já foi envolvida em caso clínico. Perrin e colaboradores (2003), na França, isolaram *L. innocua* de um caso fatal de bacteremia em uma mulher de 62 anos de idade. O isolado foi encaminhado para o laboratório de referência de *Listeria* do Instituto Pasteur e o resultado foi *L. innocua* sorotipo 6a.

Dados sobre listeriose no Brasil ainda são raros, assim como estudos que tratam da caracterização de cepas de *L. monocytogenes* isoladas de casos clínicos. Lemes-Marques *et al.* (2007), estudando feno e genotipicamente cepas de *L. monocytogenes* isoladas de 12 casos clínicos de listeriose ocorridos no Estado de São Paulo no período entre 1995 e 2005, apontam para a necessidade da ampliação dos estudos referentes à incidência desta infecção no Brasil. Segundo os autores, por esta enfermidade não ser de notificação compulsória, somado à demora na identificação do

patógeno, fica praticamente impossível a investigação epidemiológica para se saber qual a fonte de contaminação.

4.2. Avaliação fenotípica e genotípica dos isolados de *L. monocytogenes*

A partir dos 2.728 isolados submetidos à identificação bioquímica no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, obteve-se 389 isolados de *L. monocytogenes*, 2.304 isolados de *L. innocua* e 35 isolados de *L. welshimeri*. Selecionou-se 226 representantes do gênero para serem enviados ao Canadá (*Bureau of Microbial Hazards, Health Products and Food Branch*, no *Health Canada* – BMH/HC) para sua avaliação molecular. Este grupo foi composto por 221 isolados de *L. monocytogenes*, sendo dois isolados por amostra, preferencialmente de meios de cultura seletivos diferentes, três isolados de *L. innocua* e dois de *L. welshimeri*, conforme identificados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF/USP.

Os 226 isolados de *Listeria* spp. foram submetidos à nova caracterização fenotípica (testes bioquímicos e crescimento em ágar cromogênico RAPIDTM L.MonoTM) no BMH/HC.

De acordo com os dados obtidos naquele laboratório, dos 221 isolados inicialmente considerados como *L. monocytogenes* no Brasil, 161 (72,9%) apresentaram reações de fermentação de carboidratos e de hemólise características para *L. monocytogenes* e 60 (27,1%) não apresentaram a reação de hemólise, apesar da fermentação dos carboidratos ter sido característica para o patógeno (Tabelas 1 e 17).

Assim, considerou-se como definitivo os resultados obtidos no laboratório BMH/HC. Portanto, a partir deste ponto os dados apresentados se referem aos

resultados obtidos no BMH, salvo quando for feita a referência ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF/USP.

A reação de hemólise em ágar sangue de carneiro ou cavalo é característica da *L. monocytogenes*. Esta reação é utilizada para identificar e diferenciar isolados, oriundos de alimentos e de surtos. Entre as espécies, *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são capazes de hemolisar, e *L. innocua* e as demais espécies não o são (STROM, 1998). Entretanto esta característica deve ser avaliada com cuidado, pois cepas de *L. monocytogenes* não produtoras de hemolisina já foram descritas. Allerberger e colaboradores (1997) detectaram (na Áustria) *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a não hemolítica em produtos lácteos.

Quando os 221 isolados foram semeados em ágar cromogênico RAPID'L.MonoTM, 159 (71,9%) apresentaram reações características para *L. monocytogenes*, ou seja, as colônias apresentaram coloração azul sem halo, e 62 (28,1%) não apresentaram esta característica (Tabela 17). Os isolados com resultados característicos para *L. monocytogenes* neste teste também haviam apresentado resultados característicos para *L. monocytogenes* nos testes bioquímicos.

Devido à diferença nos resultados fenotípicos obtidos, os isolados foram submetidos ao BAX[®] System e à identificação baseada no Multiplex-PCR 16S rRNA. Na Figura 13 tem-se o perfil característico para *L. monocytogenes* (linhas 4 a 10) caracterizado pela presença das bandas de 287 pb e de 730 pb. Duzentos e dez (95,0%) isolados apresentaram resultados característicos de *L. monocytogenes* para ambos os testes (Tabela 17); entretanto 49 destas cepas apresentaram reação negativa para hemólise. Estes dois métodos mostraram-se mais rápidos, confiáveis e menos trabalhosos do que os testes bioquímicos tradicionais, porém mais onerosos e não permitem a identificação das outras espécies.

Tabela 17 – Identificação e caracterização fenotípica e genotípica, realizadas no BMH/HC – Canadá, dos 221 isolados obtidos em dois matadouros frigoríficos e previamente identificados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF/USP como *L. monocytogenes*.

Método	<i>L. monocytogenes</i> (%)	Outras <i>Listerias</i> (%)
Testes bioquímicos	161 (72,9)	60 (27,1)
Ágar cromogênico*	159 (71,9)	62 (28,1)
BAX [®] System	210 (95,0)	11 (5,0)
Multiplex-PCR 16S rRNA	210 (95,0)	11 (5,0)

* RAPID[®] L.Mono[™] (BioRad).

A utilização de resultados baseados exclusivamente em características fenotípicas para liberação de lotes pelas empresas deve ser reavaliada. Conforme os dados obtidos neste estudo, o número de resultados negativos falsos para *L. monocytogenes* por estes métodos foi elevado (23,3%). Isto foi verificado também por outros pesquisadores (ALLERBERGER *et al.*, 1997; STROM, 1998).

A especiação das 11 cepas não *L. monocytogenes* posteriormente realizada, empregando-se o API[®] *Listeria* no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF/USP, indicou que um isolado, obtido de luva de aço na Planta A, teve o perfil numérico (2510) indicando ser *L. monocytogenes*, seis isolados tiveram perfis (3510, 7110 e 7510) característicos para *L. innocua* e quatro para *L. innocua* ou *L. welshimeri* (7710).

Figura 13. Perfis dos isolados obtidos empregando-se Multiplex PCR 16S rRNA. Linhas 1 e 12, marcador de peso molecular (DNA Molecular Weight Marker XIV, Roche); linhas 2 e 3, *Listeria* spp (cepas 750 e 751); linhas 4 a 10, *L. monocytogenes* (isolados 801, 802, 803, 804, 805, 806 e 807), e linha 11, controle negativo.

A Tabela 18 sumariza os resultados apresentados nas Tabelas de 7 a 16 e apresenta a distribuição das amostras e das cepas nas diversas categorias amostradas na Planta A e na Planta M, segundo resultados obtidos na identificação genotípica. Verifica-se (na Tabela 18) que 125 cepas foram provenientes da Planta A e 85 da Planta M.

Tabela 18 – Distribuição das amostras positivas para *L. monocytogenes* (Lm) e número de cepas obtidas em dois matadouros de aves, um com evisceração automática (Planta A) e outro com evisceração manual (Planta M), de acordo com resultados obtidos na identificação genotípica.

Amostras	Planta A			Planta M		
	Amostras + para Lm (nº amostras)	% (+)	Nº cepas	Amostras + para Lm (nº amostras)	% (+)	Nº cepas
P - Produtos	13 (90)	14,4	17	18 (93)	19,4	22
E - Superfícies de contato com produto	31 (158)	19,6	46	27 (156)	17,3	35
S - Superfícies sem contato com produto	27 (99)	27,3	39	18 (110)	16,4	23
M - Mãos dos manipuladores	13 (60)	21,7	21	7 (53)	13,2	5
A - Água	1 (16)	6,3	2	0 (16)	-	0
Total	85 (423)	20,1	125	70 (428)	16,4	85

Na Tabela 19 tem-se a distribuição das cepas nas linhas de abate das duas plantas avaliadas.

Tabela 19 – Origem e identificação das 210 cepas de *L. monocytogenes* obtidas em dois matadouros de aves, um com evisceração automática (Planta A) e outro com evisceração manual (Planta M).

Amostras	Tipo de amostra	Cepas	
		Planta A	Planta M
Recepção			
Gaiolas sujas	S ^a	-	-
Gaiolas limpas	S	-	-
Água da lavagem das gaiolas	A ^b	-	-
Escaldagem e depenagem			
Frango depenado	P ^c	-	-
Depenadeira	E ^d	-	-
Piso	S	708	-
Água da escadagem	A	-	-
Evisceração			
Frango antes do chuveiro	P	623/718	-
Frango após o chuveiro	P		824
Frango resfriado (após <i>chiller</i>)	P	420/421/719/720	826/827
Evisceradora	E	-	-
Ganchos	E	303/304/305/306/ 307	801
Saída do <i>chiller</i>	E	325/326	-
Esteira de pendura após <i>chiller</i>	E	301/302	-
Calha de respingo	S	335/336/619/620	822
Canaleta de drenagem	S	-	-
Piso	P	615/616/709	815/816
Mãos do manipulador	M	339/340/723/724	-
Água do pré- <i>chiller</i>	A	621/622	-
Água do <i>chiller</i>	A	-	-
Sala de cortes			
Cortes resfriados de frango	P	337/624/625	123/512/513/828/ 829
Tábua de corte	E	308/309/401/402/ 601/602	101/102/103/104/ 105/802
Esteira transportadora de cortes	E	603	106/107/803
Facas	E	310/311/312/313/ 604/605/701	108/109/110/111/ 804/805/806
Ganchos	E	315/316/317/318/ 319/321/322/606/ 607	112/114/115
Máquina de cortes	E	323/324	838
Luvras de aço	E	350/403/404/405/ 406/610/611	502/811

Continua

Conclusão

Amostras	Tipo de amostra	Cepas	
		Planta A	Planta M
Sala de cortes			
Piso	S	331/332/416	506/817
Chairas/afiadores	S	328/329/330/410/ 411/412/413/414/ 613/614/703/704/ 705/706/707	119/120/814
Calha de respingo	S	-	819
Canaleta de drenagem	S	-	-
Raspador de esteira	S	-	813
Drenagem/ralo	S	417/710/711	818
Mãos do manipulador	M	342/343/423/424/ 425/426/631/632/ 633/634/635/725/ 726	125/126/516
Embalagem			
Monoblocos brancos	E	407/408/409	503/504/505/812
CMS			
Dorsos	P	626	204/205/830/831/ 832/833
CMS	P	422/627	206/207/208/209/ 834
Entrada dos dorsos na máq. CMS	E	608	116/807
Esteira transporte de dorsos	E	-	117/118/810
Saída da CMS	E	702	808
Utensílio de coleta	E	-	501/809
Piso	S	333/418/712/713	121/201/820
Mãos do manipulador	M	636/637/727/728	128/211
Congelamento			
Cortes congelados de frango	P	628/629/630/721/ 722	210/514/515
Esteira de entrada no túnel	S	334/419/714/715	-
Esteira de saída do túnel	S	716/717	-
Carrinho de congelamento/paleta	S	-	122/202/203/507/ 508/509/510/511/ 821

^a S = superfície sem contato com o produto^b A = água^c P = produto^d E = superfície de contato com o produto

4.3. Perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *L. monocytogenes*

A avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos foi utilizada neste estudo como mais uma alternativa para traçar a disseminação da *L. monocytogenes* nas plantas processadoras estudadas.

