UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Contaminação cruzada durante o fatiamento de produto cárneo pronto
para o consumo: foco em *Listeria monocytogenes*

Daniele Bezerra Faria

Dissertação para obtenção do título de Mestre.
Orientadora: Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy Melo Franco.

SÃO PAULO

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Contaminação cruzada durante o fatiamento de produto cárneo pronto
para o consumo: foco em *Listeria monocytogenes*

Daniele Bezerra Faria

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Dissertação para obtenção do título de mestre.
Orientadora: Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy Melo Franco.

São Paulo
2016

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

Faria, Daniele Bezerra
F224c Contaminação cruzada durante o fatiamento de produto cárneo pronto para o consumo: foco em *Listeria monocytogenes* / Daniele Bezerra Faria. -- São Paulo, 2016.
60p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Orientador: Franco, Bernadette Dora Gombossy Melo

1. Microbiologia de alimentos 2. Carne: Ciência dos alimentos
I. T. II. Franco, Bernadette Dora Gombossy Melo, orientador.

664.07 CDD

Daniele Bezerra Faria

Contaminação cruzada durante o fatiamento de produto cárneo pronto
para o consumo: foco em *Listeria monocytogenes*

Comissão julgadora
da
dissertação para obtenção do título de mestre

Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Mello Franco
Orientador/Presidente

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2016.

DEDICATÓRIA

Às minhas irmãs, Letícia e Natália, pelo apoio, carinho, compreensão, confiança.

Aos meus cunhados, Rodrigo e Gabriel, pelo carinho.

À minha cunhada Lavínia, pela experiência e convivência no mundo acadêmico.

Ao meu primo, Lucas Lizziê, pelo companheirismo e pelos momentos de alegria.

Aos meus pais, Aparecida e Faria, pelo amor e porque proporcionaram a construção desta carreira.

Aos meus gatos, Zé Pretinho e Frida, pelo amor dedicado.

Ao meu marido, Eduardo Magiolino, pelo amor, ajuda, companheirismo, plenitude, afeto e imensa paciência com esta dissertação.

AGRADECIMENTOS

À prof. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco, pela oportunidade deste trabalho, confiança, orientação e aprendizado.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão de bolsa de estudo (2014/14526-7) e pelo auxílio financeiro (2012/50535-5 e 2013/07914-8)

À professora Mariza Landgraf, pela oportunidade de aprendizado e pelo convívio.

Ao professor Uelinton Pinto, pelo convívio e oportunidade de aprendizado.

Aos professores Mariza Landgraf, Maristela da Silva do Nascimento e Uelinton Pinto, pelas sugestões e críticas no exame de qualificação.

Ao Dr. Ernesto Hofer, da Fundação Oswaldo Cruz do Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, pela cepa de *L. monocytogenes* cedida.

À Natacha Caballero e Juanma, pela amizade, companheirismo, compartilhamento de sua experiência no laboratório com pesquisa e por toda a ajuda durante os experimentos.

À Vanessa Bíscola, pela amizade, momentos de alegria durante o trabalho e companheirismo.

À Daniele Maffei, pela amizade, solidariedade dos conhecimentos referentes à Fapesp e ajuda durante a redação da dissertação.

Aos colegas Aline, Raquel, Érika, Janaína, Maria Crystina, Rúbia, Daniel, Milagros, Ximena, Marcela, Marina e Diogo, pela amizade e colaboração.

À Katia e Lúcia, pelo carinho, amizade, convívio e ajuda em todos os momentos.

À Mônica, Cleonice, Edilson e Roberta, da secretaria do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, pelos serviços prestados.

À Pesquisadora Dra. Ana Paula da Silva Camargo e ao Pesquisador Dr. Gabriel Constantino Blain (Instituto Agrônomo de Campinas), pela ajuda na parte estatística dessa dissertação.

À Cecília, Ruth, Chris, Miyoko e Rose, do Instituto Adolfo Lutz-SP, pela amizade e por ter possibilitado o início da minha carreira de pesquisa.

“Tenho em mim todos os sonhos do mundo”.

(Fernando Pessoa)

RESUMO

Faria, D.B. **Contaminação cruzada durante o fatiamento de produto cárneo pronto para o consumo: foco em *Listeria monocytogenes***. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2016.

Surtos e casos de listeriose reportados mundialmente e associados a produtos cárneos processados prontos para consumo podem ter sido causados pela contaminação cruzada com *Listeria monocytogenes* ocorrida durante a etapa de fatiamento destes produtos no varejo. Considerando o impacto da contaminação cruzada para a saúde pública, este trabalho teve por objetivo estudar a transferência de *L. monocytogenes* durante a etapa de fatiamento de rosbife do tipo “caseiro”, simulando, em laboratório, cenários observados em estabelecimentos comerciais em relação às práticas adotadas durante o fatiamento. Objetivou-se também avaliar o papel do nível da contaminação do produto (baixo e alto) causador da contaminação experimental do fatiador na contaminação cruzada resultante, bem como avaliar se a exposição da cepa de *L. monocytogenes* a um sanitizante em concentração insuficiente para a sua eliminação influencia a contaminação cruzada observada. A contaminação do fatiador foi obtida por meio do fatiamento de peças de rosbife experimentalmente contaminadas com o patógeno por imersão em uma suspensão de *L. monocytogenes* contendo 8 log UFC/mL (alto nível de contaminação) e 4 log UFC/mL (baixo nível de contaminação). Os experimentos foram realizados até a obtenção de 200 fatias. As enumerações de *L. monocytogenes* nas fatias obtidas foram feitas empregando-se um método cultura-dependente (ISO 11290-2:1998) e um método qPCR, calculando-se também as taxas de transferência. Os resultados mostraram que a contaminação dos fatiadores resultou na transferência do patógeno até pelo menos a 120^a fatia de uma nova peça de rosbife fatiada posteriormente. Nos experimentos realizados com *L. monocytogenes* exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat em concentração insuficiente para sua eliminação, foi possível enumerar o patógeno até a 200^a fatia de rosbife obtida após a contaminação experimental do fatiador, independentemente do nível de contaminação da peça de rosbife usada para a contaminação do fatiador. Equações matemáticas resultantes, que descrevem os dados experimentais obtidos, apresentaram $R^2 > 0,7$ e $p < 0,05$, mostrando bom ajuste. Esses resultados ressaltam a importância de medidas para evitar a ocorrência de contaminação cruzada durante a etapa de fatiamento de produtos cárneos prontos para o consumo, bem como da higienização adequada dos equipamentos utilizados, de forma a fornecer produtos seguros para o consumidor.

Palavras-chave: Contaminação cruzada, produtos cárneos prontos para consumo, *Listeria monocytogenes*, sanitizante, qPCR.

ABSTRACT

Faria, D.B. **Cross contamination during slicing of a ready-to-eat meat product: focus on *Listeria monocytogenes***. Dissertation (Master). Graduate Program on Food Science. Faculty of Pharmaceutical Sciences. University of São Paulo, SP, 2016.

Outbreaks and cases of listeriosis reported worldwide and associated to ready-to-eat meat products may have been caused by cross contamination with *Listeria monocytogenes* occurred during the slicing step of these products at retail. Considering the impact of cross-contamination to public health, this study aimed to study the transfer of *L. monocytogenes* during the slicing step of homemade type roast-beef simulating in the laboratory scenarios seen in commercial establishments. The study also aimed to evaluate the role of product contamination level (low and high) causing the experimental contamination of the slicer in the resulting cross-contamination and to evaluate if the exposure of the *L. monocytogenes* strain to a sanitizer in insufficient concentration for the elimination influences the observed cross-contamination. Contamination of the slicer was obtained through the slicing of roast-beef pieces experimentally contaminated with the pathogen by immersion in a suspension of *L. monocytogenes* containing 8 log CFU/ml (high contamination) and 4 log CFU/mL (low contamination). The experiments were carried out to obtain 200 slices. Enumerations of *L. monocytogenes* in the slices employed a culture-dependent method (ISO 11290-2: 1998) and qPCR method, also calculating transfer rates. The results showed that contamination of slicers resulted in the transfer of the pathogen to at least the 120th slice of a new piece of roast-beef sliced subsequently. In experiments conducted with *L. monocytogenes* exposed to the sanitizer Oasis Compac 22 Quat in insufficient concentration for its elimination, the pathogen could be enumerated until the 200th slice obtained after the slicer contamination, regardless of the contamination level of the roast beef used for contamination of the slicer. Mathematical equations describing the experimental data presented $R^2 > 0.7$ and $p < 0.05$, showing good fit. These results underscore the importance of measures to prevent the occurrence of cross contamination during the slicing step of ready-to-eat meat products, as well as the proper cleaning of the equipment used in order to provide safe products to the consumer.

Key-words: cross-contamination, ready-to-eat meat products, *Listeria monocytogenes*, sanitizer, qPCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Agentes etiológicos associados a surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, no período de 2000 a 2015. Fonte: Sinan Net/SVS/MS, 2015.....	13
Figura 2. Fatiador Urano Modelo SMS-048, com indicação dos locais de coleta de amostras de superfície: 1, lâmina; 2, placa de calibre; 3, bandeja de transporte; 4, área de recolha.	24
Figura 3. Rosbife comercial do tipo “caseiro”.	25
Figura 4. Remoção da parte mais externa das peças de rosbife experimentalmente contaminadas.	29
Figura 5. Curva padrão de qPCR para <i>L. monocytogenes</i> . Os valores de C_T são as médias $\pm$ DP de 3 triplicatas.	32
Figura 6. Enumeração de <i>L. monocytogenes</i> não exposta (A) e exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat (B) nas fatias de rosbife obtidas no fatiador experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com alto nível de contaminação.	36
Figura 7. Enumeração de <i>L. monocytogenes</i> não exposta (A) e exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat (B) nas fatias de rosbife obtidas no fatiador experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com baixo nível de contaminação.	37
Figura 8. Taxas de transferência (log %TT) de <i>L. monocytogenes</i> , não exposta e exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat, nas fatias de rosbife obtidas quando o fatiador foi experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com alto nível de contaminação.	39
Figura 9. Taxa de transferência (log %TT) de <i>L. monocytogenes</i> , não exposta e exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat, nas fatias de rosbife obtidas quando o fatiador foi experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com baixo nível de contaminação.	41
Figura 10. Ajuste das equações matemáticas (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) da enumeração de <i>L. monocytogenes</i> não exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat nas fatias de rosbife obtidas no fatiador experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com alto nível de contaminação. Modelo Exponencial (A) e Linear (B).....	42

- Figura 11. Ajuste das equações matemáticas (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) da enumeração de *L. monocytogenes* não exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat nas fatias de rosbife obtidas no fatiador experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com alto nível de contaminação. Modelo Logarítmico (C) e Polinomial (D).....43
- Figura 12. Ajuste da equação logarítmica (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) da enumeração de *L. monocytogenes* exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat nas fatias de rosbife obtidas no fatiador experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com alto nível de contaminação.44
- Figura 13. Ajuste das equações matemáticas (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) da enumeração de *L. monocytogenes* exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat nas fatias de rosbife obtidas no fatiador experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com baixo nível de contaminação. Modelo Linear (A) e Logarítmico (B).46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Enumeração (log UFC/g) de <i>L. monocytogenes</i> não exposta e exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat nas fatias de rosbife obtidas após a imersão das peças de rosbife nas suspensões contendo ~8 log UFC/mL e ~4 log UFC/mL	35
Tabela 2. Enumeração de <i>L. monocytogenes</i> , não exposta e exposta ao sanitizante, nas fatias de rosbife obtidas no fatiador experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com alto nível de contaminação.	36
Tabela 3. Enumeração de <i>L. monocytogenes</i> , não exposta e exposta ao sanitizante, nas fatias de rosbife quando o fatiador foi experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com baixo nível de contaminação.....	37
Tabela 4. Taxas de transferência (%TT e log %TT) de <i>L. monocytogenes</i> , não exposta e exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat, para as fatias de rosbife quando o fatiador foi experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com alto nível de contaminação.	38
Tabela 5. Taxas de transferência (%TT e log %TT) de <i>L. monocytogenes</i> , não exposta e exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat, para as fatias de rosbife quando o fatiador foi experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com baixo nível de contaminação.	40
Tabela 6. Equações matemáticas e parâmetros estatísticos para dados de transferência de <i>L. monocytogenes</i> não exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat nas fatias de rosbife quando o fatiador foi experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com alto nível de contaminação	44
Tabela 7. Equações matemáticas e parâmetros estatísticos para dados de transferência de <i>L. monocytogenes</i> exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat nas fatias de rosbife quando o fatiador foi experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com alto nível de contaminação	45
Tabela 8. Equações matemáticas e parâmetros estatísticos para dados de transferência de <i>L. monocytogenes</i> exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat nas fatias de rosbife quando o fatiador foi experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com baixo nível de contaminação	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Segurança microbiológica e contaminação cruzada de alimentos	13
1.2	Importância de <i>Listeria monocytogenes</i> em alimentos prontos para o consumo	16
1.3	Contaminação cruzada de produtos cárneos prontos para o consumo durante a etapa de fatiamento	19
2	OBJETIVOS	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1	Fatiador de frios.....	24
3.2	Produto processado pronto para o consumo (rosbife)	25
3.3	Cepa de <i>Listeria monocytogenes</i> e preparação da cultura para contaminação experimental	26
3.4	Preparo da cultura de <i>Listeria monocytogenes</i> exposta a sanitizante.....	26
3.5	Contaminação experimental do fatiador de frios.....	28
3.6	Transferência de <i>Listeria monocytogenes</i> para as fatias de rosbife durante o fatiamento no fatiador experimentalmente contaminado	29
3.7	Enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i>	30
3.7.1	Método cultura-dependente ISO 11290-2:1998	30
3.7.2	Método cultura-independente Real time PCR (qPCR).....	30
3.7.2.1	Extração do DNA	30
3.7.2.2	Ensaio de qPCR.....	31
3.7.2.3	Curva padrão e eficiência de amplificação.....	32
3.8	Análise dos dados	33
4	RESULTADOS	35
4.1	Presença de <i>Listeria monocytogenes</i> no fatiador higienizado e nas peças de rosbife adquiridas do comércio.....	35
4.2	Enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i> nas fatias de rosbife utilizadas para contaminação do fatiador.....	35
4.3	Transferência de <i>Listeria monocytogenes</i> para as fatias de rosbife durante o fatiamento no fatiador experimentalmente contaminado	36
4.3.1	Cenário de alto nível de contaminação.....	36
4.3.2	Cenário de baixo nível de contaminação	37
4.4	Taxas de transferência de <i>Listeria monocytogenes</i> não exposta e exposta ao sanitizante	38
4.4.1	Cenário de alto nível de contaminação.....	38
4.4.2	Cenário de baixo nível de contaminação	40

