

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**CONTAMINAÇÃO DE CARÇAÇAS E AMBIENTE POR *Listeria* sp. EM
DIFERENTES ETAPAS DO ABATE DE SUÍNOS.**

Dissertação de Mestrado

Andréia Inês Ferronato

Porto Alegre

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**CONTAMINAÇÃO DE CARCAÇAS E AMBIENTE POR *Listeria* sp. EM
DIFERENTES ETAPAS DO ABATE DE SUÍNOS.**

Andréia Inês Ferronato

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Dra. Marisa Ribeiro de Itapema
Cardoso.

Porto Alegre (RS), Brasil

Junho, 2010

Catálogo na Publicação
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

F396c Ferronato, Andréia Inês

Contaminação de carcaças e ambiente por *Listeria* sp. em diferentes etapas do abate de suínos/ Andréia Inês Ferronato. – 2010.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

Orientação: Prof. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

1. Indústrias da carne 2. Contaminação 3. *Listeria monocytogenes* 4. Resistência microbiana a drogas 5. Suínos I. Cardoso, Marisa Ribeiro de Itapema, orient. II. Título.

CDU 579.67 (043)

AGRADECIMENTOS

A professora Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso pela oportunidade, orientação, confiança, amizade e ensinamento.

Aos amigos do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Débora da Cruz Payão Pellegrini, Lilian Kolling, Thais de Campos, Caroline Pissetti, Priscila Guerra, Vanessa Dias, Daniel Paim e Héber Hein pelo carinho, amizade, auxílio e apoio que sempre pode contar. Tenho vocês como parte da minha família.

Agradeço de coração a meus pais Josemar Francisco Ferronato e Salete Inês Ferronato pela infância maravilhosa que tive, e por todo o incentivo em minha caminhada. Ao meu irmão Francisco Júlio Ferronato pelo apoio e carinho. A uma pessoa especial muito especial para mim a qual já não se encontra mais presente entre nós, a minha nona Inês Passeti Zonta, pois foi através dela que aprendi a amar e respeitar os animais, seus ensinamentos ficaram sempre em minha memória, sei que lá de cima você ilumina meu caminho. Seu amor é eterno.

Á todos vocês muito obrigada.

*Pedi força e vigor Deus me mandou dificuldades para me fazer forte
Pedi sabedoria Deus me mandou problemas para resolver
Pedi prosperidade Deus me deu energia e cérebro para trabalhar
Pedi coragem Deus me mandou situações para superar
Pedi amor Deus me mandou pessoas com problemas para eu ajudar
Pedi favores Deus me deu oportunidades
Não recebi nada do que queria,
Mas, recebi tudo o que precisava!
Autor Desconhecido*