As duzentas e dez cepas de *L. monocytogenes* submetidas à análise de sensibilidade a 15 antibióticos por difusão em discos (Tabela 20) apresentaram (de acordo com tabela do NCCLS – UNITED STATES, 2003) susceptibilidade à ampicilina, vancomicina, kanamicina, gentamicina, estreptomicina, tobramicina, tetraciclina, minociclina, rifampicina, trimetoprina e componentes sulfonamida. Cinco apresentaram resistência à eritromicina e ao cloranfenicol (2,4%) e 127 (60,5%) resistência à clindamicina. Sessenta e duas (29,5%) cepas apresentaram resistência intermediária à clindamicina e apenas uma (0,5%) à ciprofloxacina.

Corroborando os dados de elevadas percentagens de resistência (60,5%) (Tabela 20) à clindamicina encontrados neste estudo, Safdar e Armstrong (2003) encontraram 96,2% (25 de 26). Segundo estes pesquisadores, este dado era inesperado.

As cinco cepas que apresentaram resistência à eritromicina e ao cloranfenicol também apresentaram resistência à clindamicina (Tabela 20). Estas foram obtidas na Planta A, na primeira coleta de amostras, e eram provenientes de superfície de contato com o produto (cepas 301, 319, 324, 325) e de um afiador de facas, superfície sem contato direto com o produto (cepa 328).

Não se obteve junto a indústria confirmação se o lote abatido naquele dia havia recebido algum tratamento com antibiótico, ou se houve diferença na origem dos pintinhos nos demais lotes. A ausência destas informações torna difícil o estabelecimento da causa da resistência destas cinco cepas, obtidas em uma mesma coleta, a três antimicrobianos.

Tabela 20 – Perfil de resistência a antimicrobianos, por difusão em discos, das 210 cepas de *L. monocytogenes* obtidas em dois matadouros de aves, baseado nos critérios do NCCLS (UNITED STATES, 2003).

Agente antimicrobiano	Resistentes (%)	Intermediários (%)	Sensíveis (%)
β-Lactâmicos – Penicilinas			
Ampicilina (10 µg)			210 (100)
Glicopeptídeos			
Vancomicina (30 µg)			210 (100)
Aminoglicosídeos			
Kanamicina (30 µg)			210 (100)
Gentamicina (10 µg)			210 (100)
Estreptomicina (10 µg)			210 (100)
Tobramicina (10 µg)			210 (100)
Macrolídeos			
Eritromicina (15 µg)	5 (2,4)		205 (97,6)
Tetraciclinas			
Tetraciclina (30 µg)			210 (100)
Minociclina (30 µg)			210 (100)
Quinolonas			
Ciprofloxacina (5 µg)		1 (0,5)	209 (99,5)
Outros			
Cloranfenicol (30 µg)	5 (2,4)		205 (97,6)
Clindamicina (2 µg)	127 (60,5)	62 (29,5)	21 (10,0)
Rifampicina (5 µg)			210 (100)
Trimetoprina (5 µg)			210 (100)
Componentes sulfonamida (300 µg)			210 (100)

As cepas que apresentaram halo de inibição do crescimento na faixa intermediária de resistência na análise por difusão em discos (62 para o antibiótico clindamicina e um para a ciprofloxacina) (Tabela 20) foram submetidas à análise de sensibilidade a antimicrobianos por *spiral gradient endpoint* – SGE (PATON *et al.*, 1990).

Todas as cepas analisadas frente aos dois antibióticos, clindamicina (2 µg) e ciprofloxacina (5 µg), revelaram sensibilidade a estes agentes antimicrobianos segundo padrões do NCCLS (UNITED STATES, 2003) (Tabela 21).

Tabela 21 – Perfil de resistência a antimicrobianos, por *spiral gradient endpoint* – SGE (PATON *et al.*, 1990), das 63 cepas de *L. monocytogenes* obtidas em dois matadouros de aves, baseado nos critérios NCCLS (UNITED STATES, 2003).

Agentes antimicrobianos (nº cepas)	Limites de crescimento (MIC)		Resultados ** µg/mL
	resistentes	sensíveis	
Ciprofloxacina (1)	≥ 4	≤ 1	0,2
Clindamicina (62)	≥ 4	≤ 0,5	0,1 a 0,3

* segundo NCCLS (UNITED STATE, 2003)

** segundo PATON *et al.*, 1990

Os resultados obtidos neste estudo são semelhantes aos alcançados por Safdar e Armstrong (2003) no que se referem à sensibilidade à ampicilina, eritromicina, tetraciclina e gentamicina e também aos obtidos por Mayrhofer *et al.* (2004). Já Abuín *et al.* (1994) encontraram porcentagem significativa de resistência ao cloranfenicol dentre as cepas avaliadas. No Brasil, Lemes-Marques *et al.* (2007) também encontraram nas cepas de origem clínica sensíveis à ampicilina, vancomicina, gentamicina e trimetropina, 100% de sensibilidade.

De acordo com os resultados de sensibilidade da *L. monocytogenes* frente à maioria dos agentes antimicrobianos testados, verifica-se que o tratamento da listeriose pode ser realizado com uma combinação de ampicilina e gentamicina (PAGOTTO *et al.*, 2006). No entanto, Rang *et al.* (2001) indicam, para o tratamento da *L. monocytogenes*, amoxicilina e eritromicina como antibióticos de primeira e de segunda escolhas, respectivamente. Segundo os autores, a estrutura da amoxicilina se assemelha

a um aminoglicosídeo e, neste estudo, os 4 agentes antimicrobianos testados pertencentes a esta categoria foram eficazes no controle de *L. monocytogenes*. No entanto, frente à eritromicina, 5 (2,4%) das 210 cepas testadas foram resistentes.

A alta taxa de sensibilidade da *L. monocytogenes* isolada de alimentos, frente à grande maioria dos agentes antimicrobianos testados neste e nos estudos citados, acena para um ótimo prognóstico do tratamento dos casos de listeriose. Entretanto, de acordo com Lemes-Marques *et al.* (2007), os dados brasileiros de cepas de *L. monocytogenes* resistentes a antibióticos devem ser interpretados com cautela, sempre considerando os casos de cepas resistentes isoladas em outros países.

Segundo Mayrhofer *et al.* (2004), a alta sensibilidade de *L. monocytogenes* aos agentes antimicrobianos pode ser explicada pelo fato do microrganismo ter maior parte do seu ciclo fora do hospedeiro, no ambiente, estando menos exposto a estes agentes.

4.4. Identificação sorológica dos isolados de *L. monocytogenes*

4.4.1. Sorotipagem molecular

Através da sorotipagem molecular descrita por Doumith *et al.* (2004a), dentre os 210 isolados de *L. monocytogenes*, observou-se a presença dos sorotipos 1/2a ou 3a (grupo 1); 1/2c ou 3c (grupo 2); 1/2b, 3b ou 7 (grupo 3) e 4b, 4d ou 4e (grupo 4).

De acordo com a Tabela 22, observa-se que na Planta A houve maior diversidade de sorotipos, tendo sido identificadas com maior frequência cepas pertencentes ao grupo 4, 77 (61,6%); do grupo 1 foram 24 cepas (19,2%); grupo 2, 19 (15,2%) e cinco cepas (4,0%) do grupo 3. Já na Planta M apenas dois grupos foram identificados, 62 cepas (72,9%) do grupo 1 e 23 (27,1%) pertencentes ao grupo 4.

É interessante notar que na Planta A houve predomínio de cepas de *L. monocytogenes* pertencentes ao grupo 4. Este dado é importante pois, na maioria dos surtos de listeriose invasiva registrados, o microrganismo pertenceu ao sorotipo 4b. Já na Planta M o grupo 1 foi o mais freqüente, grupo este ao qual pertence o sorotipo 1/2a, mais freqüentemente isolado de alimentos incriminados em surtos (FARBER e PETERKIN, 1991).

Apesar de todas as cepas de *L. monocytogenes* serem potencialmente capazes de causar doenças em humanos, somente isolados de quatro dos 13 sorotipos existentes (1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b) são responsáveis por 98% dos casos de listeriose (DOUMITH *et al.*, 2004b).

Dentre os 49 isolados que apresentaram reação negativa de hemólise, 48 pertenceram ao grupo 1 (1/2a ou 3a) e um isolado pertenceu ao grupo 4 (4b, 4d ou 4e). Allerberger *et al.* (1997) detectaram, dentre as sete cepas avaliadas, seis cepas de *L. monocytogenes* não hemolíticas pertencentes ao sorotipo 1/2a.

Em um trabalho no Brasil também realizado em matadouro de aves (BARBALHO *et al.*, 2005), onde foi feita a sorotipagem dos isolados, foram encontradas, nas carcaças, cepas de *L. monocytogenes* pertencentes aos sorotipos 1b e 1c e, nas mãos dos manipuladores, cepas 1b. A comparação dos dados de Barbalho *et al.* (2005) com os deste trabalho é difícil, uma vez que o esquema de sorotipagem empregado por aqueles autores foi baseado no protocolo desenvolvido por Paterson (1940) que difere do empregado neste estudo, que seguiu a metodologia disponibilizada no *Bacteriological Analytical Manual* (BAM, 2007).

Resultados semelhantes aos deste estudo foram observados por Vitas e colaboradores (2004) na Espanha. Das 158 amostras de cortes de frango analisadas pelos pesquisadores, 78,9% pertenceram ao sorogrupo 1, sendo: 26,3% do sorotipo 1/2a,

36,8% do 1/2b, 15,8% do 1/2c, e 21,1% do sorotipo 4b/4bx, resultado este que se aproxima dos resultados encontrados neste experimento.

Tabela 22 – Distribuição dos sorotipos de *L. monocytogenes* isolados em dois matadouros de aves, um com evisceração automática (Planta A) e outro com evisceração manual (Planta M).

Sorotipos	Grupo*	Planta A nº (%)	Planta M nº (%)	Total nº (%)
1/2a ou 3a	1	24 (19,2)	62 (72,9)	86 (41,0)
1/2b, 3b ou 7	3	5 (4,0)	-	5 (2,4)
1/2c ou 3c	2	19 (15,2)	-	19 (9,0)
4b, 4d ou 4e	4	77 (61,6)	23 (27,1)	100 (47,6)
Total		125 (100)	85 (100)	210 (100)

* Classificação segundo DOUMITH *et al.* (2004a).