4.5	Análise de Regressão.....	41
4.5.1	Cenário alto nível de contaminação.....	41
4.5.2	Cenário baixo nível de contaminação.....	45
5	DISCUSSÃO.....	48
6	CONCLUSÃO.....	53
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 Segurança microbiológica e contaminação cruzada de alimentos

Do ponto de vista de higiene de alimentos e saúde pública, alimentos considerados seguros são os que não oferecem riscos à saúde dos consumidores. Apesar dos avanços tecnológicos nas áreas de produção e segurança de alimentos, a ocorrência de doenças de origem alimentar continua aumentando. A Organização Mundial da Saúde estima que, anualmente, mais de 1/3 da população mundial seja afetada por Enfermidades Transmitidas por Alimentos (ETA), constituindo importante problema de saúde pública (OMS, 2015). De acordo com o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), um em cada seis cidadãos americanos (~ 48 milhões de pessoas) adoecem anualmente, 128 mil são hospitalizados e 3.000 morrem pela ETA (CODEX, 2006; CDC, 2014a).

Como no Brasil as ETA não são de notificação obrigatória, os dados sobre sua ocorrência são escassos e inconsistentes. Dados do Ministério da Saúde revelam que, no período de 2000 a 2015, foram notificados 426 surtos, com 7.371 pessoas doentes. Embora na maioria dos casos (58,5%) o agente etiológico dos surtos não tenha sido identificado, *Salmonella* spp. aparece como o micro-organismo patógeno mais frequente (14,4%) (Figura 1) (BRASIL, 2015).

Figura 1. Agentes etiológicos associados a surtos de Enfermidades Transmitidas por Alimentos no Brasil, no período de 2000 a 2015. Fonte: Sinan Net/SVS/MS, 2015.

Do ponto de vista da segurança, as áreas de processamento de alimentos que apresentam micro-organismos patogênicos podem ser críticas, pois estes podem ser transferidos para os alimentos e causar enfermidades. Para se evitar que os alimentos se contaminem com micro-organismos patogênicos durante o armazenamento e manipulação, são necessárias medidas efetivas de controle da contaminação cruzada. Matérias primas contaminadas que entram na linha de produção de um alimento, associadas com práticas deficientes de higiene e processamento inadequado durante as diferentes etapas da cadeia produtiva, podem ocasionar a contaminação da área de processamento e, conseqüentemente, contaminar outros produtos inicialmente não contaminados (PÉREZ-RODRIGUÉZ et al., 2008; CDC, 2013).

A contaminação cruzada com micro-organismos patogênicos representa importante desafio para as indústrias de alimentos e para os sistemas de saúde pública mundiais, especialmente quando ocorre com alimentos prontos para o consumo, nos quais não há nenhuma intervenção (ex. tratamento térmico) que possa reduzir ou eliminar esses contaminantes causadores de enfermidades antes do seu consumo. A contaminação cruzada de produtos cárneos prontos para o consumo foi estudada por diversos autores, e vários relataram que a ocorrência de surtos de ETA foi causada pelo consumo desses tipos de produto (CDC, 2000, CDC, 2002; GARRIDO et al., 2009; WINTER et al., 2009; GREEN BROWN, KHARGONEKAR, BUSHNELL, 2013; HÄCHLER et al., 2013; CDC, 2016).

Alguns estudos focaram o problema da contaminação cruzada envolvendo superfícies de contato com os alimentos. Talon et al. (2007) analisaram amostras de instrumentos e superfícies das áreas de processamento de fábricas produtoras de salame na Europa, como facas, mesas de corte e equipamentos, e observaram elevada contaminação por *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, mesmo após a limpeza e sanitização, o que evidencia sua importância como focos de contaminação cruzada. Naidoo e Lindsay (2010) observaram contagens de 2 a 6 log UFC/cm² em utensílios de corte de produtos cárneos prontos para o consumo em estabelecimentos varejistas na África do Sul e contagens da ordem de 6 a 7 log UFC/g nos produtos, sugerindo que os utensílios são potenciais fontes de contaminação. Em estudo conduzido por Maitland et al. (2013), os autores empregaram um produto que emite fluorescência sob luz UV (GloGerm) para demonstrar que patógenos propagam-se pelo ambiente via contato direto, causando contaminação cruzada. Esses estudos indicam que as superfícies de equipamentos e utensílios são potenciais fontes de contaminação no ambiente de processamento, que é favorecida quando há falhas de higiene na manipulação dos produtos (SHEEN, HWANG, 2008; MUÑOZ et al., 2013).

Os produtos cárneos prontos para o consumo podem ser fatiados nas próprias indústrias produtoras e também nos pontos de venda, como supermercados, lojas de conveniência, padarias e estabelecimentos que servem alimentos, como restaurantes e cozinhas institucionais, ou ainda ser fatiados na residência dos consumidores. No caso do fatiamento nos pontos de venda, são empregados fatiadores manuais ou semiautomatizados, cuja deficiência na limpeza e sanitização das superfícies em contato com os produtos cárneos pode ocasionar contaminação cruzada, que se agrava pela manutenção dos produtos e fatiadores em temperatura ambiente. Além disso o uso prolongado e as repetidas limpezas dos fatiadores podem causar danos mecânicos às máquinas, com o aparecimento de microrrachaduras, nas quais fragmentos de produtos podem se acumular e, pela dificuldade de limpeza, tornarem-se locais de adesão e multiplicação microbiana (FDA, 2015; USDA, 2013; MUÑOZ et al., 2013; SHEEN; HWANG, 2010; SHEEN, HWANG, 2008).

A ocorrência de contaminação cruzada por meio de máquinas de corte pode ser minimizada empregando-se medidas de controle apropriadas, como limpeza e sanitização. A limpeza é necessária para a remoção de matéria orgânica aderida às máquinas, enquanto a sanitização tem as funções de eliminar ou reduzir a quantidade de micro-organismos presentes. Os resíduos orgânicos e minerais aderidos às superfícies podem ser removidos por procedimentos mecânicos ou pela aplicação de detergentes, e a sanitização é feita com produtos químicos à base de cloro, ou iodo, ou compostos quaternários de amônio, entre outros (ORTEGA-MORENTE et al 2013; HOELZER et al., 2012; BRASIL, 2002).

Os compostos à base de cloro e iodo são oxidantes e destroem a célula bacteriana ao oxidarem o protoplasma celular, alterarem a permeabilidade da membrana e impedirem a regeneração enzimática. Os compostos quaternários de amônio (QAC) não são oxidantes, mas alteram a permeabilidade da membrana celular por meio da ligação irreversível a fosfolipídios e proteínas de membrana, perturbando a bicamada lipídica, com extravasamento de componentes intracelulares. Os compostos quaternários de amônio causam perda de capacidade osmorregulatória e saída de íons de potássio e prótons, quando em baixas concentrações. Em concentrações intermediárias, há perturbação dos processos associados à membrana, como respiração, transporte de solutos e síntese de parede celular, enquanto em concentrações elevadas (como as utilizadas em formulações de sanitizantes) ocorre a morte bacteriana, decorrente da destruição da membrana e liberação de todo o conteúdo celular. Os compostos quaternários de amônio são bastante utilizados para a sanitização de equipamentos, mas sua eficácia pode ser bastante afetada pela presença de matéria orgânica (ORTEGA-MORENTE et al 2013; HOELZER et al., 2012; BRASIL, 2002).

O entendimento dos mecanismos de ação dos sanitizantes tornou-se questão importante com a compreensão do surgimento de tolerância bacteriana a esses produtos e da possibilidade de a resistência bacteriana a sanitizantes estar associada com resistência a antibióticos. Ao contrário dos antibióticos, que afetam um processo fisiológico específico, a maioria dos sanitizantes tem mais de um mecanismo de ação. Quando estes são usados em concentrações subinibitórias, sua ação pode estar limitada a um único alvo, podendo surgir um processo adaptativo, que resulta em resistência a esse sanitizante. No entanto o modo de ação de sanitizantes em concentrações subinibitórias ainda não está perfeitamente compreendido, pois varia de acordo com os micro-organismos alvo (Gram positivo, Gram negativo, esporulados etc.), alguns dos quais podem ser intrinsecamente resistentes, havendo ainda diferenças para cepas de uma mesma espécie (ORTEGA MORENTE et al., 2013).

Bisbiroulas et al. (2011) estudaram os mecanismos de adaptação de *Listeria monocytogenes* à exposição prolongada ao sanitizante cloreto de benzalcônio em níveis subletais e verificaram que a modificação da composição lipídica da membrana celular, decorrente da ação do sanitizante, causava maior adesão de bactéria às superfícies abióticas.

A eliminação de *L. monocytogenes* do ambiente de processamento é difícil porque a eficácia dos sanitizantes, quando utilizados em concentrações subótimas por falhas na dosagem, insuficiência de limpeza antes e após sanitização e/ou presença de biofilmes, pode ser reduzida significativamente. Em tais condições, respostas adaptativas podem resultar em adaptação a outros sanitizantes (ORTEGA MORENTE et al., 2013).

Pela longa história de uso e grande variedade de produtos comerciais disponíveis, com diferentes níveis de eficiência, os sanitizantes exercem papel importante na contaminação cruzada de alimentos, especialmente se a disseminação de bactérias resistentes de importância em saúde pública for considerada.

1.2 Importância de *Listeria monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo

O gênero *Listeria* é composto por 17 espécies: *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmann*, *L. weihenstephanensis*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensis*, *L. booriae* sp. nov.; e *L. newyorkensis* sp. nov. Apenas *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são consideradas patogênicas ao homem, e somente, *L. monocytogenes* tem importância como patógeno veiculado por alimentos (MILILLO et al., 2012).

L. monocytogenes é um bacilo, Gram positivo, não produtor de esporos ou cápsula, anaeróbio facultativo, oxidase negativo, catalase positivo e móvel por flagelos peritríquios. É um patógeno amplamente distribuído na natureza (solo, plantas, silagem, vegetação) e faz parte da microbiota fecal de muitos mamíferos. Também apresenta resistência a altas concentrações de cloreto de sódio (10 a 30%), multiplicando-se em uma ampla faixa de pH (4,3 a 9,6) e sobrevivendo bem em ambientes com atividade de água inferior a 0,93. É um micro-organismo psicrófilo, capaz de multiplicar-se em temperaturas entre -4 °C e 50 °C, com ótimo de 30 a 37 °C. A dose infecciosa não está estabelecida, havendo relatos de 10^2 até 10^8 UFC/g (MILILLO et al., 2012; RYSER; BUCHANAN, 2013).

De acordo com as proteínas de superfície de membrana celular (antígenos somáticos e flagelares), *L. monocytogenes* pode ser classificada em 13 sorotipos, dos quais três (1/2a, 1/2b e 4b) são mais frequentemente associados aos casos de doença. O sorotipo 4b é o mais comum em surtos de origem alimentar, enquanto os sorotipos 1/2a e 1/2b são os mais frequentemente encontrados nos alimentos. No Brasil, os sorotipos predominantes nos alimentos são 1/2a e 4b (HOFER et al., 2006; LEMES-MARQUES et al., 2007; SANT'ANA et al., 2012; RISTORI et al., 2014).

L. monocytogenes é a bactéria causadora da listeriose, que afeta principalmente gestantes, recém-nascidos, idosos e pacientes imuno-comprometidos, embora também possa afetar indivíduos saudáveis. A investigação epidemiológica da doença é difícil porque os sinais clínicos iniciais são semelhantes a uma gripe, e o período de incubação é longo (semanas a meses) (GOULET et al., 2013; VÁSQUEZ-BOLAND et al., 2001).

A listeriose pode apresentar-se na forma de três síndromes: a gastroenterite febril, a materno-fetal e a invasiva. A gastroenterite febril acomete indivíduos saudáveis, sendo caracterizada por um período de incubação de 6 a 49 h (média 24 h) e sintomas inespecíficos como diarreia, dor abdominal, dor de cabeça e mialgias. É uma doença autolimitada e a maioria dos pacientes se recupera sem a necessidade de tratamento. A listeriose materno-fetal ocorre com mais frequência no último trimestre da gestação e os sintomas iniciais são semelhantes à gripe, com febre, mialgias e dor de cabeça, seguidos de complicações, como aborto, feto natimorto, nascimento prematuro e infecções neonatais. Aproximadamente 2/3 dos recém-nascidos de mães com listeriose apresentam a infecção. A listeriose em recém-nascidos pode acontecer logo após o nascimento, causada por uma infecção intrauterina através da placenta ou inalação/ingestão do líquido amniótico com o patógeno. Os sintomas mais comuns são problemas respiratórios agudos, pneumonia, bacteremia e granulomatose infantiséptica. A listeriose tardia em recém-nascidos pode ocorrer, em média, 15 dias após o

nascimento, resultando em meningite. A transmissão ocorre provavelmente durante o parto (canal vaginal) ou por infecção hospitalar, sendo o sorotipo 4b o mais comum. *L. monocytogenes* é uma das três principais causas de meningite em recém-nascidos (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007; LAMONT et al., 2011; CDC, 2012).