RESUMO

CONTAMINAÇÃO DE CARÇAÇAS E AMBIENTE POR *Listeria* sp. EM DIFERENTES ETAPAS DO ABATE DE SUÍNOS¹

Autora: Andréia Inês Ferronato

Orientadora: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

A suinocultura ocupa um lugar de destaque na economia nacional, e, com o intuito de aumentar a disputa por novos mercados, tem buscado a produção de alimentos de qualidade e inócuos. Dentro dessa concepção, a presença de *Listeria monocytogenes* no produto constitui uma preocupação, principalmente devido à gravidade das infecções, veiculadas por alimentos, em humanos. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de *Listeria* sp. em carcaças de suínos em diferentes etapas da linha de abate, verificando os perfis de resistência aos antimicrobianos e identificando grupos clonais de *L. monocytogenes* obtidos por macrorestrição seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE). Suabes de superfície foram coletados no ambiente e na superfície de carcaças após a escalda, flambagem, evisceração e na entrada da câmara fria, em dois abatedouros frigoríficos localizados no Sul do Brasil. Dos 270 suabes analisados, 21 (7,7%) foram positivos para o gênero *Listeria*, distribuídas nas espécies, *L. innocua* (10), *L. monocytogenes* (9), *L. ivanovii* (1) e *L. seeligeri* (1). Os resultados do PFGE demonstraram a existência de dois grupos clonais de *L. monocytogenes*. O primeiro grupo clonal compreendeu cinco isolados de carcaça do sorotipo 1/2c, enquanto o segundo grupo incluiu quatro isolados de carcaça ou ambiente de sorotipos distintos (1/2c, 1/2a e 1/2b). Nos antibiogramas conduzidos, os isolados de *L. monocytogenes* foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados. O gênero *Listeria* foi encontrado no ambiente, bem como contaminando a superfície das carcaças suínas de forma distinta nos dois abatedouros visitados. No frigorífico A apenas uma carcaça antes da flambagem foi positiva (*L. innocua*), enquanto que os demais isolados obtidos foram isolados do ambiente e de carcaças do frigorífico B. Esse estabelecimento apresentava maior acúmulo de água e resíduos no ambiente, além de contar com flambador manual de carcaças e ocorrer o extravasamento de conteúdo intestinal, durante a evisceração com maior frequência do que no frigorífico A. Nas condições encontradas no frigorífico B, grupos clonais de *L. monocytogenes* distribuíram-se nas carcaças e no ambiente.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. 63 pg. Junho, 2010.

ABSTRACT

***Listeria* sp. ISOLATION FROM PORK CARCASSES AND ENVIRONMENT SAMPLED AT DIFFERENT SLAUGHTER LINE STEPS¹.**

Author: Andréia Inês Ferronato

Adviser: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

Pork production contributes significantly to the Brazilian national account, and producers have been trying to achieve opportunities for growth by improving the quality and safety of pork. In this connection, the presence of *Listeria monocytogenes* in pork may be a matter of concern, since food-borne listeriosis is a serious disease in humans. Thus, this study aimed: i. to evaluate the isolation of *Listeria* sp. from pork carcasses after different steps of the slaughter process; ii. to identify clonal groups among *L. monocytogenes* isolates submitted to macro-restriction followed by Pulsed-field electrophoresis (PFGE); iii. to evaluate their antimicrobial resistance profiles. Swabs were taken from the slaughter line environment and from carcasses surface after scalding, flaming and evisceration and before chilling at two slaughterhouses in southern Brazil. From a total of 270 swabs, 21 (7.7%) were positive for genus *Listeria*, distributed in the following species: *L. innocua* (10), *L. monocytogenes* (9), *L. ivanovii* (1), and *L. seeligeri* (1). PFGE results showed two clonal groups among *L. monocytogenes* isolates. The first group encompassed five carcass isolates from serotype 1/2c, while the second group included four isolates from carcass or environment belonging to different serotypes (1/2c, 1/2b and 1/2a). Antibiograms demonstrated that all *L. monocytogenes* isolates were susceptible to the tested antimicrobials. *Listeria* sp. were found on carcasses sampled at the two slaughterhouses, but on different frequency of isolation. In slaughterhouse A, only one carcass, sampled after flaming, was positive (*L. innocua*), while all the other *Listeria* strains were isolated from samples taken at slaughterhouse B. This plant presented a higher accumulation of water and residues on the floor and walls, a manual flaming of the carcasses was performed, and a higher frequency of fecal contamination on carcasses after evisceration was observed. Under the conditions observed in slaughterhouse B, clonal groups of *L. monocytogenes* were able to spread between carcasses and to the environment.