Vinte e nove das 210 cepas de *L. monocytogenes* avaliadas neste estudo apresentaram perfil inesperado na sorotipagem molecular (Figura 14, linha 6), tendo-se obtido quatro fragmentos: 370 pb, 471 pb, 597 pb e 691 pb, sendo os três primeiros característicos do grupo 4 e o de 691 pb característico do grupo 1. Apesar de todos os fragmentos obtidos com estas 29 cepas terem sido descritos por Doumith *et al.* (2005), estes pesquisadores não haviam relatado a existência de cepas com quatro fragmentos, sendo três o maior número de fragmentos esperados para os grupos 2 (1/2c ou 3c) e 4 (4b, 4d ou 4e) (Figura 5). É importante notar que o fragmento de 370 pb está presente em todas as espécies por ser identificador do gênero *Listeria*.

Estas cepas de comportamento anômalo foram isoladas na Planta A em luva de aço (E11), monoblocos brancos (E12), afiadores de facas (S12), piso da seção da CMS

(S13), calha de respingo (S6) e cortes congelados de frango (P8). Na Planta M, o isolamento destas cepas ocorreu de amostras coletadas de tábuas de corte (E6), mãos de manipuladores (M2), luvas de aço (E11), monoblocos brancos (E12), utensílio de coleta da CMS (E16), carrinho do túnel de congelamento (S14), carcaças antes da CMS (P6), cortes resfriados (P5) e congelados (P8) de frango e frango resfriado (P4).

Figura 14. Perfis encontrados na sorotipagem molecular (DOUMITH *et al.*, 2005) das cepas isoladas em dois matadouros de aves. Linhas 1 e 8, marcador de peso molecular (DNA Molecular Weight Marker XIV, Roche); linha 2, sorotipo 1/2a ou 3a (cepa 421); linha 3, sorotipo 1/2b, 3b ou 7 (cepa 603); linha 4, sorotipo 1/2c ou 3c (cepa 605); linha 5, sorotipo 4b, 4d ou 4e (cepa 602); linha 6, sorotipo inespecífico (cepa 515), e linha 7, *L. innocua* (cepa 617). Consultar Tabela 9 para localização da origem das cepas.

As três bandas (471 pb, 597 pb e 691 pb) obtidas com as 29 cepas com perfis inesperados foram enviadas para seqüenciamento pelo DNA *Sequencing Service and Purification* (DNA LandMarks Inc., Montreal, Canadá). Posteriormente, as seqüências foram submetidas à avaliação de homologia *on-line*, utilizando-se a base BLAST (*Basic Local Alignment Tool* – www.ncbi.nih.gov/BLAST).

Para algumas das cepas não foi possível identificar a sequência de bases de alguns fragmentos enviados para sequenciamento, ou o resultado obtido foi uma porção muito pequena do gene (aproximadamente 80 nucleotídeos), o que inviabilizou sua comparação utilizando o BLAST.

Na avaliação da homologia obteve-se a similaridade das cepas analisadas com duas outras, *L. monocytogenes* F2365 e *L. monocytogenes* EGD. A primeira (F2365), sorotipo 4b, foi isolada de queijo incriminado em surto na Califórnia, EUA, no ano de 1985 (www.tigr.org/tdb/listeria/). A segunda (EGD), sorotipo 1/2a, é muito utilizada como cepa-referência em laboratórios.

Verificou-se que 21 dentre as 29 cepas apresentaram fragmentos de 471 pb e 597 pb com similaridade na sequência de bases entre 99 e 100% com fragmentos de mesmo tamanho da *L. monocytogenes* F2365. Os fragmentos com 691 pb, quando passíveis de sequenciamento, apresentaram similaridade de 99% com fragmentos da *L. monocytogenes* EGD (Tabela 23).

Com base nos resultados encontrados verificou-se que 18 cepas (101, 126, 202, 205, 211, 406, 418, 502, 507, 509, 512, 515, 620, 628, 705, 707, 826, 827), dentre as 29 analisadas, apresentaram seqüências no seu DNA que são simultaneamente características para os sorotipos 4b e 1/2a (em destaque na Tabela 23).

Este é o primeiro relato de cepas de *L. monocytogenes* apresentando simultaneamente seqüências genéticas de 2 sorotipos.

Diante destes resultados intrigantes, mais estudos com estas cepas estão sendo realizados pelo laboratório BMH/HC.

Tabela 23 – Proporção de similaridade dos fragmentos sequenciados das 29 cepas de *L. monocytogenes* identificadas no BLAST. Destaque para as cepas que apresentaram simultaneamente seqüências genéticas de *L. monocytogenes* F2365 e *L. monocytogenes* EGD.

Cepas	Tamanho dos fragmentos		
	<i>L. monocytogenes</i> F2365		<i>L. monocytogenes</i> EGD
	471 pb ^a	597 pb ^a	691 pb ^b
101	100%	99%	99%
102	100%	99%	sem F [*]
123	100%	99%	sem R ^{**}
125	100%	99%	sem R
126	100%	sem F	99%
202	sem R	99%	99%
203	100%	99%	sem F
204	100%	100%	sem R
205	100%	100%	99%
211	100%	99%	99%
406	100%	sem R	99%
407	sem F	sem R	99%
418	100%	99%	99%
501	100%	99%	sem R
502	100%	99%	99%
507	100%	99%	99%
509	100%	sem R	99%
512	100%	100%	99%
514	100%	99%	sem F
515	100%	99%	99%
516	100%	99%	sem F
620	100%	sem F e R	99%
628	99%	sem R	99%
705	sem R	99%	99%
706	100%	99%	sem R
707	100%	99%	99%
812	100%	99%	sem R
826	100%	99%	99%
827	100%	99%	99%

^a *L. monocytogenes* cepa F2365, sorotipo 4b

^b *L. monocytogenes* cepa EGD, sorotipo 1/2a

^{*} Não foi possível o seqüenciamento do fragmento de DNA direto

^{**} Não foi possível o seqüenciamento do fragmento de DNA reverso

4.4.2. Sorologia convencional

As 29 cepas com comportamento diferenciado (item 4.4.1) foram submetidas, juntamente com 24 cepas escolhidas aleatoriamente dentre as 210 de *L. monocytogenes*, à sorologia convencional.

Todas as 29 cepas reagiram com o soro 4b, enquanto 23 das 24 cepas adicionais apresentaram resultados equivalentes aos que haviam apresentado na sorotipagem molecular. Apenas uma cepa que havia apresentado perfil molecular semelhante ao grupo 3 (1/2b, 3b ou 7) reagiu com o soro 4b. Este resultado não pôde ser explicado por Doumith (comunicação pessoal).

A sorologia convencional não foi realizada em todas as cepas, primeiro por haver dificuldade na aquisição do soro comercial no Brasil e, segundo, devido ao elevado custo do mesmo no Canadá.

A metodologia molecular para sorotipagem mostrou-se de fácil e rápida execução, de custo baixo, com resultados comparáveis aos da metodologia convencional. Porém, o resultado não permite a separação dos sorotipos, pois cada perfil agrupa de dois a três sorotipos diferentes.

Observou-se neste estudo que algumas amostras abrigavam cepas de *L. monocytogenes* de diferentes sorotipos e que estas cepas eram provenientes de meios seletivos diferentes. Isto foi verificado para a amostra proveniente do carrinho do túnel de congelamento (S14 – Planta M), cujo as cepas 508 e 509 pertenceram aos sorotipos 1/2a e 4b. Também encontraram-se, na Planta A, amostras abrigando dois sorotipos. Desta planta isolou-se, de monoblocos brancos (E12), as cepas 408 (1/2c) e 409 (1/2a); da canaleta de drenagem da sala de cortes (S8), as cepas 710 (4b) e 711 (1/2c); e da entrada do túnel de congelamento (S15), as cepas 714 (4b) e 715 (1/2a). Por meio destes

dados pode-se notar que superfícies onde não ocorre contato com o produto (carrinho e esteira do túnel de congelamento e canaleta de drenagem) apresentaram maior diversidade de sorotipos. Pode-se notar também que na Planta A foi detectado maior número de cepas de uma mesma amostra pertencentes a sorotipos diferentes. Estes oito isolados foram identificados na sorotipagem molecular e na sorologia convencional.

4.5. Perfil genético das cepas de *L. monocytogenes*

4.5.1. Ribotipagem

Todas as 210 cepas de *L. monocytogenes* foram submetidas à ribotipagem pelo sistema RiboPrinter[®], sendo que 19 ribogrupos foram identificados. Os resultados obtidos para estas cepas foram comparados com os perfis existentes no banco de dados do equipamento do BMH/HC. A relação dos perfis obtidos e respectivas cepas pode ser encontrada no anexo 9.

A maioria das cepas analisadas pertenceu a ribogrupos previamente existentes, porém apareceram quatro novos ribogrupos (Figura 15).

Os três grupos (DUP-1046, DUP-19180 e DUP-1053) foram considerados pela análise do *software* do equipamento como muito semelhantes a grupos pré-existent no banco de dados. A eles pertenceram uma, duas e nove cepas, respectivamente. O perfil DUP-1053 foi muito semelhante a um perfil previamente existente no banco de dados e o programa atribuiu a ele a mesma denominação já existente.

O grupo (DUP-1062) foi considerado como um novo perfil pelo programa do equipamento. A este perfil pertenceram somente as cepas (626 (P6) e 718 (P2)) ambas isoladas na Planta A e pertencentes ao sorogrupo 1/2a.

Figura 15. Alguns perfis de cepas submetidas à ribotipagem pelo RiboPrinter®, destacando os ribogrupos já existentes (*) e identificação de novos ribogrupos.

4.5.2. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

As 210 cepas de *L. monocytogenes* isoladas nas duas plantas, A e M, foram submetidas à macrorrestrrição com as enzimas *ApaI* e *AscI* e ao PFGE. Dezesesseis cepas de outras espécies de *Listeria*, isoladas nos dois matadouros frigoríficos, também foram submetidas à PFGE. Para análise dos resultados empregou-se o programa BioNumerics (BioRad).

Na macrorrestrrição das cepas de *L. monocytogenes* com a enzima *ApaI* obteve-se 65 pulsotipos diferentes. Na Figura 16 tem-se alguns dos pulsotipos encontrados. Das 16 não-*L. monocytogenes*, quatro não foram digeridas por esta enzima, ficando, desta maneira, sem definição dos perfis; sete foram reunidas em um único *cluster*, uma apresentou perfil único e as demais apresentaram perfis semelhantes a cepas de *L. monocytogenes*.