A listeriose invasiva, não neonatal, caracteriza-se por bacteremia, com ou sem focos evidentes de infecção, podendo afetar o sistema nervoso central e causar meningite, meningoenfalite e abscessos no cérebro. Afeta, principalmente, pacientes com mais de 50 anos, causando febre, alterações na percepção sensorial e dor de cabeça (DREVETS; BRONZE, 2008).

O tratamento de listeriose com antibióticos é indicado nos casos de doença invasiva, principalmente nos grupos de risco. *L. monocytogenes* é geralmente sensível à maioria dos antibióticos, mas há relatos de aumento da taxa de resistência antimicrobiana, principalmente em isolados obtidos de produtos de origem animal e amostras ambientais (LUNGU et al., 2011). A resistência pode ocorrer por mutações genéticas espontâneas, pressão seletiva do meio e aquisição de material genético (transferência horizontal ou vertical). O surgimento de resistência aos antibióticos, antissépticos e sanitizantes sugere a necessidade de mais prudência na utilização desses produtos. As mudanças fisiológicas e estruturais em *L. monocytogenes*, resultantes da exposição a esses produtos, podem causar estresse moderado ou subletal, permitindo que o organismo sobreviva no ambiente, podendo tornar-se tolerante (adaptação) ou resistente aos produtos (MOORMAN et al., 2005; MARQUES, 2012; ORTEGA-MORENTE et al., 2013).

Muitos países não consideram a listeriose uma doença de notificação obrigatória, pela baixa incidência (0,26 casos por 100 mil habitantes). Apesar disso, *L. monocytogenes* é considerado um patógeno humano de grande importância em saúde pública, pelo elevado grau de severidade e alto índice de mortalidade da doença (20 a 30%), trazendo graves consequências econômicas para os sistemas de saúde e para as indústrias de alimentos (USDA, 2012; USDA, 2013).

L. monocytogenes é um contaminante que pode ser encontrado em todos os tipos de alimentos. A ocorrência em alimentos processados pelo calor, tais como queijos moles, carnes processadas e frutos do mar defumados, é também comum em consequência de recontaminação pós-processamento. Pelas próprias características do micro-organismo, os alimentos de maior risco são aqueles prontos para o consumo, refrigerados e com longa vida de prateleira, nos quais não ocorre nenhum tratamento antes do consumo que possa eliminar a contaminação (LIANOU; SOFOS, 2007). Ademais *L. monocytogenes* é um patógeno de

grande preocupação pela sua capacidade de sobreviver no ambiente de processamento de alimentos, mesmo em condições adversas (PRADHAN et al., 2011; MANIOS, SKANDAMIS, 2014).

Os produtos prontos para o consumo e contaminados com *L. monocytogenes* têm causado surtos de grandes proporções em muitos países. Nos Estados Unidos, estima-se que esse patógeno seja responsável por aproximadamente 1.600 casos de doenças e 260 mortes anualmente. A média anual estimada de casos e de mortes por *L. monocytogenes* relacionados a produtos cárneos fatiados nos EUA é 916.6 e 166.9, respectivamente (CDC, 1998; CDC, 2000, CDC, 2012; CDC, 2014b). Com base em dados de contaminação e comportamento dos consumidores desses produtos, o United States Department of Agriculture (USDA) realizou uma avaliação de risco, estimando que aproximadamente 83% dos casos de listeriose podem estar correlacionados com produtos cárneos fatiados no varejo (USDA, 2013).

Estudos realizados nos Estados Unidos indicam que a prevalência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos prontos para o consumo e fatiados no varejo é aproximadamente sete vezes maior do que a observada em produtos fatiados e embalados em instalações de processamento sob inspeção federal (USDA, 2013).

No Brasil, Araújo et al. (2002) reportaram a ocorrência mais elevada de *L. monocytogenes* em produtos de carne de peru, fatiados em estabelecimentos comerciais (positividade entre 80 e 90%, dependendo do produto) do que em produtos inteiros (ausência de *L. monocytogenes*), sugerindo que a manipulação inadequada no momento do fatiamento foi a responsável pela positividade observada. Estudos de Garrido et al. (2009) e Pérez-Rodríguez et al. (2010) também apontam a contaminação cruzada durante o corte e manuseio como causa provável da prevalência relativamente alta de *L. monocytogenes* em produtos cárneos prontos para consumo.

1.3 Contaminação cruzada de produtos cárneos prontos para o consumo durante a etapa de fatiamento

Os produtos cárneos fatiados e prontos para o consumo são bastante consumidos em todo o mundo pela conveniência e boa aceitação por parte dos consumidores. Mesmo quando produzidos em condições industriais adequadas podem ser contaminados por bactérias patogênicas durante os procedimentos pós-processamento, fora da indústria, podendo causar doenças nos consumidores se não forem tomadas precauções para que as doses infecciosas

não sejam alcançadas, o que evidencia a importância do controle da contaminação cruzada na etapa de fatiamento desses alimentos (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2010).

A contaminação cruzada de superfícies em contato com matérias primas e alimentos processados por agentes patogênicos durante o processamento e preparação para comercialização é uma grande preocupação para consumidores e fabricantes de alimentos. Há muitas lacunas nos conhecimentos acerca da contaminação cruzada de superfícies, sendo necessárias muitas pesquisas para se descrever, simular e modelar esse tipo de contaminação, com os objetivos de melhorar o seu controle e diminuir os riscos de enfermidades transmitidas por alimentos (SHEEN; HWANG, 2010).

Alguns estudos simularam em laboratório a transferência de patógenos durante o fatiamento, tanto de máquinas de fatiamento para alimentos quanto de alimentos para as máquinas de fatiamento e subsequentemente para outro alimento fatiado nessas máquinas.

Pérez-Rodríguez et al. (2007) determinaram os coeficientes de transferência de *Escherichia. coli* O157:H7 e *Staphylococcus aureus* da lâmina de um fatiador contaminado para um produto cárneo cozido durante o corte e desenvolveram um modelo matemático para representar essa transferência. Aarnisalo et al. (2007b) estudaram e modelaram a transferência de *L. monocytogenes* durante o corte mecânico de salmão “gravad”, verificando o efeito da temperatura, nível de inóculo inicial e tempo de fixação desse inóculo na lâmina do fatiador. Sheen e Hwang (2008) investigaram a transferência de *L. monocytogenes* do fatiador para fatias de presunto e desenvolveram modelos empíricos para descrever essa transferência. Chen, Zhao e Doyle (2014) realizaram estudo semelhante, relatando que a transferência de *L. monocytogenes*, *Salmonella* e *E. coli* O157:H7, durante a contaminação cruzada, decresce logarithmicamente. Esses estudos fornecem informações de grande relevância para as futuras avaliações de risco microbiológico, identificação dos pontos críticos de controle e estabelecimento da vida útil de alimentos, além da avaliação das práticas ou atividades que resultam em contaminação cruzada.

A transferência dos patógenos durante o fatiamento de produtos cárneos é influenciada por muitos fatores, tais como nível de contaminação inicial nos produtos ou nas superfícies de contato, composição produto, força de corte, velocidade da lâmina de corte, temperatura ambiente, topografia da superfície da lâmina de corte, tempo de contato do alimento com o fatiador e frequência de higienização do fatiador, sendo difícil avaliar o papel de cada fator individualmente (SHEEN; HWANG, 2010; CHAITIEMWONG et al., 2014).

Quando a contaminação cruzada ocorre, é preciso aplicar medidas eficientes para impedir que o patógeno se multiplique durante a conservação do produto assim contaminado.

Uma medida preventiva é o emprego de antimicrobianos na formulação desses produtos, tais como lactatos, diacetatos, nitratos, nitritos e outros compostos com atividade antimicrobiana. Entretanto a continuidade da inibição de *Listeria* após o processamento depende de inúmeros fatores, tais como características do produto (formulação, pH, umidade e micro-organismos presentes), tipo e concentração do antimicrobiano presente e tempo e temperatura de armazenamento do produto fatiado (ZHANG et al, 2012; USDA, 2013).

Enquanto vários trabalhos examinaram a contaminação cruzada de diversos tipos de produtos cárneos processados e prontos para o consumo com *L. monocytogenes*, há pouca informação sobre rosbife “do tipo caseiro”, que apresenta características intrínsecas peculiares, principalmente em relação ao teor de gordura, umidade e textura, além de ser produzido sem adição de adjuvantes tecnológicos ou compostos antimicrobianos. Vorst et al. (2006) avaliaram a contaminação cruzada durante o fatiamento de três produtos cárneos com diferentes teores de gordura e umidade (salame, mortadela e peito de peru), observando diferenças na quantidade de resíduos visíveis e aderidos às diferentes regiões dos fatiadores. O fatiamento de salame, que apresentava maior teor de gordura e menor umidade que os demais produtos, resultou em maior camada de gordura sobre a lâmina, favorecendo a dispersão do patógeno por conferir uma proteção contra o atrito normal durante o fatiamento.

Os procedimentos de higienização de equipamentos de corte têm importante papel na prevenção e controle da contaminação cruzada durante o fatiamento (SHEEN; HWANG, 2010). A eliminação de *L. monocytogenes* do local de processamento é difícil, não apenas pela resistência do patógeno, mas por questões como falhas de dosagem de sanitizante aplicado, insuficiência de limpeza antes da sanitização e lavagem inadequada após sanitização. Patógenos formadores de biofilmes, como *L. monocytogenes*, podem não ser eliminados quando a limpeza de rotina e sanitização não são realizadas adequadamente (ORTEGA-MORENTE et al., 2013).

Alguns estudos comprovam a capacidade de adaptação dos micro-organismos a ambientes inóspitos, que podem tornar-se tolerantes aos produtos usados nos procedimentos de higienização. Rajkovic et al., (2009) investigaram a tolerância de *L. monocytogenes* a bactericidas e observaram uma resposta adaptativa após o tratamento, que origina novos riscos para o consumidor. Aarnisalo et al. (2007a) compararam a ação de vários sanitizantes comerciais e produtos de limpeza à base de cloro, compostos de amônio quaternário, ácido peracético, etanol e isopropanol contra dez cepas de *L. monocytogenes* isoladas de frigoríficos, observando que a resposta adaptativa era menor, quando esses produtos eram utilizados na concentração indicada pelo fornecedor, e que ocorriam problemas de eficácia

quando o uso era inadequado e havia falta de compreensão da ação limitada desses produtos. Sheen, Hwang e Juneja (2011) observaram que cepas de *L. monocytogenes* expostas ao cloro eram capazes de sobreviver em presunto durante o armazenamento refrigerado e, em seguida, contaminar outros produtos. Takeuchi et al. (2000), ao estudar o efeito do tamanho do inóculo, temperatura e concentração de cloro na adesão de *E coli* O157:H7 em alface, observaram contagens elevadas ($7.6 \log \text{UFC/cm}^2$) mesmo após o tratamento com cloro a 200 ppm por 5 min.

Embora os procedimentos de rotina de limpeza e sanitização de máquinas de corte sejam considerados efetivos quando realizados seguindo as boas práticas, o efeito do uso de sanitizantes em concentrações inadequadas ou subinibitórias ainda é pouco conhecido, principalmente em relação à contaminação cruzada de superfícies. Nessas condições, a eficácia dos compostos sanitizantes pode ser prejudicada, mesmo se o tempo de aplicação for prolongado (LIN et al., 2006; ORTEGA MORENTE et al., 2013).

A compreensão do mecanismo de transferência de *L. monocytogenes* das superfícies das áreas de processamento para os produtos prontos para o consumo e vice-versa bem como a dos fatores que interferem na transferência são importantes para a proposição de ações preventivas e corretivas adequadas. Por ser o rosbife um produto cárneo pronto para o consumo fabricado sem a adição de antimicrobianos e um produto cárneo “caseiro” de grande consumo mas pouco estudado, faz-se necessário avaliar o comportamento de *L. monocytogenes* neste produto e verificar a contaminação cruzada que pode ocorrer durante o fatiamento, principalmente após a exposição a sanitizantes em concentrações insuficientes para sua inativação.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar a transferência (contaminação cruzada) de *Listeria monocytogenes* durante a etapa de fatiamento de um produto cárneo processado pronto para o consumo (rosbife do tipo “caseiro”), simulando, em laboratório, cenários observados em estabelecimentos comerciais em relação às práticas adotadas durante o fatiamento. Objetivou-se também avaliar o papel do nível de contaminação do produto (baixo e alto) causador da contaminação experimental do fatiador na contaminação cruzada resultante, bem como avaliar se a exposição da cepa de *L. monocytogenes* a um sanitizante em concentração subletal influencia a contaminação cruzada observada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Fatiador de frios

O trabalho foi desenvolvido com um fatiador de frios manual (Urano Modelo SMS-048, Canoas, RS), fabricado com aço inoxidável (#304), com uma lâmina de corte de 22 cm de diâmetro (Figura 2).

Figura 2. Fatiador Urano Modelo SMS-048, com indicação dos locais de coleta de amostras de superfície: 1, lâmina; 2, placa de calibre; 3, bandeja de transporte; 4, área de recolha.