¹ Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. 63 pg. June, 2010.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	08
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 LISTERIOSE	11
2.1.1 Listeriose no Mundo	13
2.1.2 Listeriose no Brasil	15
2.2 CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO <i>Listeria</i> sp.	17
2.3 ISOLAMENTO E MEIOS DE CULTURA	18
2.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	19
2.4.1 Patogenicidade e genes de virulência de <i>L.monocytogenes</i>	20
2.4.2 <i>L. monocytogenes</i> em produtos de origem suína.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 AMOSTRAS	30
3.2 PESQUISA DE <i>Listeria</i> sp.....	31
3.2.1 Enriquecimento Seletivo	31
3.2.2 Confirmação da presença de <i>Listeria</i> sp.	32
3.2.3 Pesquisa de <i>Listeria</i> sp. no ágar ALOA.....	33
3.3 ANTIBIOGRAMA DAS AMOSTRAS DE <i>L.monocytogenes</i>	34
3.4 ANÁLISE DE <i>L. monocytogenes</i> POR MACRORESTRIÇÃO (PFGE)	35
3.4.1 Suspensão celular	35
3.4.2 Suspensão SSP	36
3.4.3 Blocos de agarose	36
3.4.4 Lise celular	36
3.4.5 Lavagens	37
3.4.6 Restrição do DNA cromossomal.....	37
3.4.7 Eletroforese em campo pulsado	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5. CONCLUSÕES	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a carne suína é a principal fonte de proteína animal no mundo na atualidade, com produção de cerca de 100 milhões de toneladas anuais. Aproximadamente metade desse volume é produzida na China, e o restante na União Européia (UE), nos Estados Unidos (EUA), no Brasil e em outros países com menor representatividade. O Brasil ocupa o quarto lugar na produção mundial, contribuindo com 3% da produção e 11 % da exportação, e experimenta crescente inserção internacional (Miele & Machado, 2010).

O mercado internacional de carne suína movimenta cerca de US\$ 11,9 bilhões nas cerca de 5,4 milhões de toneladas de carne comercializada. Cinco importadores (Japão, Federação Russa, México, Coréia do Sul e Hong Kong) concentram aproximadamente dois terços das importações mundiais (USDA, 2009). O Brasil apresentou, no ano de 2008, um desempenho positivo, passando de 4 a 11 % das exportações mundiais, com aproximadamente 530 mil toneladas exportadas, gerando um faturamento de US\$ 1,4 bilhão (Abipecs, 2010).

Segurança dos alimentos, rastreabilidade, bem estar animal, medidas de biossegurança e sustentabilidade são temas fundamentais, principalmente quando o objetivo é expandir exportações, conquistar novos mercados, manter a confiança dos consumidores e evitar restrições ao

comércio. A crescente demanda pela inocuidade e qualidade dos alimentos, acrescida da preocupação com os impactos das doenças nos rebanhos e possíveis riscos à saúde humana motiva o surgimento e a aplicação de medidas que podem trazer barreiras ao comércio. Desde que o acordo sobre a Aplicação de Medidas Sanitárias e Fitossanitárias (*SPS – Sanitary and Phytosanitary Measures*) entrou em vigor em 1995, os países importadores têm direito de fazer exigências sanitárias para garantir a segurança e a qualidade dos alimentos. Estas medidas podem, inclusive, ser mais rígidas que os padrões estabelecidos internacionalmente, desde que fique comprovada a plausibilidade científica (ICONE, 2010). Em 2002, a Comissão Européia instituiu a Lei Geral do Alimento (“*General Food Law*”), cujo objetivo é aplicar a análise de risco para a legislação de segurança de alimentos desde a produção até o consumo e, em 2003, o Regulamento CE – 2160/2003, cuja finalidade é controlar os patógenos de origem alimentar na Europa (Fosse *et al.*, 2009). Sob este cenário, *Listeria monocytogenes* apresenta-se como uma das possíveis barreiras futuras à exportação, principalmente devido ao grande impacto deste agente para a saúde pública.

A listeriose humana tem como agente etiológico *Listeria monocytogenes*, sendo este um bacilo Gram-positivo, anaeróbio facultativo e não esporulado. Por ser um microrganismo ubiquitário, encontra-se amplamente disseminado na natureza. A partir da década de 1980, foi definitivamente comprovada a veiculação dessa bactéria por inúmeros alimentos, causando surtos grandes proporções (Hofer *et al.*, 2006). É um patógeno potencialmente perigoso para imuno-deprimidos (neonatos,

prematturos, idosos, gestantes e portadores da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida). A principal manifestação clínica da listeriose é semelhante a um resfriado acompanhado de febre baixa, mal-estar generalizado, podendo evoluir para meningite, meningo-encefalite, septicemia, aborto ou parto prematuro (Acha & Szyfres, 2001).