Na restrição com a enzima *AscI* obteve-se 52 pulsotipos diferentes, alguns dos quais estão apresentados na Figura 17. As cepas de outras espécies de *Listeria* ficaram reunidas num único *cluster* geneticamente distante das cepas de *L. monocytogenes*, podendo ser consideradas um grupo externo (*outgroup*).

Figura 16. Alguns dos perfis obtidos na macrorrestrição do DNA de *L. monocytogenes* com a enzima *ApaI* submetidas ao PFGE. Linhas 1, 8 e 15, padrão de peso molecular (*Salmonella* sorovar Braenderup, cepa H9812, digerida com a enzima *XbaI*), linhas 2 a 7 e 9 a 14, cepas de *L. monocytogenes* de diferentes fontes.

Apesar da enzima *ApaI* ter gerado maior número de pulsotipos, o que indica maior poder discriminatório, esta enzima não foi eficiente na separação de cepas de outras espécies. Já a *AscI*, mesmo gerando menor número de pulsotipos, foi mais eficiente na separação de cepas não relacionadas.

Combinando-se os resultados obtidos com as duas enzimas e realizando-se a análise conjugada dos pulsotipos obtidos, verificou-se a existência de 104 perfis genéticos diferentes (Tabela 24). Cinquenta e nove perfis combinados ficaram restritos à Planta A, 41 à Planta M, e quatro perfis combinados estavam presentes nas duas plantas. Pode-se notar a maior variedade de perfis genéticos nas cepas provenientes da Planta A (Tabela 25).

Figura 17. Alguns dos perfis obtidos na macrorrestrição do DNA de *L. monocytogenes* com a enzima AscI submetidas ao PFGE. Linhas 1, 8 e 15, padrão de peso molecular (*Salmonella* sorovar Braenderup, cepa H9812, digerida com a enzima XbaI), linhas 2 a 7 e 9 a 14, cepas de *L. monocytogenes* de diferentes fontes.

Na Tabela 25 encontra-se a distribuição dos 104 perfis ao longo da linha de abate.

Um único perfil genético (**G62**) foi obtido na zona suja e a cepa foi isolada no piso da seção de depenagem (S3) da Planta A apenas na quarta coleta (Tabela 25).

Na Planta A, alguns perfis (**G21**, **G31** e **G46**) foram mais frequentemente obtidos, estando presentes em diferentes pontos, tipo de amostra e coleta. Estas amostras parecem estar mais adaptadas à planta, o que garantiu seu isolamento em diferentes datas de coleta (Tabela 25).

Tabela 24 – Distribuição das 210 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em dois matadouros de aves, conforme os 104 perfis combinados de PFGE obtidos com enzimas ApaI e AscI.

Perfil combinado	Perfil ApaI	Perfil AscI	Planta A	Planta M
G1	5	AW	425 ^a	
G2	6	AW	426	
G3	7	AV	606-607	
G4	8	AV	603	
G5	9	AR		126-512
G6	10	AR		101-102-123-125-204- 205-211-501-502-514- 515
G7	10	AQ		516
G8	11	AT		202-203
G9	11	AS	628	
G10	11	AP		812
G11	11	AR		826
G12	12	AR		827
G13	13	AP	406-407-418-620	509
G14	14	AU		507
G15	15	AO	705-706-707	
G16	16	AX	302 ^b -303-304-305-306- 307	
G17	17	AX	301-321-322-323-324- 325-328-329	
G18	17	AY	326	
G19	18	AX	315-316-317-318-319	
G20	19	BJ	401-410-411	
G21	20	BH	330-413-414-634	
G22	20	BK	412	
G23	20	BG	631-632	
G24	21	BG	423	
G25	22	BG	342-343	
G26	23	BI	621-622	
G27	24	BG	424	
G28	25	BL		815
G29	26	BM		816
G30	27	BH	635	
G31	28	AZ	402-403-404-405-419- 610-619	
G32	28	BE	633	
G33	29	BF	331-332	
G34	30	BA	611	

Continua

Continuação

Perfil combinado	Perfil ApaI	Perfil AscI	Planta A	Planta M
G35	31	AC	623	
G36	32	AZ	613-614-615-616-624-625	
G37	33	AZ	601-602	
G38	34	BB	723	
G39	34	AZ	724	
G40	35	AZ	703-704	
G41	36	AZ	714	
G42	37	AZ	339-340	
G43	38	AX	335-336	
G44	40	AZ	716-717	
G45	41	BD	710	
G46	42	AM	409-715	
G47	43	AM	709	
G48	44	Y		513-819
G49	44	X		804-805
G50	45	AN	312-313	
G51	46	AN	334	
G52	47	N		128
G53	47	M		510
G54	48	L	333	
G55	49	N	721	503-505-506
G56	49	O		504
G57	49	M	722	
G58	49	S		807
G59	50	M	420-421	121-201-508-810-820- 832
G60	50	L		122
G61	50	W	720	
G62	51	M	708	
G63	52	W	719	
G64	53	K		824
G65	54	M		207-208-209
G66	55	N		206
G67	56	U	711-712-713	
G68	56	T	725-726	
G69	57	U	417	
G70	58	V	636-637-727-728	
G71	59	P	422	
G72	60	Q	408	
G73	60	J	604-605-629-630	
G74	61	P	308-309-311	
G75	61	R	310	

Continua

Conclusão

Perfil combinado	Perfil ApaI	Perfil AscI	Planta A	Planta M
G76	62	AG		106-107
G77	62	AI		117
G78	62	AJ		809
G79	62	AL		813-814
G80	63	AG		104-114
G81	63	AI		821
G82	63	AE		833-834
G83	64	AI		115
G84	65	AB	626	
G85	65	AF		838
G86	65	AJ		808
G87	65	AE		828-829-830
G88	66	AC		103
G89	66	AB		110-111-112-116
G90	66	AI		118-119-511
G91	66	Z		210
G92	66	AL		801-802-803-817-818
G93	66	AK		811
G94	66	AE		822-831
G95	67	AJ		806
G96	68	AB	627	120
G97	68	Z	701-702	
G98	69	AD	718	
G99	70	AG		108-109
G100	70	AH	416	
G101	71	AE	608	
G102	72	AG		105
G103	73	AB	337	
G104	74	Z	350	

^a Cepas em vermelho indicam cepas com reação negativa de hemólise.

^b Para informação sobre a origem das cepas, consultar Tabela 19.

O perfil **G21** foi isolado nas três primeiras coletas, sendo que, nas duas primeiras, a *L. monocytogenes* estava presente nos afiadores (S12) da sala de cortes, superfície sem o contato direto com o produto, e, na terceira coleta, o patógeno foi isolado das mãos dos manipuladores (M2) desta mesma seção (Tabela 25).

O perfil combinado **G31** esteve presente na segunda e terceira coletas na Planta A (Tabela 25). O microrganismo foi isolado de superfícies de contato com o produto na

sala de cortes – tábua de cortes (E6 - segunda coleta), luvas de aço (E11 - segunda e terceira coletas) e de superfície sem contato com produto – calha de respingo na evisceração (S9 - terceira coleta) e esteira de entrada no túnel de congelamento (S15 - segunda coleta).

Isolou-se o perfil genético **G46**, na segunda e quarta coletas, na Planta A, como pode-se observar na Tabela 25. Na segunda coleta foi isolado dos monoblocos brancos limpos (E12) da sala de cortes e, na terceira coleta, na entrada do túnel de congelamento (S15).

Na Planta M, de onde obteve-se 41 perfis genéticos combinados restritos a ela, nota-se a presença de quatro perfis (**G5**, **G6**, **G48** e **G90**) distribuídos pela linha de processamento, mas também restritos à zona limpa do matadouro.

O perfil combinado **G5** foi isolado das mãos dos manipuladores (M2) da sala de cortes, na primeira coleta, e em cortes resfriados (P5) coletados nesta mesma sala, na terceira coleta.

Nas três primeiras coletas (Tabela 25) na Planta M isolaram-se cepas com perfil **G6** de *L. monocytogenes* de produtos: cortes resfriados (P5), dorso (P6) e cortes congelados (P8), na primeira, segunda e terceira coletas, respectivamente. O mesmo perfil também foi isolado das mãos dos manipuladores da sala de cortes (M2), na primeira coleta, e daqueles da seção de CMS (M3), segunda coleta. Superfícies de contato com o produto na sala de cortes – tábuas de cortes (E6), primeira coleta, luvas de aço (E11) e utensílio de coleta de CMS (E16), na terceira coleta, também apresentaram cepas de *L. monocytogenes* com este perfil.

Tabela 25 – Distribuição dos grupos genéticos obtidos pela análise composta dos perfis obtidos pela PFGE, após digestão com as enzimas AscI e ApaI, nas cepas de *L. monocytogenes* isoladas nos dois matadouros frigoríficos, um com evisceração automática (Planta A) e outro com evisceração manual (Planta M). Cores iguais foram usadas para representar os mesmos grupos.

Etapas do processamento	Perfis combinados (G)*							
	Planta A (coletas)				Planta M (coletas)			
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
Depenagem								
Superfície sem contato com produto				62				
Evisceração								
Superfície de contato com produto	16-17-18							92
Superfície sem contato com produto	43		13-31-36	47				28-29-94
Produtos		59	35	61-63-98				11-12-64
Água			26					
Mãos manipuladores	42			38-39				
Sala cortes								
Superfície de contato com produto	17-19-50-74-75-104	13-20-31-46-72	3-4-31-34-37-73	97	6-76-80-83-88-89-99-102		6-55-56	10-49-85-92-93-95
Superfície sem contato com produto	17-21-33	20-21-22-69-100	36	15-40-45-67	90-96		55	48-79-92
Produtos	103		36		6		5-48	87
Mãos manipuladores	25	1-2-24-27	21-23-30-32	68	5-6		7	
CMS								
Superfície de contato com produto			101	97	77-89-90		6	58-59-78-86
Superfície sem contato com produto	54	13		67	59	59		59
Produtos		71	84-96			6-65-66		59-82-87-94
Mãos manipuladores			70	70	52	6		
Congelamento								
Superfície sem contato com produto	51	31		41-44-46	60	8	13-14-53-59-90	81
Armazenamento								
Produtos			9-73	55-57		91	6	

* Consultar a Tabela 24 para identificação dos perfis combinados.

Na terceira e quarta coletas, o perfil genético **G48** foi isolado de cortes resfriados de frango (P5) e na calha de respingo (S9) da sala de cortes, ponto este sem contato com o produto (Tabela 25).

O perfil genético **G90** foi isolado de superfícies sem o contato com o produto – chairas (S11 - primeira coleta) e carrinho para congelamento (S14 - terceira coleta), e em superfície de contato - esteira transportadora de dorsos para CMS (E13 - primeira coleta).