Para a realização dos experimentos, o fatiador foi desmontado e as peças higienizadas com detergente neutro Extran MA 02 (Merck, São Paulo, Brasil), seguido de enxágue com água corrente, sanitização com Oasis Compac 22 Quat Sanitizer (Ecolab, São Paulo, Brasil) a 8000 ppm por 10 min, conforme indicação do fabricante, enxágue em água corrente e aplicação de álcool 70 %. O detergente e o sanitizante foram aplicados com esponjas, e o enxague foi feito com pissetas. A lâmina de corte foi esterilizada em autoclave a 121 °C por 15 min. Antes de cada experimento, o fatiador foi exposto à luz ultravioleta por 60 min em cabine de segurança biológica (Trox Technik, Curitiba, Brasil).

Para controle da ausência de *L. monocytogenes* no fatiador, realizado antes de cada experimento, empregou-se a técnica do esfregão de superfície (American Public Health Association, 2001), aplicando-se cotonetes estéreis umedecidos com água peptonada 0,1 % (Absorve, Cotia, Brasil) em uma área de 50 cm² nos locais assinalados na Figura 2 (lâmina, placa de calibre, bandeja de transporte e área de recolha do fatiador).

3.2 Produto processado pronto para o consumo (rosbife)

O estudo foi desenvolvido com peças de rosbife comercial do tipo “caseiro”, refrigeradas (Figura 3), com peso entre 1 e 2 kg, adquiridas em supermercados de São Paulo, dentro do prazo de validade indicado na embalagem. Conforme informação no rótulo, as peças de rosbife eram constituídas de carne bovina (lagarto, Semitendinosus) temperada com molho de soja, água, sal, soja, milho, açúcar, corante Caramelo III (INS 150c), sorbato de potássio (INS 202), sal refinado, pimenta do reino e glutamato monossódico (INS 621).

Figura 3. Rosbife comercial do tipo “caseiro”.

Antes do uso, as peças de rosbife foram testadas para a presença de *L. monocytogenes*, empregando-se o método ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004 (International Organization for Standardization, 2004). Uma porção de 25 g de cada peça foi transferida para uma bolsa plástica, (Nasco, Fort Atkinson, USA), homogeneizada com 225 mL de caldo Half-Fraser (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) em stomacher (Biomerieux SA, Marcy l'Etoile, França) por 60 s e a mistura incubada a 20 ± 2 °C por $1h \pm 5$ min. Após esse período, adicionou-se à mistura um frasco de suplemento Half-Fraser SR0166 (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), constituído de 2,25 mg de ácido nalidíxico, 2,8125 mg de hidrocloreto de acriflavina e 112,5 mg de citrato férrico de amônio, incubando-se a 30 ± 1 °C por 24 ± 2 h. Em seguida, transferiu-se 0,1 mL da mistura para um tubo contendo 10 mL de caldo Fraser (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), incubando-se a 37 ± 1 °C por 48 ± 2 h. Os caldos que apresentavam enegrecimento foram estriados em placas com ágar PALCAM (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) e ALOA (Merck, Darmstadt, Alemanha), seguido de incubação a 37 ± 1 °C por 24-48 h. De cada placa de ágar, três a cinco colônias suspeitas de *Listeria* foram transferidas

para placas com ágar tripticase de soja com 0,6 % de extrato de levedura (TSAye, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). Após incubação a 37 ± 1 °C por 18-24 h, as placas foram examinadas sob iluminação oblíqua transmitida (técnica de Henry), e as colônias características de *Listeria* foram transferidas para outra placa com ágar TSAye para obtenção de colônias isoladas, que foram submetidas à identificação de *L. monocytogenes* por meio de coloração de Gram e testes de produção de catalase e β -hemólise, fermentação de carboidratos (xilose, manitol e ramnose) e motilidade. O resultado foi expresso como ausência ou presença de *L. monocytogenes* em 25 g de produto.

3.3 Cepa de *Listeria monocytogenes* e preparação da cultura para contaminação experimental

O estudo foi desenvolvido com a cepa de *L. monocytogenes* 046/77 (sorotipo 1/2c), isolada de salame e pertencente à Coleção de Culturas de Bactérias de Interesse em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, cedida pelo Dr. Ernesto Hofer. A cepa foi mantida a -80 °C em criotubos (TPP, Transadingen, Suíça) contendo 1 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI; Difco, Becton Dickinson, Maryland, USA) e 25 % (v/v) de glicerol (Labsynth, Diadema, SP). Para uso, a cepa foi cultivada em ágar tripticase soja com 0,6 % de extrato de levedura (TSAye, Oxoid, Inglaterra) e mantida a 4 °C. Para preparação da cultura para inoculação experimental, a cepa foi cultivada em BHI por 18-24 h a 37 °C e submetida à diluição em água peptonada 0,1 % (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) para obtenção de uma suspensão com 8 log UFC/mL, determinada por meio de uma curva de crescimento padrão, com leitura de densidade ótica a 600 nm em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech, Centerville, USA). A cultura de *L. monocytogenes* 046/77 foi misturada com água de peptona 0,1% (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) para compor a solução de imersão responsável pela contaminação experimental da peça de rosbife, com alto e baixo nível de contaminação (8 e 4 log UFC/mL).

3.4 Preparo da cultura de *Listeria monocytogenes* exposta a sanitizante

Para o preparo da cultura de *L. monocytogenes* 046/77 exposta a sanitizante, inicialmente foi utilizado um produto à base de cloro (Sumaveg, Diversey Lever, São Paulo, Brasil), empregando-se a metodologia descrita por Sheen et al. (2011). A cepa foi cultivada em BHI por 18-24 h a 37 °C e submetida à diluição em água peptonada 0,1 % (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) para obtenção de uma suspensão com 8 log UFC/mL, determinada

por meio de uma curva de crescimento padrão, com leitura de densidade ótica a 600 nm em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech, Centerville, USA). A essa suspensão adicionou-se Sumaveg na concentração de uso recomendada pelo fabricante (3300 ppm), com tempo de exposição de 1 h. Após a adição de D/E Neutralizing broth (Difco, Maryland, USA) na proporção de 2:1, a suspensão foi submetida à diluição decimal seriada em água peptonada 0,1 %, e alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram semeadas em placas de BHI ágar (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) e PALCAM (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), com incubação a 37 °C por 24 h, para verificar o crescimento de *L. monocytogenes*.

Como a contagem de *L. monocytogenes* 046/77 após a exposição ao Sumaveg por 1 h foi a mesma que a de *L. monocytogenes* 046/77 não exposta ao sanitizante, foi necessário selecionar outro produto para o estudo, escolhendo-se o Oasis Compac 22 Quat (Ecolab, São Paulo, Brasil), um produto à base de cloreto de N,N-dialquil-N,N-dimetilamônio (quaternário de amônio) também utilizado para higienização de superfícies de equipamentos em contato com alimentos. A cepa foi cultivada em BHI por 18-24 h a 37 °C e submetida à diluição decimal seriada em água peptonada 0,1 % para obtenção de uma suspensão com 8 log UFC/mL. A esta suspensão adicionou-se Oasis Compac 22 Quat na concentração de uso recomendada pelo fabricante (8000 ppm), mantendo-se a mistura a 22-25 °C por 1 h. Em seguida, adicionou-se D/E Neutralizing broth (Difco, Maryland, USA) na proporção de 2:1 e após 15 min a 22-25°C, a mistura foi centrifugada a 12000 x g por 10 min (Sigma 6-16k, Osterode am Harz, Alemanha). As células do sedimento foram adicionadas de tampão fosfato salino (PBS; pH 7,4) e centrifugadas a 12000 x g por 10 min (Sigma 6-16k, Osterode am Harz, Alemanha). Os sedimentos finais foram ressuspensos em água peptonada 0,1 %, submetidos à diluição decimal seriada em água peptonada 0,1 %, e alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram semeadas em placas de BHI ágar (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) e PALCAM (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), com incubação a 37 °C por 24 h, para verificar o crescimento de *L. monocytogenes*.

Como *L. monocytogenes* 046/77 foi totalmente inibida pelo sanitizante Oasis Compac 22 Quat nas condições em que foi testada (8000 ppm por 1 h), foi necessário fazer um segundo teste de suscetibilidade, empregando-se concentrações mais baixas (1600, 800 e 400 ppm, correspondentes a 1/5, 1/10 e 1/20 da concentração de uso recomendada pelo fabricante). Nestes testes, a cultura de *L. monocytogenes* 046/77 em BHI contendo 8 log UFC/mL (2 µL) foi transferida para poços de uma placa de microtitulação de 96 poços com fundo em U, contendo 200 µL do sanitizante diluído em caldo Muller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) nas concentrações em teste, incubando-se a 37 °C por 24 h, para

visualização do crescimento. Foram utilizados controles positivos (sem o sanitizante) e negativos (sem a cultura).

Como *L. monocytogenes* 046/77 apresentou crescimento após tratamento com o sanitizante nas três concentrações testadas por 1 h, foram realizados testes complementares com menor tempo de exposição (30 e 10 min), efetuando-se as contagens de *L. monocytogenes*. Nestes testes, empregou-se a metodologia utilizada por Caballero Gómez et al, 2013. Na concentração de 1600 ppm, as contagens de *L. monocytogenes* após 10 e 30 min de contato foram $3,3 \pm 0,0$ e $3,6 \pm 0,7$ log UFC/mL respectivamente, e na concentração de 400 ppm, as contagens foram $6,9 \pm 0,2$ e $6,6 \pm 0,1$ log UFC/mL, respectivamente. Como não houve diferença significativa nas contagens após 10 min e 30 min de exposição ($p < 0,05$), o sanitizante na concentração de 400 ppm e o tempo de exposição de 10 min foram selecionados para obtenção da cepa exposta ao sanitizante.

A cultura de *L. monocytogenes* 046/77 exposta a sanitizante foi misturada com água de peptona 0,1% (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) para compor a solução de imersão responsável pela contaminação experimental da peça de rosbife, com alto e baixo nível de contaminação (8 e 4 log UFC/mL).

3.5 Contaminação experimental do fatiador de frios

Previamente à contaminação experimental do fatiador, foi criada uma “matriz” de carne no fatiador por meio do fatiamento de uma peça de rosbife comprovadamente negativa para *L. monocytogenes* até a obtenção de cinco fatias, de 1 a 2 mm de espessura, que foram posteriormente descartadas.

Para a contaminação experimental das peças de rosbife, peças de aproximadamente 200 g foram imersas em suspensões de *L. monocytogenes* preparadas conforme descrito nos itens 3.3 e 3.4 por 30 min. Foram utilizadas suspensões contendo ~ 8 log UFC/mL (nível “alto” de contaminação) e ~ 4 log UFC/mL (nível “baixo” de contaminação). Após a contaminação experimental, as peças foram transferidas para bandejas forradas com papel e deixadas secar em temperatura ambiente por 15 min, em cabine de segurança biológica (Trox Technik, Curitiba, Brasil).

Antes das peças contaminadas serem empregadas para a contaminação experimental do fatiador, a parte mais externa foi removida com uma faca esterilizada (Figura 4).

Figura 4. Remoção da parte mais externa das peças de rosbife experimentalmente contaminadas.

Para a contaminação experimental do fatiador de frios, as peças de rosbife experimentalmente contaminadas com *L. monocytogenes* foram fatiadas até a obtenção de cinco fatias de 1 a 2 mm de espessura. O procedimento foi realizado com *L. monocytogenes* não exposta ao sanitizante e exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat, nos dois níveis de contaminação ($\sim 8 \log \text{UFC/mL}$ e $\sim 4 \log \text{UFC/mL}$). As cinco fatias obtidas foram submetidas à enumeração de *L. monocytogenes* conforme descrito no item 3.7.

3.6 Transferência de *Listeria monocytogenes* para as fatias de rosbife durante o fatiamento no fatiador experimentalmente contaminado

Após a contaminação experimental do fatiador, novas peças de rosbife (não submetidas à contaminação experimental e negativas para *L. monocytogenes*) foram fatiadas até a obtenção de 200 fatias, de 1 a 2 mm de espessura. Cada fatia obtida foi acondicionada separadamente em uma bolsa plástica (Nasco, Fort Atkinson, USA) e refrigerada a 4 °C até ser submetida à enumeração de *L. monocytogenes*, realizada em cada uma das primeiras cinco fatias, a cada cinco fatias entre a décima até a 50ª fatia e a cada dez fatias a partir da 50ª fatia. Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente e em cabine de segurança biológica (Trox Technik, Curitiba, Brasil). Todos os ensaios foram repetidos três vezes.

3.7 Enumeração de *Listeria monocytogenes*

A enumeração de *L. monocytogenes* foi realizada empregando-se duas metodologias diferentes dependendo do nível de contaminação empregado. Para o nível “alto” de contaminação (~8 log UFC/mL), empregou-se o método cultura-dependente ISO 11290-2:1998 (International Organization for Standardization, 1998) e para o nível “baixo” de contaminação (~4 log UFC/mL), foi empregado o método cultura-independente Real time PCR (qPCR) (Martinez et al., 2015), mais sensível que o método cultura-dependente.

3.7.1 Método cultura-dependente ISO 11290-2:1998

Para enumeração de *L. monocytogenes* nas fatias de rosbife, adicionou-se água peptonada 0,1 % às bolsas plásticas com as fatias, na proporção de 1:5 (p/p), homogeneizando-se a mistura em stomacher (Biomerieux SA, Marcy l'Etoile, França) por 1 min em temperatura ambiente. As misturas obtidas foram submetidas à diluição decimal seriada em água peptonada 0,1 %, transferindo-se 0,1 mL de cada diluição para placas contendo ágar PALCAM (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), em duplicatas. As placas foram incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24-48 h e as colônias típicas de *L. monocytogenes* foram enumeradas, expressando-se os resultados em UFC/g.