A disseminação de *L. monocytogenes* nos abatedouros ainda não está bem esclarecida. Desse modo, torna-se relevante avaliar sua presença nas plantas de processamento, gerando informações que auxiliem no controle da bactéria na linha de abate e assegurem a comercialização de um alimento com qualidade higiênico-sanitária. Embora vários autores como Silva *et al.* (2004) já tenham estudado a ocorrência de *L. monocytogenes* no produto final, e Santos *et al.* (2005) tenha avaliado a presença deste agente em carcaças suínas, após diferentes etapas do abate, ainda há poucos estudos sobre os sorotipos mais prevalentes nas linhas de processamento de suínos, bem como a verificação dos perfis de resistência a antimicrobianos.

Por tudo isso, este trabalho teve como objetivos: i. avaliar a presença de *Listeria* sp. em carcaças de suínos nas diferentes etapas da linha de processamento (escaldagem, chamuscamento, evisceração, entrada da câmara fria), visando definir possíveis pontos críticos de contaminação e recontaminação no abate e a possível presença de *L. monocytogenes*; ii. verificar os perfis de resistência a antimicrobianos; iii. identificar e correlacionar os perfis clonais de *L. monocytogenes* utilizando a análise de macrorestrição por eletroforese em campo pulsado (PFGE).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. LISTERIOSE

A listeriose ou listeríase é a infecção causada pela bactéria *L. monocytogenes*, que acometem humanos, podendo acometer também mamíferos, aves, peixes e crustáceos, nem sempre resultando em doença clínica nos animais. Casos esporádicos de listeriose humana nos Estados Unidos ocorrem com uma incidência anual de aproximadamente 0,27 casos por 100.000 habitantes. Em 2002, houve um surto de listeriose envolvendo vários estados dos Estados Unidos, com 46 casos confirmados e sete óbitos. Os casos ocorreram nos estados da Pensilvânia (14 casos), New York (18 casos), New Jersey (5 casos), Delaware (4 casos), Maryland (2 casos), Connecticut (1 caso), Massachusetts (1 caso) e Michigan (1 caso). As investigações associaram a ocorrência do surto ao consumo de carne, fresca e congelada, de peru e frango. Apesar de apresentar uma incidência relativamente baixa, é considerada uma enfermidade de extrema importância pela alta letalidade (Acha e Szyfres, 2001; Gasanov *et al.*, 2005).

L. monocytogenes foi reconhecida como causa de natimortalidade e sintomas neurológicos em animais, antes de ser associada a doenças em humanos. A denominação da espécie é devida à proliferação dos microrganismos em monócitos de alguns animais infectados. Nos últimos anos,

a listeriose transformou-se em uma doença de grande importância para a indústria alimentícia e autoridades na área de saúde. A transmissão de *L. monocytogenes* pode ocorrer tanto por contato direto quanto indireto com fontes contaminadas, pelas vias oral, ocular, cutânea, respiratória e urogenital (Mantilla *et al.*,2007b)

Os alimentos servem de substrato para o crescimento dos microrganismos, tornando-se um risco para saúde do consumidor (Shinohara *et al.*, 2003). Nos seres humanos, a colonização do intestino e a replicação no fígado e baço freqüentemente produzem enterites e estado febril semelhante à gripe (Orndorff *et al.*,2006).

Entre as toxinfecções alimentares, a listeriose é considerada uma das mais importantes caracterizando-se por apresentar, na forma severa, septicemia, meningoencefalite, encefalite, infecção cervical ou intra-uterina, capaz de resultar em aborto ou prematuridade (Loguercio & Aleixo, 2001). Secundariamente, pode causar endocardite e lesões cutâneas (CVE, 2009). Embora a *L. monocytogenes* seja capaz de atingir múltiplos órgãos, os principais sintomas clínicos de listeriose comprovam o tropismo deste agente pela placenta e sistema nervoso central. O período de incubação pode variar de 20 horas após a ingestão de alimentos contaminados (gastrenterites) a 20-30 dias, nos casos de doença invasiva (Cruz *et al.*, 2008).