Quatro perfis genéticos (**G13**, **G55**, **G59** e **G96**) estavam presentes em ambas as plantas estudadas e foram isolados de diversas categorias amostradas, exceto das mãos dos manipuladores.

O perfil genético **G13** foi isolado na Planta A na seção de evisceração, de uma superfície onde não ocorre o contato com o produto – calha de respingo (S6), na terceira coleta. Nesta planta, o mesmo perfil foi isolado, na segunda coleta, de superfícies de contato com o produto na sala de cortes – luvas de aço (E11) e monoblocos brancos (E12), e de superfície sem contato com o produto, na seção de CMS – piso (S13). Já na Planta M, o perfil **G13** foi isolado na terceira coleta, de carrinhos que levam os produtos para o túnel de congelamento (S14) (Tabela 25).

Na quarta coleta da Planta A isolou-se o perfil **G55** de cortes congelados (P8); da Planta M este perfil foi isolado do piso da sala de cortes (S7) e em monoblocos brancos (E12), apenas na terceira coleta.

O perfil genético **G59** esteve presente na Planta M nas quatro coletas, estando presente na primeira, segunda e quarta coletas em superfícies sem contato com o produto – piso da seção de CMS (S13), na terceira coleta, no carrinho do túnel de congelamento (S14), e, na quarta coleta, na esteira transportadora de dorsos (E13) para a máquina de CMS; nesta coleta também foi isolado de dorsos (P6) encaminhados para

produção de CMS. Na Planta A, o mesmo perfil foi isolado na seção de evisceração de carcaça resfriada (P4), imediatamente após o *chiller*.

O outro perfil comum às duas plantas, **G96**, foi isolado de CMS (P7), na Planta A, e de superfície sem contato com produto – chairas (S11), na Planta M, na terceira e primeira coletas, respectivamente.

Os perfis combinados G17, G36, G73 e G97, da Planta A, e o perfil G89 da Planta M, são exemplos da presença de cepas transitórias nestes dois matadouros. Estes perfis foram detectados em mais de um ponto, mas apenas em uma coleta.

A constatação do isolamento repetido de cepas com o mesmo perfil genético sugere que estas podem estar colonizando uma determinada superfície na planta processadora e que sua disseminação pode estar sendo realizada durante o processamento e/ou durante a higienização.

Os funcionários, ou apenas um deles, podem estar continuamente se contaminando com um determinado perfil genético, se tornando, desta forma, uma fonte de contaminação em potencial. Exemplo disto pode ser observado para os perfis combinados **G5** e **G6**, da Planta M, e **G21**, da Planta A, já que cepas com estes perfis foram isoladas em mãos de manipuladores, superfícies de contato com o produto e de produtos. Estes perfis estavam restritos às respectivas plantas.

A persistência da presença de cepas com mesmo perfil genético, por exemplo o **G59** na Planta M, mesmo havendo um período de dez meses entre as coletas, indica que há colonização do ambiente por cepas de *L. monocytogenes* deste perfil. A presença de cepas persistentes deste perfil no piso da seção de CMS, mesmo após o intervalo de dez meses, indica que o processo de higienização desta seção está inadequado, precisando ser melhorado.

Lundén *et al.* (2000) consideram cepas persistentes as que são isoladas no ambiente, equipamento e/ou produtos em uma planta processadora, repetidamente durante

meses ou anos. Estes pesquisadores já isolaram cepas persistentes em planta processadora de aves ao longo de dois anos e em planta processadora de sorvete por sete anos.

Na Figura 18 tem-se o dendrograma indicando a relação genética entre os isolados de *L. monocytogenes* avaliados, levando-se em consideração os resultados obtidos com as duas enzimas e a PFGE. Informações sobre o sorotipo (conforme Tabela 22) também são apresentadas. Nota-se claramente que as cepas de *Listeria* de outras espécies ficaram em grupos sem relação genética (grupo I) com *L. monocytogenes*. O grupo II, formado pelas cepas de *L. monocytogenes*, ficou dividido em três *clusters*: A, B e C.

O *cluster* A pode ser dividido em quatro grupos (A₁, A₂, A₃ e A₄), sendo que ao grupo A₁ pertencem somente cepas do sorogrupo 1 (sorotipos 1/2a ou 3a). No grupo A₂ estão agrupadas todas as cepas do sorogrupo 2 (sorotipos 1/2c ou 3c), além de uma cepa do sorogrupo 1. Os grupos A₃ e A₄ são formados por cepas dos sorogrupo 1. As cepas pertencentes ao grupo A₃ são provenientes da Planta M, da terceira e quarta coletas, e as do grupo A₄ da Planta A, primeira, segunda e quarta coletas.

Observa-se que o *cluster* B também é composto por cepas do sorogrupo 1. Este *cluster* pode ser subdividido em dois grupos: B₁ e B₂. A este *cluster* pertencem 96% das cepas de *L. monocytogenes* que apresentaram reação negativa de hemólise.

O *cluster* C também pode ser dividido em dois grupos: C₁ e C₂, sendo que a este último pertence somente uma cepa de *Listeria* spp. O grupo C₁ reúne todas as cepas do sorogrupo 4 (4b, 4d ou 4e), as cinco cepas pertencentes ao sorogrupo 3 (1/2b, 3b ou 7) e pode ser subdividido em C_{1a}, C_{1b} e C_{1c}.

C_{1a} apresenta dois ramos (R₁ e R₂), sendo que ao R₁ pertencem todas as 29 cepas que apresentaram a banda extra na sorotipagem molecular (Figura 14 e Tabela 23). Estas cepas, pela sorologia convencional, mostraram ser do sorotipo 4b, sendo o grau de similaridade entre elas de aproximadamente 90%. As cinco cepas do sorogrupo 3 também pertencem a este ramo, porém apresentam menor similaridade com as anteriores. No segundo ramo (R₂) estão agrupadas cepas isoladas da Planta A, de uma única coleta, pertencentes ao sorogrupo 4, sendo que dentre estas estão as cinco cepas resistentes aos antibióticos eritromicina, cloranfenicol e clindamicina.

Já ao grupo C_{1c} pertencem apenas cepas isoladas nas quatro coletas da Planta A, sendo todas pertencentes ao sorogrupo 4.

Algumas hipóteses foram levantadas para explicar a presença de cepas de um mesmo perfil genético nestes dois matadouros estudados: para alguns casos, fica a sugestão de futuros estudos neste contexto.

Pode-se supor que a ração poderia ser a fonte de contaminação por cepas pertencentes aos perfis genéticos (G13, G55, G59 e G96) comuns às plantas, mas parece pouco provável que as empresas adquiram insumos de um mesmo fornecedor, pois toda a ração utilizada é, em ambas as empresas, produzida em fábrica própria. Outra consideração é a distância entre os matadouros analisados, aproximadamente 330 Km entre si. Fenlon *et al.* (1996), no Reino Unido, também isolaram cepas de *L. monocytogenes* com pulsotipos iguais em produtos de dois matadouros distantes 300 km e também não puderam identificar a fonte. Como não foi detectada a presença da *L. monocytogenes* nas gaiolas sujas que fizeram o transporte das aves vivas, isto pode ser uma forte indicação

de que o patógeno não estava presente no trato intestinal das aves abatidas, ou seu isolamento foi dificultado pela microbiota presente.

Outra hipótese seria a rotatividade entre os trabalhadores dos matadouros que poderiam disseminar as cepas pelas plantas. Porém, esta hipótese não parece provável, pois além da distância entre as mesmas, há diferença com relação ao gênero dos trabalhadores. Enquanto na Planta M trabalham somente homens, na Planta A há grande número de mulheres executando as tarefas. Além disto, os perfis genéticos comuns às plantas não foram isolados das mãos dos manipuladores.

Se as empresas não possuísssem incubatórios próprios, poder-se-ia sugerir que outra possível fonte de contaminação seria o fornecedor de pintinhos de um dia.

Analisando na Geórgia (EUA) a presença da *L. monocytogenes* em uma cadeia integrada de produção de aves, coletando amostras desde as cascas dos ovos eclodidos até a água de lavagem do frango inteiro e parte do ceco das aves dentro de um matadouro, Cox *et al.* (1997) concluíram que a entrada do patógeno no matadouro não é comumente causada pelas aves vivas. Eles afirmam que o microrganismo que coloniza a planta processadora pode causar contaminação cruzada durante o processo, mas não indicam a fonte inicial da contaminação na indústria.

A comercialização de equipamentos usados entre as empresas, que pode ser uma forma de transferência de cepas de tipos genéticos semelhantes, conforme verificada por Lundén *et al.* (2004), não parece provável neste caso. Ambas empresas têm política de não aquisição de equipamentos pré-utilizados.

Uma das formas de se explicar a persistência de *L. monocytogenes* no ambiente está relacionada com sua capacidade em formar biofilmes. As células presentes no biofilme têm maior capacidade de resistir ao processo de higienização, além disto, têm grande potencial de se liberar para o ambiente, provocando, desta maneira, a

contaminação contínua dos produtos que entram em contato com a superfície colonizada (MOLTZ e MARTIN, 2005; TOMPKIN, 2002).

O desenvolvimento de “estratégias” para a sobrevivência de *L. monocytogenes* ao longo do processamento de alimentos, se adaptando aos parâmetros ambientais – baixa atividade de água, pH baixo e baixas temperaturas, confere a este patógeno vantagem sobre outros microrganismos. Bagge-Ravn *et al.* (2003), na Dinamarca, analisando amostras coletadas de superfícies de contato e de não contato com o produto durante o processamento de salmão defumado, e após a higienização, verificaram que *L. monocytogenes* foi isolada apenas nos locais de difícil higienização, como nos ralos. Wagner *et al.* (2004) também destacam que o patógeno tem preferência por áreas onde a higienização não é suficiente para eliminá-lo. Os pesquisadores concluem que a capacidade de colonização da planta também é determinada pelo tipo de *Listeria* presente, pois algumas cepas se aderem melhor a superfícies abióticas do que outras. Por outro lado, Lundén *et al.* (2002) verificaram a persistência de cepas de *L. monocytogenes* com mesmo perfil genético em superfície de contato com produto e verificaram que todos os isolados persistentes eram provenientes de áreas com bons padrões higiênicos.

Chasseignaux *et al.* (2002) analisaram o comportamento da *L. monocytogenes* em superfícies de contato e sem contato de plantas processadoras de carne de aves e de carne suína, durante o processamento e após a higienização, e concluíram que a presença de resíduos orgânicos, pH neutro, baixas temperaturas e alta umidade estão associados à contaminação por *L. monocytogenes*.