Para enumeração de *L. monocytogenes* no fatiador, utilizou-se a técnica de esfregaço de superfície, conforme o item 3.1. Os cotonetes foram transferidos individualmente para tubos contendo 10 mL de água peptonada 0,1 %, e, após agitação em vortex por 30 s, as suspensões foram submetidas às diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1 %, que foram semeadas em duas placas de ágar PALCAM (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). As placas foram incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24-48 h e as colônias típicas de *L. monocytogenes* foram enumeradas, expressando-se os resultados em UFC por cm².

3.7.2 Método cultura-independente Real time PCR (qPCR)

3.7.2.1 Extração do DNA

Cada fatia de rosbife (aproximadamente 4 g) foi subdividida em quatro porções de 1 g, que foram transferidas separadamente para quatro bolsas plásticas estéreis (Nasco, Fort Atkinson, USA), às quais foram adicionados 10 mL de tampão fosfato salino (PBS; pH 7,4). As misturas foram homogeneizadas por 2 min em stomacher (Biomerieux SA, Marcy l'Etoile, França), transferidas para um tubo Falcon (Corning, New York, USA) e centrifugadas por 5

min a 6000 x g a 4 °C. Os sobrenadantes foram retirados e transferidos para novos tubos Falcon, centrifugando-se por 15 min a 20000 x g a 4 °C. Os sobrenadantes foram removidos e os sedimentos ressuspensos com 200 µL de PBS. As quatro suspensões foram misturadas em um único microtubo de 1,5 mL (Eppendorf®, Sigma-Aldrich, USA), adicionando-se mais 200 µL de PBS, completando-se 1,0 mL. Essa mistura foi centrifugada por 15 min a 20000 x g, descartando-se o sobrenadante.

O sedimento resultante foi suspenso em 200 µL de tampão enzimático, composto por lisozima 20 mg/mL (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil); Tris-HCl 1M, pH 8,0, EDTA 0,5M, pH 8,0, sacarose 20%. Após 1 h a 37 °C, o DNA bacteriano foi extraído, empregando-se o kit comercial QIAamp DNA Mini and Blood Mini (Qiagen, Hilden, Alemanha) para bactérias Gram positivas. Para isso, a mistura foi adicionada de 25 µL de proteinase K e 200 µL do tampão AL, que fazem parte do kit. Após homogeneização no vortex, o material foi incubado a 56 °C por 30 min e a 95° C por 15 min. Em seguida, adicionaram-se 500 µL de etanol gelado (Labsynth, São Paulo, Brasil). A mistura foi transferida para a coluna spin, que acompanha o kit, que foi centrifugada por 1 min a 6000 x g. Ao sedimento resultante adicionaram-se 500 µL do tampão AW1, que acompanha o kit, com centrifugação por 1 min a 6000 x g e, em seguida, 500 µL do tampão AW2, que também acompanha o kit, com centrifugação por 3 min a 20000 x g. Ao sedimento final adicionaram-se 200 µL de tampão de eluição AE, que também acompanha o kit, centrifugando-se por 1 min a 6000 x g. O sedimento obtido foi descartado, e o sobrenadante, utilizado para os testes de qPCR. A concentração do DNA extraído foi determinada no Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), medindo-se a absorbância a 260 nm. A pureza do DNA foi determinada, calculando-se a razão entre as absorbâncias a 260 nm e a 280 nm, considerando-se adequada quando a razão resultante estava entre 1.7 e 1.9.

3.7.2.2 Ensaio de qPCR

A enumeração de *L. monocytogenes* por qPCR foi feita empregando-se o sistema de detecção ABI-PRISM 7500 (Applied Biosystems, Bridgewater, NJ, USA) e o kit Mericon *L. monocytogenes* (Qiagen, Hilden, Alemanha), construindo-se uma curva padrão com 10^7 a 10^0 cópias do genoma de *L. monocytogenes* equivalentes por reação (Martinez et al., 2015). Para a curva padrão de *L. monocytogenes*, o DNA genômico foi extraído de culturas puras de *L. monocytogenes*, usando-se o kit comercial QIAamp DNA Mini and Blood Mini (Qiagen, Hilden, Alemanha) já descrito anteriormente. Considerando-se que o tamanho médio do

genoma de *L. monocytogenes* é 3 milhões de pares de bases (CHEN et al., 2011), calculou-se a concentração do DNA necessária para realização da curva padrão. O programa de amplificação consistiu de uma etapa a 95° C durante 1 min, seguida de 40 ciclos de 95° C durante 15 s, 60° C durante 1 min e 72° C durante 10 s. Os valores do limiar de detecção (threshold) foram determinados automaticamente pelo equipamento ABI-PRISM 7500. Os coeficientes de eficiência de amplificação obtidos nessa metodologia variaram de 104% a 105%, enquanto os coeficientes de correlação (R^2) da curva padrão foi acima de 0,97. Todas as amplificações incluíram controles negativos (NTC) e controles internos (IC). Os experimentos foram repetidos duas vezes, com triplicatas para cada ensaio.

3.7.2.3 Curva padrão e eficiência de amplificação

Para interpretação dos resultados obtidos pelo método qPCR foi construída uma curva padrão para correlacionar os valores do ciclo limiar (C_T), fornecidos automaticamente pelo programa do equipamento ABI-PRISM 7500 para cada amostra analisada, com contagem em log UFC/g (MARTÍN et al. 2006). A eficiência de amplificação foi analisada de acordo com o valor de R^2 gerado pela equação da reta que relaciona os valores de C_T com as diluições da curva padrão de *L. monocytogenes* (Figura 5). Quanto mais próximo de 1 (100%) o valor de R^2 , mais eficiente é a amplificação.

Figura 5. Curva padrão de qPCR para *L. monocytogenes*. Os valores de C_T são as médias $\pm$ DP de 3 triplicatas.

3.8 Análise dos dados

Os valores das contagens de *L. monocytogenes* nas fatias foram expressos como médias $\pm$ desvio padrão, considerando-se as triplicatas realizadas.

Neste estudo, as taxas de transferências (%TT) foram calculadas de acordo com Montville & Schaffner, 2003, empregando-se a equação:

$$\%TT = [(Q_{destino} \div Q_{fonte}) \times 100] \quad (1)$$

Onde $Q_{destino}$ corresponde à contagem de *L. monocytogenes* na fatia de rosbife considerada e Q_{fonte} corresponde à contagem de *L. monocytogenes* na fatia de rosbife que causou a contaminação experimental do fatiador. Os dados foram compilados e transformados em logaritmos em planilhas de Excel (Microsoft, EUA).

As equações matemáticas Exponencial (Eq. (2)), Linear (Eq. (3)), Logarítmica (Eq. (4)) e Polinomial (Eq. (5)), foram selecionadas para descrever a influência do nível de contaminação inicial e da exposição ou não da cepa de *L. monocytogenes* ao sanitizante na transferência do patógeno através das fatias obtidas, baseando-se nos estudos de contaminação e parâmetros estatísticos (SHEEN; HWANG, 2008; SHEEN; HWANG, 2010, AARNISALO et al., 2007). O ajuste das equações, através de análise de regressão, foi feito no software Excel (Microsoft, EUA).

$$y = A.e^{(Bx)} \quad (2)$$

$$y = A.(x) + B \quad (3)$$

$$y = A.In(x) + B \quad (4)$$

$$y = A.(x)^2 + B.(x) + C \quad (5)$$

Onde Y é a contagem (log UFC/g) de *L. monocytogenes* e X é o número da fatia. A, B e C são coeficientes (constantes) derivados da análise de regressão.

Para comparação do ajuste das equações foram utilizados o coeficiente de determinação (R^2) e o teste T de student. O coeficiente de determinação foi utilizado como parâmetro que quantifica a qualidade da equação matemática em relação a sua capacidade de estimar corretamente os valores da variável resposta, considerando-se que $R^2 > 0,7$ indica ajuste aceitável em estudos de contaminação cruzada (Sheen et al, 2010). O resultado do teste T de student ($p < 0,05$) foi utilizado para verificar se a variável X realmente apresenta poder explicativo sobre o Y, e se os coeficientes são estatisticamente diferentes de zero. O teste T-

student foi realizado utilizando-se o software Statistica, versão 12 (Statsoft, In 2013, Tulsa, OK74104, USA) e o intervalo de confiança avaliado foi de 95 % sendo $\alpha = 0,05$ (nível de significância).

4 RESULTADOS

4.1 Presença de *Listeria monocytogenes* no fatiador higienizado e nas peças de rosbife adquiridas do comércio

Tanto as áreas do fatiador (lâmina, placa de calibre, bandeja de transporte e área de recolha) amostradas quanto as peças de rosbife adquiridas no comércio local foram negativas para *L. monocytogenes*. Estes resultados da eficiência dos procedimentos de limpeza e sanitização são de grande importância frente à contaminação ambiental com *L. monocytogenes* que poderia ser esperada no laboratório onde os experimentos foram realizados, pelos outros trabalhos de pesquisa em andamento.

4.2 Enumeração de *Listeria monocytogenes* nas fatias de rosbife utilizadas para contaminação do fatiador

As contagens médias de *L. monocytogenes* não exposta e exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat, nas fatias de rosbife obtidas após a imersão das peças nas suspensões contendo o patógeno nos dois níveis de contaminação estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Enumeração (log UFC/g) de *L. monocytogenes* não exposta e exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat nas fatias de rosbife obtidas após a imersão das peças de rosbife nas suspensões contendo ~8 log UFC/mL e ~4 log UFC/mL

Nível de Contaminação	<i>L. monocytogenes</i> não exposta ao sanitizante	<i>L. monocytogenes</i> exposta ao sanitizante
~8 log UFC/mL	5,14 ± 0,2 a	4,69 ± 0,3 b
~4 log UFC/mL	1,05 ± 0,2 b	3,32 ± 0,1 a

^{a,b} Valores na mesma linha seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

4.3 Transferência de *Listeria monocytogenes* para as fatias de rosbife durante o fatiamento no fatiador experimentalmente contaminado

4.3.1 Cenário de alto nível de contaminação

Para o cenário de alto nível de contaminação do fatiador, foi possível fazer a enumeração de *L. monocytogenes* até 120ª fatia no caso da cepa não exposta ao sanitizante e até a 200ª fatia no caso da cepa exposta ao sanitizante (Tabela 2 e Figura 6).

Tabela 2. Enumeração de *L. monocytogenes*, não exposta e exposta ao sanitizante, nas fatias de rosbife obtidas no fatiador experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com alto nível de contaminação.

Fatias	Enumeração (log UFC/g $\pm$ DP)	
	<i>L. monocytogenes</i> não exposta ao sanitizante	<i>L. monocytogenes</i> exposta ao sanitizante
1	3,30 $\pm$ 0,5	3,65 $\pm$ 1,0
3	2,80 $\pm$ 0,5	3,05 $\pm$ 0,9
10	3,07 $\pm$ 0,2	2,05 $\pm$ 0,1
20	3,14 $\pm$ 0,2	2,00 $\pm$ 0,0
45	2,27 $\pm$ 0,2	2,35 $\pm$ 0,1
90	2,00 $\pm$ 0,0	1,65 $\pm$ 0,9
120	2,00 $\pm$ 0,0	0,72 $\pm$ 1,2
140	<1,00	1,12 $\pm$ 0,1
200	<1,00	1,50 $\pm$ 0,7

Figura 6. Enumeração de *L. monocytogenes* não exposta (A) e exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat (B) nas fatias de rosbife obtidas no fatiador experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com alto nível de contaminação.

4.3.2 Cenário de baixo nível de contaminação

Também para o cenário de baixo nível de contaminação do fatiador, foi possível fazer a enumeração de *L. monocytogenes* até 120ª fatia no caso da cepa não exposta ao sanitizante e até a 200ª fatia no caso da cepa exposta ao sanitizante (Tabela 3 e Figura 7). Os valores em log UFC/g foram calculados de acordo com a equação da Figura 5, onde $Y = -3,0671(X + 3,6871)$, sendo $X = C_T$ de cada amostra, fornecido pelo ABI-PRISM 7500 (item 3.7.2.3).

Tabela 3. Enumeração de *L. monocytogenes*, não exposta e exposta ao sanitizante, nas fatias de rosbife quando o fatiador foi experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com baixo nível de contaminação

Fatia	Enumeração (log UFC/g $\pm$ DP)	
	<i>L. monocytogenes</i> não exposta ao sanitizante	<i>L. monocytogenes</i> exposta ao sanitizante
1	0,57 $\pm$ 0,2	2,54 $\pm$ 0,1
3	0,01 $\pm$ 0,0	2,15 $\pm$ 0,0
10	0,06 $\pm$ 0,1	2,08 $\pm$ 0,0
20	0,22 $\pm$ 0,3	1,73 $\pm$ 0,1
45	ND	1,28 $\pm$ 0,0
90	0,97 $\pm$ 0,1	0,46 $\pm$ 0,2
120	0,03 $\pm$ 0,0	0,53 $\pm$ 0,6
140	ND	0,49 $\pm$ 0,4
200	ND	0,21 $\pm$ 0,2

ND – Não detectável.

Figura 7. Enumeração de *L. monocytogenes* não exposta (A) e exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat (B) nas fatias de rosbife obtidas no fatiador experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com baixo nível de contaminação.

4.4 Taxas de transferência de *Listeria monocytogenes* não exposta e exposta ao sanitizante

4.4.1 Cenário de alto nível de contaminação

As taxas de transferência de *L. monocytogenes* para as fatias de rosbife, quando o fatiador foi experimentalmente contaminado com alto nível de contaminação, expressas em % TT e log % TT estão apresentadas na Tabela 4. Na Figura 8, as taxas de transferência, expressas em log % TT, são mostradas graficamente.