Não se encontrou estudo empregando a biologia molecular para avaliar a disseminação de cepas de patógenos, especificamente de *L. monocytogenes*, em plantas

processadoras de aves, como realizado neste trabalho. Os estudos existentes tratam apenas da detecção da presença ou ausência de *L. monocytogenes* nos diferentes pontos da cadeia produtiva. Alguns estudos avaliam o perfil genético dos isolados, porém foram realizados em plantas processadoras de produtos industrializados (BERRANG *et al.*, 2002; LAWRENCE e GILMOUR, 1995) ou em produtos adquiridos no comércio (PRAAKLE-AMIN *et al.*, 2006).

A presença de mesmo perfil genético ao longo da linha de processamento, tanto em equipamentos e utensílios, como nas mãos dos manipuladores e nos produtos (cortes resfriados e congelados), como por exemplo **G6** (Tabela 25) na Planta M, sugere que *L. monocytogenes* possa colonizar toda a planta processadora e ainda contaminar o produto final, corroborando dados encontrados em estudos anteriores. Isto foi também observado para os perfis **G55** e **G73**. Lawrence e Gilmour (1995) encontraram, na Inglaterra, *L. monocytogenes* em amostras ambientais coletadas na área de processamento de produtos cozidos e nos produtos, ao longo de um ano, evidenciando que cepas do patógeno podem colonizar a planta processadora causando contaminação cruzada.

Berrang *et al.* (2002) verificaram que vários tipos genéticos de *L. monocytogenes* podem colonizar uma planta processadora de aves, pois, no período de um ano, foi possível a detecção dos mesmos pulsotipos na linha de processamento. Os autores verificaram ainda que, além da colonização da planta, os microrganismos podem ser transferidos para o produto cozido.

Fenlon *et al.* (1996) concluíram haver evidências de que cepas de *L. monocytogenes* isoladas de produtos processados tenham chegado até estes por meio do ambiente, e não pela matéria-prima. As cepas de *L. monocytogenes* se aderem e se adaptam ao ambiente das plantas processadoras e são disseminadas aos alimentos disponibilizados ao

consumidor. Isto pode ser explicado pela grande capacidade que a *L. monocytogenes* tem de formar biofilmes, e as células planctônicas, aderidas à superfície, se tornarem mais resistentes aos sanitizantes.

Fica evidente a necessidade de implantação de ferramentas que assegurem o controle microbiológico nas linhas de processamento avaliadas e, como consequência, no produto acabado. Entretanto, a Planta A merece mais atenção, uma vez que apresentou maior número de amostras positivas para *L. monocytogenes* e maior diversidade genética dos isolados, além de maior frequência de cepas do sorogrupo 4b. Uma hipótese a considerar, nesta planta, é o maior volume de aves abatidas por turno e, conseqüentemente, a maior quantidade de funcionários, principalmente na sala de cortes. A maior contaminação/variedade de perfis pode ser decorrente de falhas da higienização do ambiente, que é realizada por funcionários da própria empresa. Apesar de não se ter tido acesso ao controle de treinamento de funcionários de ambas as plantas, fica evidenciada a necessidade de educação continuada para estes no que se refere a boas práticas.

Apesar de se ter detectado *L. monocytogenes* nos produtos finais examinados, estes achados *per se* não indicam risco direto à saúde do consumidor, uma vez que estes produtos ainda serão submetidos ao tratamento térmico. Entretanto, a manipulação destes alimentos por estes consumidores deve ser adequada, obedecendo a regras básicas de higiene que podem minimizar riscos de contaminação cruzada.

Segundo o *International Life Sciences Institute Research Foundation* (2005), algumas estratégias devem ser implantadas nas plantas processadoras de produtos prontos para o consumo visando controlar o alto risco da *L. monocytogenes*: i) boas práticas de fabricação, implantando os procedimentos operacionais padrão e a análise de perigos e pontos críticos de controle, objetivando minimizar a contaminação ambiental e a contaminação cruzada; ii) programa de amostragem de superfícies e ações corretivas

efetivas; iii) controle da data de fabricação e da temperatura em toda a cadeia do frio; e iv) quando possível, a utilização de tratamento pós-embalagem.

Neste estudo verificou-se que a presença da *L. monocytogenes* é mais freqüente na zona limpa dos matadouros. As seções limpas e com ambiente refrigerado foram os locais com o maior índice de isolamento do patógeno, onde se localizou a maior diversidade genética. Resultados semelhantes foram encontrados por Sakate (2005) avaliando matadouros frigoríficos de bovinos aqui no Brasil.

Mesmo numa planta processadora de produtos industrializados com sistema de higienização de ambiente e treinamento de funcionários bem implantados podem ocorrer problemas como a presença de cepas persistentes. Deve-se ainda considerar a importância da matéria-prima servindo como fonte de entrada do patógeno na linha de processamento. Este fato foi comprovado por Andrigheto (2000), nas cepas isoladas por Rodrigues *et al.* (2002) em uma planta processadora de ‘nuggets’ de frango no Estado de São Paulo.

Outro fato importante a ser lembrado, ao menos pelas indústrias exportadoras, é a política de tolerância zero a *L. monocytogenes* em produtos prontos para o consumo, implantada em alguns países. Rodrigues *et al.* (2002) verificaram que 100% das amostras de ‘nuggets’ examinadas apresentaram *L. monocytogenes*.

A maior freqüência de isolamento de *L. monocytogenes* na Planta A, com evisceração automática, pode estar relacionada com o menor espaço físico desta planta se comparado à Planta M. A seção de evisceração é menos espaçosa devido aos equipamentos, o que pode dificultar a higienização da mesma. O mesmo ocorre na sala de cortes, onde as esteira transportadoras de produtos são mais próximas umas das outras e das paredes.

Os resultados deste estudo indicam que as aves, nestes dois matadouros frigoríficos avaliados, não parecem ser a fonte de contaminação dos produtos e/ou do ambiente. A principal contaminação parece ter tido origem no ambiente, superfícies de contato e não contato com o produto. Os perfis genéticos presentes nas diversas superfícies das Plantas A e M podem apresentar características especiais que os permitem sobreviver por mais tempo em ambientes específicos.

5. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos e na discussão apresentada pode-se concluir que:

- ✓ *L. monocytogenes* esteve presente em todas as categorias de amostras da zona limpa dos matadouros, mas foi mais freqüente em amostras do matadouro com evisceração automatizada.
- ✓ As cepas provenientes do matadouro automatizado apresentaram maior diversidade genética que as do matadouro com evisceração manual.
- ✓ Há pulsotipos com maior disseminação em uma das plantas, mas estes também estão presentes na outra. Outros pulsotipos, apesar de muito disseminados em uma das plantas, não foram isolados na outra.
- ✓ A carne mecanicamente separada pode ser considerada como um veículo importante de *L. monocytogenes* para linhas de produção de alimentos industrializados.
- ✓ A ocorrência de cepas de *L. monocytogenes* com características feno e genotipicamente não convencionais pode levar à identificação errônea dos isolados.

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. **Journal of Food Protection**, v.66, n.2, p.249-255, 2003.

ABUÍN, C.M.F.; FERNÁNDEZ, E.J.Q.; SAMPAYO, C.F.; OTERO, J.L.R.; RODRÍGUEZ, L.D.; SÁEZ, A.C. Susceptibilities of *Listeria* species Isolated from food to nine antimicrobial agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.38, n.7, p.1655-1657, 1994.

ALLERBERGER, F.; DIERICH, M.; PETRANYI, G.; LALIC, M.; BUBERT, A. Nonhemolytic strains of *Listeria monocytogenes* detected in milk products using VIDAS immunoassay kit. **Zentralblatt fuer Hygiene und Umweltmedizin**, v.200, n.2/3, p.189-195, 1997.

ANDRIGHETO, C. **Disseminação da *Listeria monocytogenes* em uma linha de produção de “nuggets” congelados de frango**. São Paulo, 2000. 51p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

ANTUNES, P.; RÉU, C.; SOUSA, J.C.; PESTANA, N.; PEIXE, L. Incidence and susceptibility to antimicrobial agents of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* isolated from poultry carcasses in Porto, Portugal. **Journal of Food Protection**, v.65, n.12, p.1888-1893, 2002.

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. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22, Florianópolis, 2003. **Anais**. Florianópolis, 2003. CD-ROM.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE FRANGO. Estatísticas. Mercado Interno. Histórico. Produção. **Produção brasileira de carne de frango**. Disponível em: http://www.abef.com.br/Relatorios_Anuais/Rel2005.asp. Acesso em: 26 fev. 2007.

AUTIO, T.; LUNDÉN, J.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; BJÖRKROTH, J.; SJÖBERG, A.; KOEKEALA, H. Similar *Listeria monocytogenes* pulsotypes detected in several foods originating from different sources. **International Journal of Food Microbiology**, v.77, p.83-90, 2002.

BAGGE-RAVN, D.; GARDSHODN, K.; GRAM, L.; VOGEL, B.F. Comparison of sodium hypochlorite-based foam and peroxyacetic acid-based fog sanitizing procedures in a salmon smokehouse: survival of the general microflora and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.66, n.4, p.592-598, 2003.

BAILEY, J.S.; FLETCHER, D.L.; COX, N.A. Recovery and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* from broiler chickens in the Southeastern United States. **Journal of Food Protection**, v.52, n.3, p.148-150, 1989.

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

BARNES, R.; ARCHER, P.; STRACK, J.; ISTRE, G.R. Listeriosis associated with consumption of turkey franks. **MMWR: Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.38, n.15, p.267-268, 1989.

BAUER, A.W.; KIRBY, M.M.W.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.

BERMUDEZ, L.E.; VELASCO, E.; CARRIÇO, M.K.S.; PANZA, M.; VIDAL, E. Meningite por *Listeria monocytogenes* em caso de doença de Hodgkin. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.30, p.29-32, 1984.

BERRANG, M.E.; MEINERSMANN, R.J.; NORTHCUTT, J.K.; SMITH, D.P. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from a poultry further processing facility and from fully cooked product. **Journal of Food Protection**, v.65, n.10, p.1574-1579, 2002.

BERRANG, M.E.; MEINERSMANN, R.J.; FRANK, J.F.; SMITH, D.P.; GENZLINGER, L.L. Distribution of *Listeria monocytogenes* subtypes within a poultry further processing plant. **Journal of Food Protection**, v.68, n.5, p.980-985, 2005.

BERSANI, G.; MIONI, R. Presenza di *Listeria monocytogenes* in alimenti di origine animale. **Industria Alimentara**, v.30, p.735-737, 1991.

BERSOT, L.S. **Frequência de *Listeria monocytogenes* em mortadelas e comportamento durante o processamento industrial e estocagem**. São Paulo, 2000. 66p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

BERSOT, L.S.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T. Production of mortadella: behavior of *Listeria monocytogenes* under commercial manufacturing and storage conditions. **Meat Science**, v.57, n.1, p.13-17, 2001.

BORUCK, M.K.; CALL, D.R. *L. monocytogenes* serotype identification by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.5537-5540, 2003.

BORUCK, 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. **Journal of Food Protection**, v.67, n.11, p.2496-2499, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Estatísticas. Agricultura Brasileira em Números – Anuário 2005. Produtos selecionados da agropecuária. Pecuária: rebanho, abate, produção de carnes e de leite. Aves. 2007 Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/ESTATISTICAS/AGRICULTURA_EM_NUMEROS_2005/04.03.XLS. Acesso em: 26 fev. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Legislação. SisLegis – Sistema de Consulta a Legislação. **Portaria n.210, de 10 de novembro de 1998.** Aprova o Regulamento Técnico de Inspeção, Tecnologia e Higienico-Sanitário de Carne de Aves. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=3162>. Acesso em: 20 jun. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Legislação. SisLegis – Sistema de Consulta a Legislação. **Instrução Normativa n.4, de 31 de março de 2000.** Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de carne mecanicamente separada, de mortadela, de lingüiça e de salsicha. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7778>. Acesso em: 28 dez. 2006.

BRUHN, J.B.; VOGEL, B.F.; GRAM, L. Bias in the *Listeria monocytogenes* enrichment procedure: lineage 2 strains outcompete lineage 1 strains in university of vermont selective enrichments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.2, p.961-967, 2005.

BUENAVENTURA, E.; JIWANI, Z.; LIU, J. Simultaneous identification of the genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes* using a multiplex polymerase chain reaction (PCR) based on the 16S rRNA sequence and the *hlyA* listeriolysin gene. 2005. [comunicação pessoal].

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

CAPITA, R.; PRIETO, M.; ALONSO-CALLEJA, C. Sampling methods for microbiological analysis of red meat and poultry carcasses. **Journal of Food Protection**, v.67, n.6, p.1303-1308, 2004. CHARLTON, B.R.; KINDE, H.; JENSEN, L.H. Environmental survey for *Listeria* species in California milk processing plants. **Journal of Food Protection**, v.53, n.3, p.198-201, 1990.

CHASSEIGNAUX, E.; TOQUIN, M.T.; RAGIMBEAU, C.; SALVAT, G.; COLIN, P.; ERMEL, G. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from the environment, raw meat and raw products in two poultry- and pork-processing plants. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, n.5, p.888-899, 2001.

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

COX, N.A.; BAILEY, J.S.; BERRANG, M.E. The Presence of *Listeria monocytogenes* in the Integrated Poultry Industry. **Applied Poultry Science**. v.6, fasc.1, p.116-119, 1997.

DESTRO, M.T.; LEITÃO, M.F.F.; FARBER, J.M. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.2, p.705-711, 1996.

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

DOUMITH, M.; CAZALET, C.; SIMOES, N.; FRANGEUL, L.; JACQUET, C.; KUNST, F.; MARTIN, P.; COSSART, P.; GLASER, P.; BUCHRIESER, C. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. **Infection and Immunity**, v.72, n.2, p.1072-1083, 2004b.

DOUMITH, M.; JACQUET, C.; GERNER-SMIDT, P.; GRAVES, L.M.; LONCAREV, S.; MATHISEN, T.; MORVAN, A.; SALCEDO, C.; TORPDAHL, M.; VAZQUEZ, J.A.; MARTIN, P. Multicenter validation of a multiplex PCR assay for differentiating the major *Listeria monocytogenes* serovars 1/2a, 1/2b, 1/2c, and 4b: toward an international standard. **Journal of Food Protection**, v.68, n.12, p.2648-2650, 2005.

EWERT, D.P.; LIEB, L.; HAYES, P.S.; REEVES, M.W.; MASCOLA, L. *Listeria monocytogenes* infection and serotype distribution among HIV – infected persons in Los Angeles country, 1985-1992. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, v.8, n.5, p.461-465, 1995.

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

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

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

FRANCO, C.M.; QUINTO, E.J.; FENTE, C.; RODRIGUES-OTERO, J.L.; DOMINGUEZ, L.; CEPEDA, A. Determination of the principal sources of *Listeria* sp contamination in poultry meat and poultry processing plant. **Journal of Food Protection**, v.58, n.12, p.1320-1325, 1995.

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

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

GILLESPIE, I.A.; MCLAUCHLIN, J.; GRANT, K.A.; LITTLE, C.L.; MITHANI, V.; PENMAN, C.; LANE, C.; REGANT, M. Changing Pattern of Human Listeriosis, England and Wales, 2001-2004. **Emerging Infections Diseases**. v.12, n.9. Disponível em: www.cdc.gov/eid. Acesso em: 18 jan.2007.

GRAVANI, R.B. Bacterial foodborne diseases. **Dairy and Food Sanitation**, v.7, n.3, p.137-141, 1987.

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

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 Microbiology**, v.21, p.305-312, 2004.

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.

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

HUNTER, S.B.; VAUTERIN, P.; LAMBERT-FAIR, M.A.; DUYNE, M.S.V.; KUBOTA, K.; GRAVES, L.; WRIGLEY, D.; BARRETT, T.; RIBOT, E. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.3, p.1045-1050, 2005.

INTERNATIONAL Life Sciences Institute Research Foundation. Achieving continuous improvement in reduction in foodborne listeriosis: a risk-based approach. **Journal of Food Protection**, v.68, n.9, p.1932-1994, 2005.

JAY, J.M. **Modern food microbiology**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. p.485-505. (Aspen food science text series).

JINNEMAN, K.C.; HILL, W.E. *Listeria monocytogenes* lineage group classification by MAMA-PCR of the listeriolysin gene. **Current Microbiology**, v.43, n.2, p.129-133, 2001.

KABUKI, D.Y. **Contagem de *Listeria* spp pelo método do Número Mais Provável (NMP), avaliação da sua ocorrência em carnes de frango e da eficiência de sanitizantes na redução da contaminação por *Listeria monocytogenes***. Campinas, 1997. 91p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas.

KACZMARSKI, E.B.; JONES, D.M. Listeriosis and ready-cooked chicken. **Lancet**, v.1, n.8637, p.549, 1989.

KLAUSNER, R.B.; DONNELLY, C.W. Environmental sources of *Listeria* and *Yersinia* in Vermont dairy plants. **Journal of Food Protection**, v.54, n.8, p.607-611, 1991.

LANDGRAF, I.M.; KOBATA, A.M.M.; JAKABI, M.; KIRSCHBAUM, C.R.A.; MARCHI, C.R. Surto de meningite por *Listeria monocytogenes*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, 58, n.1, p.63-67, 1999.

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

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

LEE, R.M. *Listeria hysteria*. Control of *Lm* on RTE Meat Products. Disponível em: www.uoquelpq.ca/crifs/%20Symposium%202005/Presentations. Acesso em: 18 jan. 2007.

LEMES-MARQUES, E.G.; CRUZ, C.D.; DESTRO, M.T. Pheno- and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates from the southwestern region of the state of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. 2007. [no prelo].

LONCAREVIC, S.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M.L. Occurrence of *Listeria* species in broiler pre- and post-chilling in chlorinated water at two slaughterhouses. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.35, n.2, p.149-154, 1994.

LUNDÉN, J.M.; MIETTINEN, M.K.; AUTIO, T.J.; KORKEALA, H.J. Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. **Journal of Food Protection**, v.63, n.9, p.1204-1207, 2000.

LUNDÉN, J.M.; AUTIO, T.J.; KORKEALA, H.J. Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. **Journal of Food Protection**, v.65, n.7, p.1129-1133, 2002.

LUNDÉN, J.M.; AUTIO, T.J.; SJOBERG, A.M.; KORKEALA, H.J. Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. **Journal of Food Protection**, v.66, n.11, p.2062-2069, 2003.

LUNDÉN, J.M.; KORKEALA, H.J. Persistent *Listeria monocytogenes* plant contamination. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PROBLEMS OF LISTERIOSIS, 15, Uppsala, 2004. **Abstracts**. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 2004. n.142.

MAYRHOFER, S.; PAULSEN, P.; SMULDERS, F.J.M.; HILBERT, F. Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. **International Journal of Food Microbiology**, v.97, p.23-29, 2004.

MIETTINEN, M.K.; PALMU, L.; BJÖRKROTH, K.J.; KORKEALA, H. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in broilers at the abattoir, processing plant, and retail level. **Journal of Food Protection**, v.64, n.7, p.994-999, 2001.

MOLTZ, A.G.; MARTIN, S.E. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. **Journal of Food Protection**, v.68, n.1, p.92-97, 2005.

MORETTI, P.E. Projeto microrganismos, Seção 9 – Métodos em Microbiologia, Parte 2 – Bacteriologia. Ribotipagem, 31/01/2006. Disponível em: http://fam.br/microrganismos/metodo_ribotipagem.htm. Acesso em: 24 jun. 2006.

NUNES, I.A. **Bacterias do gênero *Listeria* em carcaças e cortes comerciais de frango obtidos no varejo, avaliação da eficiência de meios para isolamento e variantes da técnica**. Jaboticabal, 1994. 108p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Agrárias – Universidade Estadual Paulista.