Tabela 4. Taxas de transferência (%TT e log %TT) de *L. monocytogenes*, não exposta e exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat, para as fatias de rosbife quando o fatiador foi experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com alto nível de contaminação.

Fatia	%TT		Log %TT	
	<i>L. monocytogenes</i> não exposta ao sanitizante	<i>L. monocytogenes</i> exposta ao sanitizante	<i>L. monocytogenes</i> não exposta ao sanitizante	<i>L. monocytogenes</i> exposta ao sanitizante
1	2,02	24,02	0,31	1,38
3	0,59	5,04	-0,23	0,70
10	0,90	0,21	-0,05	-0,68
20	1,06	0,18	0,02	-0,75
45	0,16	0,49	-0,80	-0,31
90	0,02	0,15	-1,64	-0,83
120	0,03	0,09	-1,47	-1,05
140	NA	0,12	NA	-0,92
200	NA	0,09	NA	-1,05

NA = Não se aplica.

Figura 8. Taxas de transferência (log %TT) de *L. monocytogenes*, não exposta e exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat, nas fatias de rosbife obtidas quando o fatiador foi experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com alto nível de contaminação.

As taxas de transferência para a primeira fatia de rosbife obtida, tanto da cepa de *L. monocytogenes* não exposta ao sanitizante como da cepa exposta, foram mais altas do que para as demais fatias. As taxas de transferência para as fatias seguintes diminuíram, mas não foi possível verificar com clareza se a queda das taxas de transferência da cepa não exposta ao sanitizante foi diferente da observada para cepa exposta ao sanitizante. No caso da cepa não exposta ao sanitizante, não foi possível calcular as taxas de transferências a partir da 120ª fatia, pois as contagens de *L. monocytogenes* nessas fatias ficaram abaixo do limite de detecção da técnica utilizada.

4.4.2 Cenário de baixo nível de contaminação

As taxas de transferência de *L. monocytogenes* para as fatias de rosbife quando o fatiador foi experimentalmente contaminado com baixo nível de contaminação, expressas em %TT e log %TT, estão apresentadas na Tabela 5. Na Figura 9, as taxas de transferência, expressas em log %TT, são mostradas graficamente.

Tabela 5. Taxas de transferência (%TT e log %TT) de *L. monocytogenes*, não exposta e exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat, para as fatias de rosbife quando o fatiador foi experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com baixo nível de contaminação.

Fatia	%TT		Log %TT	
	<i>L. monocytogenes</i> não exposta ao sanitizante	<i>L. monocytogenes</i> exposta ao sanitizante	<i>L. monocytogenes</i> não exposta ao sanitizante	<i>L. monocytogenes</i> exposta ao sanitizante
1	33,03	16,49	1,52	1,22
3	9,15	6,78	0,96	0,83
10	10,36	5,74	1,02	0,76
20	15,02	2,60	1,18	0,42
45	NA	34,72	NA	1,54
90	83,98	0,14	1,92	-0,86
120	9,54	0,16	0,98	-0,79
140	NA	0,89	NA	-0,05
200	NA	1,15	NA	0,06

NA = Não se aplica.

Figura 9. Taxa de transferência (log %TT) de *L. monocytogenes*, não exposta e exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat, nas fatias de rosbife obtidas quando o fatiador foi experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com baixo nível de contaminação.

Considerando-se o baixo nível de contaminação, as diferenças nas taxas de transferência de *L. monocytogenes* para as fatias foram menos evidentes, não sendo possível verificar o quanto diminuiriam após a primeira fatia, como ocorrido com o alto nível de contaminação. Essa dificuldade de avaliação dos resultados é certamente decorrente da grande variabilidade nos resultados de quantificação de *L. monocytogenes* nas fatias de rosbife obtidas nesse cenário, obtida por qPCR.

4.5 Análise de Regressão

4.5.1 Cenário alto nível de contaminação

A Figura 10 e 11 apresentam os melhores ajustes das equações matemáticas aos dados observados nos experimentos com *L. monocytogenes* não exposta ao sanitizante, em alto nível de contaminação.

Figura 10. Ajuste das equações matemáticas (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) da enumeração de *L. monocytogenes* não exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat nas fatias de rosbife obtidas no fatiador experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com alto nível de contaminação. Modelo Exponencial (A) e Linear (B).

Figura 11. Ajuste das equações matemáticas (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) da enumeração de *L. monocytogenes* não exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat nas fatias de rosbife obtidas no fatiador experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com alto nível de contaminação. Modelo Logarítmico (C) e Polinomial (D).

As equações e os parâmetros estatísticos (R^2 e p-valor) estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Equações matemáticas e parâmetros estatísticos para dados de transferência de *L. monocytogenes* não exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat nas fatias de rosbife quando o fatiador foi experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com alto nível de contaminação

Variável	Equação	Parâmetro		Modelo
		R ²	Teste t (p-valor)	
Fatia (X)	$Y = 3,101 \cdot \text{EXP}^{(-0,004 \cdot X)}$	0,837	0,04	Exponencial
	$Y = -0,010 \cdot X + 3,094$	0,804	0,04	Linear
	$Y = -0,263 \cdot \ln(X) + 3,387$	0,706	0,003	Logarítmico
	$Y = 9E-0,5 \cdot X^2 - 0,021 \cdot X + 3,208$	0,853	0,03	Polinomial

Os coeficientes de determinação (R²) foram superiores a 0,7 para todas as equações (Exponencial = 0,84, Linear = 0,80, Logarítmica = 0,71 e Polinomial = 0,85), indicando bom ajuste dos dados experimentais. Por exemplo, a equação exponencial estudada explica 84% da variação total das contagens de *L. monocytogenes*, enquanto a equação logarítmica, explica 71% da variação das respostas. Para todas as equações estudadas o p-valor é menor que o nível de significância (p<0,05), ou seja, a variável (X) possui poder explicativo sobre a contagem de *L. monocytogenes*.

Em relação à *L. monocytogenes* exposta ao sanitizante, em alto nível de contaminação, apenas a curva logarítmica apresentou R²>0,7 e p<0,05 (Tabela 7 e Figura 12).

Figura 12. Ajuste da equação logarítmica (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) da enumeração de *L. monocytogenes* exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat nas fatias de rosbife obtidas no fatiador experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com alto nível de contaminação.

As equações e os parâmetros estatísticos (R^2 e p-valor) estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Equações matemáticas e parâmetros estatísticos para dados de transferência de *L. monocytogenes* exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat nas fatias de rosbife quando o fatiador foi experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com alto nível de contaminação

Variável	Equação	Parâmetro		Modelo
		R^2	Teste t (p-valor)	
Fatia (X)	$Y = 2,596. EXP (-0,005. X)$	0,537	0,21	Exponencial
	$Y = -0,009. X + 2,687$	0,565	0,002	Linear
	$Y = -0,453. \ln(X) + 3,506$	0,833	0,001	Logarítmico
	$Y = 0,001. X^2 - 0,028. X + 3,027$	0,762	0,08	Polinomial

Para o cenário de alto nível de contaminação com *L. monocytogenes* exposta ao sanitizante, os dados observados experimentalmente se ajustaram apenas às equações Logarítmica ($R^2 = 0,83$) e Polinomial ($R^2 = 0,76$) estudadas, sendo que apenas a equação Logarítmica apresentou $R^2 > 0,7$ e $p < 0,05$.

4.5.2 Cenário baixo nível de contaminação

Para o cenário de baixo nível de contaminação com *L. monocytogenes* não exposta ao sanitizante, os dados experimentais não se ajustaram as equações estudadas. Os dados apresentaram alta dispersão.

A Figura 13 apresenta os melhores ajustes das equações matemáticas aos dados observados nos experimentos com *L. monocytogenes* exposta ao sanitizante em baixo nível de contaminação.

Figura 13. Ajuste das equações matemáticas (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) da enumeração de *L. monocytogenes* exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat nas fatias de rosbife obtidas no fatiador experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com baixo nível de contaminação. Modelo Linear (A) e Logarítmico (B).

As equações matemáticas e os parâmetros estatísticos (R^2 e p-valor) estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Equações matemáticas e parâmetros estatísticos para dados de transferência de *L. monocytogenes* exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat nas fatias de rosbife quando o fatiador foi experimentalmente contaminado pelo fatiamento de peças de rosbife com baixo nível de contaminação

Variável	Equação	Parâmetro		Modelo
		R ²	Teste t (p-valor)	
Fatia (x)	$Y = 2,214 \cdot EXP^{(-0,012 \cdot X)}$	0,952	0,07	Exponencial
	$Y = -0,011 \cdot X + 2,071$	0,855	0,001	Linear
	$Y = -0,457 \cdot \ln(X) + 2,784$	0,925	0,001	Logarítmico
	$Y = 7E-05 \cdot X^2 - 0,025 \cdot X + 2,316$	0,967	0,1	Polinomial

Para o cenário de baixo nível de contaminação com *L. monocytogenes* exposta ao sanitizante, os dados observados experimentalmente se ajustaram as equações Linear ($R^2 = 0,85$) e Logarítmica ($R^2 = 0,92$) estudadas, sendo que ambas apresentaram $R^2 > 0,7$ e $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho indicam que *L. monocytogenes*, quando presente em uma peça de rosbife, pode contaminar o fatiador e ser transferida para um grande número de fatias obtidas subsequentemente. A contaminação cruzada observada durante o fatiamento aconteceu independentemente do nível de contaminação da peça que causou a contaminação do fatiador e da exposição do patógeno ao sanitizante utilizado para a higienização do fatiador, utilizado em concentração insuficiente para sua eliminação.

A contaminação cruzada durante o fatiamento de alimentos tem sido alvo de muitos estudos, principalmente daqueles que objetivam construir modelos preditivos para descrever matematicamente o fenômeno e avaliar o grau de importância dos inúmeros fatores interferentes. Além do micro-organismo e do nível de contaminação do fatiador, a contaminação cruzada depende das características do alimento, temperatura no ambiente de fatiamento, afiação da lâmina, velocidade de rotação da lâmina, força de corte, tempo para adesão à lâmina de corte, entre outros (AARNISALO et al, 2007; PÉREZ-RODRIGUEZ et al, 2007; SHEEN, 2008; SHEEN & HWANG, 2008, SHEEN & HWANG, 2010). Nestes estudos de modelagem citados, a transferência de patógenos foi avaliada em três cenários diferentes: 1. de produtos experimentalmente contaminados para fatiadores; 2. de fatiadores experimentalmente contaminados diretamente com patógeno para produtos não contaminados e 3. de fatiadores contaminados indiretamente por fatiamento de produtos experimentalmente contaminados, para produtos não contaminados. Para a realização deste trabalho, o cenário 3 foi o escolhido, porque, além de simular de forma mais real a contaminação cruzada que ocorre no varejo, os resultados impactam diretamente o consumidor.

Em relação aos resultados obtidos de transferência de *L. monocytogenes* não exposta ao sanitizante durante o fatiamento, foi possível enumerar o patógeno até a 120ª fatia obtida após a contaminação do fatiador, tanto no cenário de baixo nível de contaminação quando no de alto nível de contaminação (Tabelas 2 e 3), evidenciando que a contaminação cruzada ocorreu independentemente do nível de contaminação da peça que causou a contaminação do fatiador. No entanto, quando as fatias nas quais não foi possível enumerar *L. monocytogenes* (i.e, quando não foi atingido o nível de detecção de método de enumeração) foram submetidas a uma etapa de enriquecimento, observou-se positividade até a 200ª fatia obtida. Em um estudo similar ao realizado neste trabalho, Aarnisalo et al. (2007b) observaram que quando salmão marinado, experimentalmente contaminado na superfície com *L. monocytogenes* (8 log UFC/filé), era submetidos ao fatiamento em um fatiador manual, o fatiador contaminava-

se de tal forma que, quando novos produtos eram fatiados, o patógeno podia ser detectado até a última fatia analisada (39ª fatia). Também Sheen e Hwang (2008) trabalharam com presunto experimentalmente contaminado na superfície com três níveis de *L. monocytogenes* (3, 6 e 9 log UFC/cm²) e observaram que, após o fatiamento, o patógeno podia ser detectado em novas fatias obtidas posteriormente até a 150ª fatia quando a contaminação inicial era de 9 log UFC/cm². Para níveis de contaminação mais baixos, os resultados não foram consistentes. Em outro estudo, Chen, Zhao e Doyle (2014) investigaram a transferência de *L. monocytogenes*, *Salmonella* e *Escherichia coli* O157:H7 durante o fatiamento de produtos prontos para consumo (queijos, presunto, rosbife), empregando dois cenários (dos produtos contaminados para o lamina do fatiador e do fatiador contaminado para novos produtos). Os autores observaram que, quando a contaminação da lamina de corte resultante era de 8,5 log UFC/lâmina, os patógenos eram detectados até a última fatia testada (61ª fatia), independentemente do tipo de alimento considerado.

De acordo com os resultados dos estudos descritos acima, especialmente o de Sheen e Hwang (2010), a contaminação cruzada simulada observada quando os fatiadores são contaminados com a adição direta dos patógenos à lamina de corte é diferente da que ocorre quando a lamina contamina-se pelo fatiamento de um produto contaminado. Segundo os autores, mais células de *L. monocytogenes* foram transferidas da lamina para o presunto quando a lamina foi contaminada pelo fatiamento de presunto contaminado do que quando a lâmina foi contaminada pela adição direta do patógeno. Segundo os autores, essa observação merece uma reflexão pois enquanto a adesão do patógeno ao metal da lâmina é mais intensa do que a um alimento devido às suas características químicas, a adição direta do patógeno à lamina pode resultar na formação de nichos em rachaduras e irregularidades, nos quais o patógeno fica mais protegido da remoção pelo movimento de fatiamento. Midelet e Carpentier (2002) já haviam indicado que a adesão de bactérias patogênicas às superfícies (biofilmes) depende do micro-organismo e do material da superfície. Esses autores observaram que a *L. monocytogenes* adere mais fortemente a polímeros que outros patógenos e a força de adesão ao aço inoxidável é maior do que ao policloreto de polivinila (PVC) e ao poliuretano (PU), que são materiais comumente utilizados em indústrias de alimentos. Apesar disso, os modelos desenvolvidos por estes autores mostraram que a adesão depende mais do tamanho da população microbiana do que das características da superfície.