- OJENIYI, B.; WEGENER, H.C.; JENSEN, N.E.; BISGAARD, M. *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products: epidemiological investigations in seven Danish abattoirs. **Journal of Applied Bacteriology**, v.80, n.4, p.395-401, 1996.
- PAGOTTO, F.; DALEY, E.; FARBER, J.; Warburton, D. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. In: HEALTH CANADA. Food & Nutrition. Research Programs & Analytical Methods. Analytical Methods. Microbiological Methods. Compendium of Analytical Methods. v.3. Appendix K: *Listeria ssp. and L. monocytogenes*. Isolation and Identification. **MFHPB-30** (janeiro 2001). Disponível em: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume2/mfhp30-01_e.html. Acesso em: 03 ago. 2005.
- PAGOTTO, F.; CORNEAU, N.; FARBER, J. *Listeria monocytogenes* infections In: RIEMANN, H.; CLIVER, D., eds. **Food-borne infections and intoxications**. 3.ed. New York, London: Academic Press, 2006. cap.9, p.313-340.
- PATERSON, J.S. Antigenic structure of organisms of the genus *Listerella*. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v.51, p.427-436, 1940.
- PATON, J.H.; HOLT, H.A.; BYWATER, M.J. Measurement of MICs of antibacterial agents by spiral gradient endpoint compared with conventional dilution method. **International Journal of Experimental and Clinical Chemotherapy**, v.3, n.1, p.31-38, 1990.
- PERRIN, M.; BEMER, M.; DELAMARE, C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology** v.41, n.11, p.5308-5309, 2003.
- PINI, P.N.; GILBERT, R.J. The occurrence in the UK of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v.6, p.317-326, 1988.
- PRAAKLE-AMIN, K.; HÄNNINEN, M.; KORKEALA, H. Prevalence and genetic characterization of *Listeria monocytogenes* in retail broiler meat in Estonia. **Journal of Food Protection**, v.69, n.2, p.436-440, 2006.
- PRITCHARD, T.J.; FLANDERS, K.J.; DONNELLY, C.W. Comparison of the incidence of *Listeria* on equipment versus environmental sites within dairy processing plants. **International Journal of Food Microbiology**, v.26, n.3, p.375-384, 1995.
- RAMOS, A.M.; WESLEY, I.V.; DICKSON, J.M. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in mechanically separated turkey meat. In: IOWA STATE UNIVERSITY. Food, Nutrition and Health. Food. Safety. More Articles on Safety. Food safety. Disponível em: <http://www.extension.iastate.edu/Pages/ansci/swinereports/asl-1608.pdf>. Acesso em: 4 jan. 2006.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; SILVA, PENILDON. **Farmacologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 703p.
- REITER, M.G.R.; BUENO, C.M.M.; LÓPEZ, C.; JORDANO, R. Occurrence of *Campylobacter* and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing plant. **Journal of Food Protection**, v.68, n.9, p.1903-1906, 2005.

RODRIGUES, D.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T. Evaluation of two commercial methods for the detection of *Listeria* sp. e *Listeria monocytogenes* in a chicken nugget processing plant. **Canadian Journal of Microbiology**, v.48, n.3, p.275-278, 2002.

RØRVIK, L.M.; AASE, B.; ALVESTAD, T.; CAUGANT, D.A. Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in broilers and poultry products. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.633-640, 2003.

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

SAKATE, I.R.; 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 Nutrición**, v.53, n.2, p.184-187, 2003.

SAKATE, R.I. **Prevalência, epidemiologia, caracterização sorológica e molecular de *Listeria monocytogenes* isoladas na criação intensiva de novilhos superprecoces e em abatedouros frigoríficos no Estado de São Paulo**. São Paulo, 2005. 95p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

SALAMINA, G.; DALLE DONNE, E.; NICOLLINI, A.; PODA, G.; CESARONI, D.; BUCCI, M.; FINI, R.; MALDINI, M.; SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BIBB, N.; ROCOURT, J.; BIKIN, N.; SALMASO, S. A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. **Epidemiology and Infection**, v.117, n.3, p.429-436, 1996.

SCHLECH, W.F.; LAVIGNE, P.M.; BARTOLUSSI, R.A.; ALLEN, A.C.; HALDANE, E.V.; WORT, A.J.; HIGHTOWER, A.W.; JOHNSON, S.E.; KING, S.H.; NICHOLLS, E.S.; BROOME, C.V. Epidemic listeriosis evidence for transmission by food. **New England Journal of Medicine**, v.308, n.4, p.203-206, 1983.

SCHWARTZ, B.; BROOME, C.V.; BROWN, G.R.; HIGHTOWER, A.W.; CIESIELSKI, C.A.; GAVENTA, S.; GELLIN, B.G.; MASCOLA, L. Association os sporadic listeriosis with consumption of undercooked hot dogs and undercooked chicken. **Lancet**, v.2, n.8614, p.779-782, 1988.

SENCZEK, D.; STEPHAN, R.; UNTERMANN, F. Pulsed-field gel electrophoreis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from a meat processing plant over two-year period. **International Journal of Food Microbiology**, v.5, n.62, p.155-159, 2000.

SERDELIDIS, D.; ABRAHIM, A.; SARIMVEI, A.; PANOULIS, C.; KARAIOANNOGLOU, P.; GENIGEORGIS, C. Temperature distribution and prevalence of *Listeria* spp. in domestic, retail and industrial refrigerators in Greece. **International Journal of Food Microbiology**, v.34, n.2, p.134-137, 1997.

SERRA, M.S.; ASAMARA, T.C.; ESCOBAR, M.D.F. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat products in Barcelona (Spain). In: INTERNATIONAL CONFERENCE *LISTERIA* AND FOOD SAFETY, Laval, 1991. **Proceedings**. Laval: ASEPT, 1991. [Poster].

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

SOMER, L.; KASHI, Y. A PCR method based on 16S rRNA sequence for simultaneous detection of genus *Listeria* and species *Listeria monocytogenes* in food products. **Journal of Food Protection**, v.66, n.9, p.1658-1665, 2003.

STROM, M.S. Phenotypic and genotypic characterization of a non-hemolytic variant of *Listeria monocytogenes* from cold-smoked salmon. **Food Microbiology**, v.15, p.329-337, 1998.

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. **International Journal of Food Microbiology**, v.72, 137-146, 2002.

SWAMINATHAN, B.; DALTON, C.; MEAD, P.; HAYES, P.S.; BIBB, W.F.; SCHUCHAT, A. Update on listeriosis in the United States: shifting paradigms. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PROBLEMS OF LISTERIOSIS, 12, Perth, 1995. **Proceedings**. Perth: ISOPOL, 1995. p.489.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology** v.33, n.9, p.2233-2239, 1995.

TOMPKIN, R.B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. **Journal of Food Protection**, v.65, n.4, p.709-725, 2002.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Center for Disease Control and Prevention. Media Relations. **Multistate outbreak of listeriosis – United States**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/od/oc/media/pressrel/r990114.htm> Acesso em: 19 nov. 2002.

UNITED STATES. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test, padrão aprovado na 8ª edição, v.23, n.1, Janeiro 2003.

UNITED STATES. Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service. Science. Laboratories & Procedures. Guidebooks & Methods. Microbiology Laboratory Guidebook. **Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg and environmental samples**: 8.05. 2006. Disponível em: http://www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological_Lab_Guidebook/index.asp. Acesso em: 03 fev. 2006.

UNITED STATES. Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service. Recall Case Archive. Quantity Recovered by Case. Disponível em: http://www.fsis.usda.gov/FSIS_Recalls/Quantity_Recovered_by_Case_2006/index.asp Acesso em: 12 mar. 2007.

VAN NIEROP, W.; DUSÉ, A.G.; MARAIS, E.; AITHMA, N.; THOTHOBOLO, N.; KASSEL, M.; STEWART, R.; POTGIETER, A.; FERNANDES, B.; GALPIN, J.S.; BLOOMFIELD, S.F. Contamination of chicken carcasses in Gauteng, South Africa, by *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter*. **International Journal of Food Microbiology**, v.99, n.1, p.1-6, 2005.

VARABIOFF, Y. Incidence and recovery of *Listeria* from chicken with a pre-enrichment technique. **Journal of Food Protection**, v.53, n.7, p.555-557, 1990.

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

WAGNER, M.; AUER, B.; TRITTMEMMEL, C.; WINTER, P.; HEIN, I.; SCHODER, D. Survival along the foodchain: case *Listeria*. In: INTERNATIONAL ICMFH SYMPOSIUM FOOD MICRO, 19, Slovenia, 2004. **Anais**. Slovenia, 2004.

WALKER, R.L.; JENSEN, L.H.; KINDE, H.; ALEXANDER, A.V.; OWENS, L.S. Environmental survey for *Listeria* species in frozen milk product plant in California. **Journal of Food Protection**, v.54, n.3, p.178-182, 1991.

WHYTE, P.; MCGILL, K.; MONAHAN, C.; COLLINS, J.D. The effect of sampling time on the levels of micro-organisms recovered from broiler carcasses in a commercial slaughter plant. **Food Microbiology**, v.21, p.59-65, 2004.

ZHANG, W.; KNABEL, S.J. Multiplex PCR Assay simplifies serotyping and sequence typing of *Listeria monocytogenes* associated with human outbreaks. **Journal of Food Protection**, v.68, n.9, p.1907-1910, 2005.

7. Anexos

Anexo 1. Coleta de amostra em superfície de contato com o produto – monobloco branco (E12).

Anexo 2. Coleta de amostra em superfície de contato com o produto – tábua de corte de altileno (E6).

Anexo 3. Coleta de amostra em superfície de contato com o produto – faca (E8).

Anexo 4. Coleta de amostra em superfície de contato com o produto – ganchos para pendura das carcaças na sala de cortes (E9).

Anexo 5. Coleta de amostra em superfície sem contato com o produto – canaleta de drenagem (S5).

Anexo 6. Coleta de amostra em superfície sem contato com o produto – chaira (S11).

Anexo 7. Coleta de amostra de produto – frango após a saída do tanque de resfriamento (P4).

Anexo 8. Coleta de amostra de produto – cortes resfriados (P5).

Anexo 9. Identificação das cepas pertencentes aos ribogrupos (RiboPrinter[®], DuPont Qualcon) obtidos com as 210 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em dois matadouros de aves.

Ribogrupo	Identificação das cepas
DUP-1030	513-804-805-819
DUP-1038	330-342-343-401-410-411-412-413-414-423-424-621-622-631-632-634-635
DUP-1039	308-309-310-311-408-417-422-604-605-629-630-636-637-711-712-713-725-726-727-728
DUP-1044	301-302-303-304-305-306-307-315-316-317-318-319-321-322-323-324-325-326-328-329-335-336
DUP-1045	122-201-206-207-208-209-333-420-421-503-504-506-508-510-708-719-720-721-722-807-810-820-824-832
DUP-1046 ^b	822
DUP-1047	121-128-505
DUP-1051	425-426
DUP-1052	101-102-123-125-126-204-205-211-331-332-339-340-402-403-404-405-419-501-502-512-514-515-601-602-610-611-613-614-615-616-619-623-624-625-633-703-704-714-723-724-826-827
DUP-1053	106-118-119-511-801-802-803-806-808-811-813-817-818-821-828-829-830-834-838
DUP-1053 ^a	104-105-108-109-114-115-117-608-814
DUP-1062 ^c	626-728
DUP-16619	627
DUP-18596	312-313-334-350-409-709-715
DUP-18604	815-816
DUP-19169	103-107-110-111-112-116-120-210-337-416-702-809
DUP-19175	603-606-607
DUP-10180 ^b	831-833
DUP-19186	701
DUP-19187	202-203-406-407-418-507-509-516-620-628-705-706-707-710-716-717-812

^a Grupo muito semelhante ao outro ribogrupo DUP-1053.

^b Grupos semelhantes a grupos pré-existent no banco de dados.

^c Grupo considerado novo pelo *software* do equipamento.