Há poucos estudos na literatura sobre contaminação cruzada em alimentos durante fatiamento, quando o nível de contaminação é baixo. Sheen e Hwang (2008), ao testarem três níveis diferentes de contaminação da superfície de presunto (3, 6 e 9 log UFC/cm²),

observaram que com 3 log UFC/cm² a transferência ocorria de um modo aleatório, não sendo possível concluir nada nem construir um modelo matemático que representasse essa transferência. O mesmo foi observado por Lin et al. (2006), que mesmo realizando enriquecimento das fatias para detectar *L. monocytogenes*, o patógeno foi detectado em poucas fatias (apenas 12/200, 7/200 e 1/200 fatias de peru, salame e salsicha, respectivamente). Também Vorst et al. (2006) observaram que a mensuração da contaminação cruzada com *L. monocytogenes* era falha quando baixos níveis de inóculo da lâmina de fatiamento (5 e 3 log UFC/lâmina) eram utilizados, mesmo submetendo as fatias obtidas a uma etapa de enriquecimento. No estudo de Pérez-Rodríguez et al (2007), que também testou três níveis de contaminação da lamina do fatiador (8, 6 e 4 log UFC/lamina) com *Escherichia coli* O157:H7 e *Staphylococcus aureus*, foi relatado que a transferência diminuía logaritmicamente quando os inóculos de 8 e 6 log UFC/lamina eram considerados, mas para o inóculo mais baixo não foi possível obter contagens nas fatias. Esses autores também observaram que quando a análise empregou o enriquecimento, todas as 20 fatias testadas eram positivas para *E. coli* O157:H7 mas não para *S. aureus*.

A dificuldade de avaliar a contaminação cruzada durante o fatiamento quando o nível de contaminação é baixo, relatada nos estudos mencionados, poderia ser atribuída à insuficiência de sensibilidade do método de contagem de *L. monocytogenes* adotado. No entanto, neste estudo foi adotado o método de qPCR, que não depende de formação de colônias visíveis para sua enumeração (método cultura independente), e mesmo assim os resultados apresentaram grande variação, dificultando a sua interpretação.

Ainda em relação à interferência do tipo de micro-organismo e nível de contaminação da lamina do fatiador na transferência de patógenos durante o fatiamento de alimentos, Pérez-Rodríguez et al. (2007) observaram que o tamanho do inóculo não influenciou a transferência de *Escherichia coli* O157:H7 e *Staphylococcus aureus* de uma máquina de corte contaminada e um produto cozido, durante o fatiamento, mas o tipo de micro-organismo influenciou significativamente os coeficientes de transferência. Os autores detectaram que houve uma interação entre o nível de inóculo e o coeficiente de transferência para *S. aureus* mas não para *E. coli*.

Entre os inúmeros fatores que podem influenciar a contaminação cruzada durante o fatiamento de produtos prontos para consumo, a composição do produto merece destaque já que este estudo foi desenvolvido com um produto cárneo pouco estudado ainda. O rosbife “do tipo caseiro” apresenta características intrínsecas peculiares pois é fabricado sem adição de adjuvantes tecnológicos ou compostos antimicrobianos, e apresenta características intrínsecas

próprias. O rosbife é preparado com o músculo bovino Semitendinosus, e apresenta textura mais fibrosa e umidade externa e teor de gordura inferiores aos demais produtos cárneos prontos para consumo estudados, como presunto e salames. Embora não tenha sido o objetivo deste trabalho comparar diferentes tipos de produtos cárneos, estas características do rosbife podem explicar algumas diferenças em relação aos resultados observados em outros estudos. Vorst et al (2006) estudaram a transferência de *L. monocytogenes* em três produtos contaminados (peito de peru, mortadela e salame com alto e baixo nível) durante o fatiamento e observaram que havia diferenças visíveis na sujidade das lâminas durante o fatiamento. Segundo esses autores, o teor de gordura mais elevado e a umidade mais baixa do salame favoreceram a formação de uma camada de gordura na lamina do fatiador, o que pode ter prolongado a transferência de *L. monocytogenes* durante o fatiamento, aumentando o risco para os consumidores.

Em relação aos experimentos com *L. monocytogenes* exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat, foi possível fazer enumeração até a 200ª fatia de rosbife obtida após a contaminação experimental do fatiador, independentemente do nível de contaminação da peça de rosbife que causou a contaminação do fatiador (Tabelas 2 e 3). A presença de *L. monocytogenes* exposta ao sanitizante em um maior número de fatias do que a observada para *L. monocytogenes* não exposta ao sanitizante sugere que a exposição ao sanitizante causou um estresse fisiológico nas células que permitiu menor adesão de *L. monocytogenes* à lamina do fatiador, aumentando sua eliminação ao longo do fatiamento. Esse comportamento foi também observado por Sheen, Hwang e Juneja (2011) que estudaram a multiplicação de *L. monocytogenes* após exposição ao cloro em presunto durante o armazenamento refrigerado. O tratamento não eliminou *L. monocytogenes*, mas houve um retardo na multiplicação no início do armazenamento. Também Keskinen et al. (2008) verificaram que *L. monocytogenes* sob superfícies durante o corte, verificaram que a exposição de *L. monocytogenes* a 100 ppm de cloro por 1 min causou estresse celular, mas não prejudicou significativamente a sobrevivência ou a transferência, quando comparado com os micro-organismos não tratados. Segundo estes autores, as modificações celulares decorrentes da exposição a um sanitizante podem alterar a sensibilidade a outros agentes de estresse, fazendo com que o patógeno permaneça viável nas superfícies por longos períodos. As modificações em estruturas celulares podem transformar bactérias inicialmente sensíveis em tolerantes aos sanitizantes (SHEEN; HWANG, 2010; CARPENTIER; CERF, 2011; BISBIROULAS et al., 2011).

Em relação a análise de regressão, foi possível obter as equações matemáticas que apresentaram a melhor função para descrever os dados experimentais. As equações

matemáticas foram estudadas porque é fundamental explicar ou descrever o fenômeno que ocorre durante a transferência bacteriana entre superfícies, muito influenciada por diversos fatores. Em estudos anteriores, as equações Exponencial, Linear, Logarítmica e Polinomial também tiveram boa capacidade para explicar a transferência de bactérias patogênicas durante o fatiamento (VORST et al, 2006; AARNISALO, 2007, PÉREZ-RODRIGUÉZ et al., 2007; SHEEN, HWANG, 2008; SHEEN, HWANG, 2010).

Analisando os resultados da análise de regressão, observa-se um padrão de redução das contagens de *L. monocytogenes* nas fatias de rosbife ao longo do fatiamento. A redução observada pode ser resultado de dois fenômenos: 1. Transferência durante o fatiamento e 2. Inativação de *L. monocytogenes* na superfície da lâmina devido as condições ambientais desfavoráveis, principalmente umidade e temperatura (POSSAS et al, 2016).

É importante lembrar que, nos estudos em que são utilizadas equações matemáticas para descrever o padrão de transferência de patógenos, empregam-se concentrações elevadas de inóculo, para reduzir a variabilidade e assegurar a repetibilidade dos resultados (SHEEN; HWANG, 2010). Entretanto, são necessários estudos da transferência bacteriana em baixas concentrações, pois refletem de maneira mais adequada o que ocorre no varejo. No entanto, no cenário de baixo nível de contaminação estudado ocorreu uma maior variabilidade dos resultados, o que tem ocorrido também em outros estudos dessa natureza (PÉREZ-RODRIGUÉZ et al., 2007; SHEEN, HWANG, 2008).

Embora outros pesquisadores tenham investigado e descrito a transferência de patógenos durante o fatiamento de alimentos prontos para o consumo, esse trabalho é o primeiro a examinar o efeito do uso de um sanitizante, utilizado em concentrações insuficientes para eliminar *L. monocytogenes*, na transferência deste patógeno durante o fatiamento de rosbife. Além disso, esse estudo foi pioneiro na utilização da técnica de qPCR para avaliar a contaminação cruzada em nível baixo de contaminação.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho comprovou quantitativamente a ocorrência de transferência (contaminação cruzada) de *L. monocytogenes* durante o fatiamento de rosbife em estabelecimentos comerciais. Empregando simulações laboratoriais, foi demonstrado que a contaminação de fatiadores de produtos cárneos utilizados nestes estabelecimentos, pelo fatiamento de produtos contendo *L. monocytogenes*, resulta na transferência deste patógeno até pelo menos a 120ª fatia de uma nova peça de rosbife fatiada posteriormente nestes fatiadores. Nos experimentos realizados com *L. monocytogenes* exposta ao sanitizante Oasis Compac 22 Quat em concentração insuficiente para sua eliminação, foi possível enumerar o patógeno até a 200ª fatia de rosbife obtida após a contaminação experimental do fatiador, independentemente do nível de contaminação da peça de rosbife usada para a contaminação experimental do fatiador. Equações matemáticas resultantes, encontradas nos cenários alto nível de contaminação com *L. monocytogenes* não exposta e exposta ao sanitizante e baixo nível de contaminação com *L. monocytogenes* exposta ao sanitizante, descrevem os dados experimentais obtidos e permitem fazer projeções futuras confiáveis, pelos bons coeficientes de determinação obtidos ($R^2 > 0,7$ e $p < 0,05$). As equações resultantes podem constituir uma ferramenta útil para o desenvolvimento da avaliação de risco de produto cárneo pronto para o consumo para orientar decisões de gestão de risco. Embora avaliar a transferência de *L. monocytogenes* durante o fatiamento é essencialmente importante para evitar ou diminuir a contaminação e surtos envolvendo esse patógeno, vários fatores devem ser considerados na probabilidade de infecção por patógenos transmitidos por alimentos. Deve-se considerar que as características do patógeno, do hospedeiro, a matriz alimentar e o ambiente, pois também desempenham papel importante na probabilidade de infecção. Além disso, a distribuição heterogênea de microrganismos nos alimentos e seu destino durante as fases de comercialização e consumo também influenciarão a probabilidade de ocorrência de infecção. Esses resultados ressaltam a importância de medidas para evitar a ocorrência de contaminação cruzada durante a etapa de fatiamento de produtos cárneos prontos para o consumo, bem como da higienização adequada dos equipamentos utilizados, de forma a fornecer produtos seguros para o consumidor.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARNISALO, K., LUNDÉN, J., KORKEALA, H., WIRTANEN, G. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. **Food Science and Technology**, v.40, p.1041–1048, 2007a.

AARNISALO, K.; SHEEN, S.; TAMPLIN, M. Modelling transfer of *Listeria monocytogenes* during slicing of 'gravad' salmon. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, n.118, p. 69-78, 2007b.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4ª edition. Editora APHA, Washington, D.C., 2001. Chapter 20, p.209-215.

ARAÚJO, P.C.C.; FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T.; CARVALHO, J.C.A.P. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em produtos de carne de peru comercializados na cidade de Niterói, RJ, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.30, n.1, p. 19-25, 2002.

BISBIROULAS, P.; PSYLOU, M.; ILIOPOULOU, I.; BERBERI, A.; MASTRONICOLIS, S.K. Adaptational changes in cellular phospholipids and fatty acid composition of the food pathogen *Listeria monocytogenes* as a stress response to disinfectant sanitizer benzalkonium chloride. **Letters in Applied Microbiology**, v.52, n.3, p.275-280, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº275, de 21 de outubro de 2002. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/DCF7A900474576FA84CFD43FBC4C6735/RDC+N%C2%BA+275,+DE+21+DE+OUTUBRO+DE+2002.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 04 de abr. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos – VE-DTA (2015)**. Disponível em: http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf. Acesso em: mai. 2016.

CABALLERO GÓMEZ, N.; GRANDE, J. M.; PULIDO, R.P.; ABRIQUEL, H.; GÁLVEZ, A. Effect of enterocin AS-48 singly or in combination with biocides on planktonic and sessile *B. cereus*. **Food Control**, v.34, p.5743-751, 2013.

CARPENTIER, B., CERF, O. Review persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. **International Journal of Food Microbiology**, v.145, n.1, p. 1-8, 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) 1998. **Outbreak of listeriosis-united states (1998)**. MMWR Morbidity and mortality weekly report, n.47, p.1085–1086. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00056024.htm>. Acesso: 19 abr., 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) 2000. **Multistate outbreak of listeriosis (2000)**. MMWR Morbidity and mortality weekly report, v. 49, p.1129–1130. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm4950a1.htm>. Acesso: Abr. 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) 2002. **Public health dispatch: outbreak of listeriosis—northern United States (2002)**. MMWR Morbidity and mortality weekly report, v.51, p. 950–951. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5142a3.htm>. Acesso: Abr. 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) 2012. **National Enteric Disease Surveillance: *Listeria* Annual Summary: 2012**. Disponível em: www.cdc.gov/Listeria/pdf/Listeria-annual-summary-2012-508c.pdf. Acesso em abr. 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) 2013. **Reduce Cross-Contamination**. Disponível em: http://www.cdc.gov/niosh/topics/body_art/contamination.html. Acesso em 02 de abr. 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) 2014a. **CDC 2011 Estimates: Findings**. <http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>. Acesso em: mai. 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) 2014b. **Statistic**. <http://www.cdc.gov/listeria/statistics.html>. Acesso em: mai. 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) 2016. **Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Packaged Salads Produced at Springfield, Ohio Dole Processing Facility (Final Update)**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bagged-salads-01-16/index.html>. Acesso: mai. 2016.

CHAITIEMWONG, N.; HAZELEGER, W.C.; BEUMER, R.R.; ZWIETERING, M.H. Quantification of transfer of *Listeria monocytogenes* between cooked ham and slicing machine surfaces. **Food Control**, v.44, p. 177-184, 2014.

CHEN, D.; ZHAO, T.; DOYLE, M.P. Transfer of foodborne pathogens during mechanical slicing and their inactivation by levonic acid-based sanitizer on slicers. **Food Microbiology**, v. 38, p. 263-269, 2014.

CHEN, Y., KUMAR, N., SIDDIQUE, N. 2011. Development and evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay targeting iap for the detection of *Listeria monocytogenes* in select food matrices. *Foodborne Pathology Disease*, v. 8, p.1063-1069, 2011.

CODEX ALIMENTARIUS (CODEX). **Higiene dos Alimentos – Textos Básicos**. Organização Pan-Americana da Saúde; Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Food and Agriculture Organization of the United Nations. – Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2006. 64 p.: il.

DREVETS, D.A.; BRONZE, M.S. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v. 53, n.2, p.:151-165, 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) 2015. **Commercial Deli Slicer Inspection Tips for Food Safety Professionals**. Disponível em: <http://www.fda.gov/food/guidanceregulation/retailfoodprotection/industryandregulatoryassistanceandtrainingresources/ucm240672.htm>. Acesso: abr. 2015.

GARRIDO, V.; VITAS, A.I.; GARCÍA-JALÓN, I. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products: Prevalence by brands and retail establishments for exposure assessment of listeriosis in Northern Spain. **Food Control**, v.20, p.986–991, 2009.

GOULET, V.; KING, L.A.; VAILLANT, V.; DE VALK, H. What is the incubation period for listeriosis? **BMC Infectious Diseases**, v. 10, p.13-11, 2013.

GREEN BROWN, L.; KHARGONEKAR, S.; BUSHNELL, L. Frequency of inadequate chicken cross-contamination prevention and cooking practices in restaurants. **Journal of Food Protection**, v.76, n.12, p.2141-2145, 2013.

HÄCHLER, H.; MARTI, G.; GIANNINI, P.; LEHNER, A.; JOST, M.; BECK, J.; WEISS, F.; BALLY, B.; JERMINI, M.; STEPHAN, R.; BAUMGARTNER, A. Outbreak of listeriosis due to imported cooked ham, Switzerland 2011. **Euro Surveillance**, v.18, n. 18, p. 20469, 2013.

HOELZER, K.; POUILLOT, R.; GALLAGHER, D.; SILVERMAN, M.B.; KAUSE, J.; DENNIS, S. Estimation of *Listeria monocytogenes* transfer coefficients and efficacy of bacterial removal through cleaning and sanitation. **International Journal Food Microbiology**. v.157, n.2, p.267-77, 2012.

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

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11290-1: Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs: Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: Detection method: modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data. Switzerland: ISO, 2004. 16p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11290-2:1998: Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs: Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 2: Enumeration method. Switzerland: ISO, 1998. 19p.

KESKINEN, L.A.; TODD, E.C.; RYSER, E.T. Impact of bacterial stress and biofilm-forming ability on transfer of surface-dried *Listeria monocytogenes* during slicing of delicatessen meats. **International Journal of Food Microbiology**, v.127, n.3, p.298-304, 2008.

LAMONT, R.F.; SOBEL, J.; MAZAKI-TOVI, S.; KUSANOVIC, J.P.; VAISBUCH, E.; KIM, S.K.; ULDBJERG, N.; ROMERO, R. Listeriosis in human pregnancy: a systematic review. **Journal of Perinatal Medicine**, v.39, n.3, p.227-236, 2011.

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 Microbiology**, v.38, n.2, p.287-292, 2007

LIANOU, A.; SOFOS, J.N. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. **Journal of Food Protection**, v.70, n.9, p.2172-98, 2007.

LIN, C.M.; TAKEUCHI, K.; ZHANG, L.; DOHM, C.B.; MEYER, J.D.; HALL, P.A.; DOYLE, M.P. Cross-contamination between processing equipment and deli meats by *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.69, n.1, p.71-79, 2006.

LUNGU, B.; O'BRYAN, C.A.; MUTHAIYAN, A.; MILILLO, S.R.; JOHNSON, M.G.; CRANDALL, P.G.; RICKE, S.C. *Listeria monocytogenes*: antibiotic resistance in food production. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.8, n.5, p.569-78, 2011.

MAITLAND, J.; BOYER, R.; GALLAGHER, D.; DUNCAN, S.; BAUER, N.; KAUSE, J.; EIFERT, J. Tracking cross-contamination transfer dynamics at a mock retail deli market using GloGerm. **Journal of Food Protection**, n.76, v.2, p.272-82, 2013.

MANIOS, S.G.; SKANDAMIS, P.N. Control of *Listeria monocytogenes* in the processing environment by understanding biofilm formation and resistance to sanitizers. **Methods in Molecular Biology**, v.1157, p. 251-261, 2014.

MARQUES, M.V. **Biologia molecular e genética bacteriana**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2012. 348 p.

MARTÍN, B.; JOFRÉ, A.; GARRIGA, M.; PLA, M.; AYMERICH, T. Rapid Quantitative Detection of *Lactobacillus sakei* in Meat and Fermented Sausages by Real-Time PCR. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 9, p. 6040-6048, 2006.

MARTINEZ, R.C.; STALIANO, C.D.; VIEIRA, A.D.; VILLARREAL, M.L.; TODOROV, S.D.; SAAD, S.M.; FRANCO, B.D. Bacteriocin production and inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a in a potentially synbiotic cheese spread. **Food Microbiology**, v.48, p.143-52, 2015.

MIDELET, G.; CARPENTIER, B. Transfer of Microorganisms, Including *Listeria monocytogenes*, from Various Materials to Beef. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.8, p. 4015–4024, 2002.

MILILLO, S.R.; FRIEDLY, E.C.; SALDIVAR, J.C.; MUTHAIYAN, A.; O'BRYAN, C.; CRANDALL, P.G.; JOHNSON, M.G.; RICKE, S.C. A review of the ecology, genomics and stress response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, n.8, p.712-25, 2012

MONTVILLE, R.; SCHAFFNER, D.W. Inoculum size influence bacterial cross contamination between surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n.12, p.7188-93, 2003.

MOORMAN, M.; NETTLETON, W.; RYSER, E.; LINZ, J.; PESTKA, J. Altered Sensitivity to a quaternary ammonium sanitizer in stressed *Listeria innocua*. **Journal of Food Protection**, v.68, n.8, p.1659-63, 2005.

MUÑOZ, A.B.; CHAVES, J.A.; RODRÍGUEZ, E.C.; REALPE, M.E. *Listeria monocytogenes* in food handlers: a new approach to address the dangers in food industry. **Biomedica**, v. 33, n.2, p. 283-291, 2013.

NAIDOO, K.; LINDSAY, D. Potential cross-contamination of the ready-to-eat dried meat product, biltong. **British Food Journal**, v. 112, p. 350–363, 2010.

Organização mundial da Saúde (OMS). Disponível em: http://www.paho.org/bireme/index.php?id=281%3Aseguranca-alimentar-e-tema-do-dia-mundial-da-saude-2015&option=com_content. Acesso em mai.2015.

ORTEGA MORENTE, E.; FERNÁNDEZ-FUENTES, M.A.; GRANDE BURGOS, M.J.; ABRIQUEL, H.; PÉREZ PULIDO, R.; GÁLVEZ, A. Biocide tolerance in bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.162, n.1, p.13-25, 2013.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; VALERO, A.; TODD, E.C.; CARRASCO, E.; GARCÍA-GIMENO, R.M.; ZURERA, G. Modeling transfer of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* during slicing of a cooked meat product. **Meat Science**, v. 76, n.4, p. 692-699, 2007.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; VALERO, A.; CARRASCO, E.; GARCÍA, R.M.; ZURERA, G. Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. **Trends in Food Science e Technology**, v.19, p.131-144, 2008.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; CASTRO, R.; POSADA-IZQUIERDO, G.D.; VALERO, A.; CARRASCO, E.; GARCÍA-GIMENO, R.M.; ZURERA, G. Evaluation of hygiene practices and microbiological quality of cooked meat products during slicing and handling at retail. **Meat Science**, v.86, n.2, p.479-85, 2010.

POSSAS, A.M.; POSADA-IZQUIERDO, G.D.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; GARCÍA-GIMENO, R.M. Modeling the Transfer of Salmonella Enteritidis during Slicing of Ready-to-Eat Turkey Products Treated with Thyme Essential Oil. **Journal of Food Science**, Sep 28, 2016.

PRADHAN, A.K.; IVANEK, R.; GRÖHN, Y.T.; BUKOWSKI, R.; WIEDMANN, M. Comparison of public health impact of *Listeria monocytogenes* product-to-product and environment-to-product contamination of deli-meats at retail. **Journal of Food Protection**, v.74, n.11, p.1860-8, 2011

RAJKOVIC, A.; SMIGIC, N.; UYTENDAELE, M.; MEDIC, H.; DE ZUTTER, L.; DEVLIEGHIERE, F. (2009). Resistance of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* after exposure to repetitive cycles of mild bactericidal treatments. **Food microbiology**, v.26, n.8, p.889-895, 2009.

RISTORI, C.A.; ROWLANDS, R.E.; MARTINS, C.G.; BARBOSA, M.L.; YOSHIDA, J.T.; FRANCO, B.D. Prevalence and populations of *Listeria monocytogenes* in meat products retailed in Sao Paulo, Brazil. **Foodborne Pathogen Disease**, v.11, n.12, p.969-973, 2014.

RYSER, E.T., BUCHANAN, R.L. *Listeria monocytogenes*. In: Doyle, M.P. & Buchanan, R.L. Food Microbiology. **Fundamentals and Frontiers**. ASM Press, USA, 4th ed, 2013, p. 503-545.

SANT'ANA, A.S.; IGARASHI, M.C.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D. Prevalence, populations and pheno- and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat vegetables marketed in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.155, n.1-2, p.1-9, 2012.

SHEEN, S. Modeling surface transfer of *Listeria monocytogenes* on salami during slicing. **Journal of Food Science**, v.73, p. 304-311, 2008.

SHEEN, S.; HWANG, C.A. Mathematical modeling the cross-contamination of *Escherichia coli* O157:H7 on the surface of ready-to-eat meat product while slicing. **Food Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 37-43, 2010.

SHEEN, S.; HWANG, C.A. Modeling transfer of *Listeria monocytogenes* from slicer to deli meat during mechanical slicing. **Foodborne Pathogens Disease**, v.5, p. 135–146, 2008.

SHEEN, S.; HWANG, C.A.; JUNEJA, V.K. Modeling the impact of chlorine on the behavior of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat meats. **Food Microbiology**, v.28, n.5, p.1095-1100, 2011.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. **The epidemiology of human listeriosis**. *Microbes and Infection*, n.9, v.10, p.1236-43, 2007.

TAKEUCHI, K.; FRANK, J.F. Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce tissues as affected by inoculum size and temperature and the effect of chlorine treatment on cell viability. **Journal of Food Protection**, v.63, n.4, p.434-40, 2000.

TALON, R.; LEBERT, I.; LEBERT, A.; LEROY, S.; GARRIGA, M.; AYMERICH, T.; DROSINOS, E.H.; ZANARDI, E.; IANIERI, A.; FRAQUEZA, M.J.; PATARATA, L.; LAUKOVÁ, A. Traditional dry fermented sausages produced in small-scale processing units in Mediterranean countries and Slovakia. 1: Microbial ecosystems of processing environments. **Meat Science**, n.77, v.4, p.570-579, 2007.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) 2012. **FSIS Compliance Guideline: Controlling *Listeria monocytogenes* in Post-lethality Exposed Ready-to-Eat Meat and Poultry Products (2012)**. Disponível em: http://www.fsis.usda.gov/shared/PDF/Controlling_LM_RTE_guideline_0912.pdf. Acesso: abr. 2015.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) 2013. **Interagency Risk Assessment: *Listeria monocytogenes* in Retail Delicatessens (2013)**. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/c0c6dfbc-ad83-47c1-bcb8-8db6583f762b/Lm-Retail-Technical-Report.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: abr.2015.

VÁZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.3, p.584-560, 2001.

VORST, K.L.; TODD, E.C.; RYSER, E.T. Transfer of *Listeria monocytogenes* during slicing of turkey breast, bologna, and salami with simulated kitchen knives. **Journal Food Protection**, v.69, n.12, p.2939-46, 2006.

WINTER, C.H.; BROCKMANN, S.O.; SONNENTAG, S.R.; SCHAUPP, T.; PRAGER, R.; HOF, H.; BECKER, B.; STEGMANN, T.; ROLOFF, H.U.; VOLLRATH, G.; KUHM, A.E.; MEZGER, B.B.; SCHMOLZ, G.K.; KLITTICH, G.B.; PFAFF, G.; PIECHOTOWSKI, I. Prolonged hospital and community-based listeriosis outbreak caused by ready-to-eat scalded sausages. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, n. 2, p. 121-128, 2009.

ZHANG, L.; MOOSEKIAN, S.R.; TODD, E.C.D.; RYSER, E.T.; 2012. Growth of *Listeria monocytogenes* in different retail delicatessen meats during simulated home storage. **Journal of Food Protection**, v. 75, n.5, p. 896–905.