A dose infectante de *L. monocytogenes* não é conhecida, mas a literatura cita como sendo inferior a 10^3 (Germano & Germano, 2003), variando em função da virulência da cepa e da suscetibilidade do indivíduo. Cerca de

90% de adultos apresentam imunidade para *L. monocytogenes* (Doumith *et al.*, 2004b).

As superfícies utilizadas para preparação de alimentos podem ser fonte de contaminação, principalmente quando não são bem higienizadas (Pinto, 2004). Ainda que partículas de alimentos sejam removidas da superfície, quando boas práticas de fabricação (BPF) são aplicadas, o gênero *Listeria* caracteriza-se pela fácil adesão e formação de biofilme, o que dificulta a higienização e ação de desinfetantes (Oliveira *et al.*, 2010). Caso esses microrganismos não sejam destruídos durante o processamento, podem multiplicar-se durante a produção, distribuição e comercialização dos alimentos, reduzindo a qualidade e aumentando o risco de provocar surtos (Kunigk & Almeida, 2001).

A listeriose é observada principalmente em países industrializados e não se sabe se as diferenças nas taxas de prevalência entre os países desenvolvidos e em desenvolvimento são devidas à diferença geográfica, hábitos alimentares, ou ainda falha no diagnóstico de casos. A dificuldade na recuperação do microrganismo envolvido no surto, a subnotificação e a demora na realização de análises convencionais são alguns dos principais fatores que retardam o diagnóstico, principalmente em países em desenvolvimento (Arruda, 2006).

2.1.1 Listeriose no Mundo

Apesar de ser amplamente encontrada no ambiente e em alimentos, somente após a ocorrência de um surto de listeriose alimentar na América do

Norte e na Europa durante a década de 1980, a importância dos alimentos como a principal via de transmissão de *L. monocytogenes* para humanos começou a ser considerada (Hofer *et al.*, 2006).

Em vários países do mundo, já foram diagnosticados casos isolados e surtos de listeriose. Em 722 casos de listeriose humana na Inglaterra, 91% das infecções foram relacionadas com os sorotipos 1/2a, 1/2b ou 4b (McLauchlin, 1997). Segundo Borucki & Call (2003), estes sorotipos estão relacionados com a ocorrência da doença, sendo que o sorotipo 1/2a é frequentemente isolado em alimentos, enquanto o 4b está associado à ocorrência de epidemias.

Na Europa, são notificados por ano 1.600 a 8.400 casos de listeriose e 320 a 2.500 mortes. Os surtos entre 1991-2001 na Europa somaram 2.065 acometidos, sendo 188 casos por ano. A ampla diferença nas incidências pode ser devido a problemas nos sistemas de notificação e detecção de surtos. O exato número de casos relacionados aos surtos é desconhecido, sendo provavelmente maior do que o número notificado (Lukinmaa *et al.*, 2002; Sauders *et al.*, 2003).

Após um surto ocorrido em 1987, a Suíça decidiu incluir a listeriose na lista de agravos do Sistema de Notificação. Desde então, a incidência anual varia de 0,3 a 0,7 casos por 1.000 habitantes. Foi introduzido um limite legal da presença de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo e, em 1999, foi determinado que *L. monocytogenes* deveria estar ausente em 25 gramas de alimentos prontos para consumo, valendo também para peixes defumados resfriados e sorvetes (Jemmi *et al.*, 2002).

A Tabela 1 discrimina o número de surtos ocorridos no mundo no período de 1976 a 1999 segundo a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação - FAO (*Food and Agriculture Organization*).

Tabela 1: Número de surtos de Listeriose ocorridos no mundo entre 1976 e 1999, segundo a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação – FAO

PAÍS	ANO	NÚMERO DE CASOS (morte)	ALIMENTO ENVOLVIDO
EUA	1976	20 (5)	Salada crua*
Nova Zelândia	1980	20 (5)	Crustáceos ou peixe cru*
Canadá	1981	41 (18)	Salada de repolho crua
EUA	1983	49 (14)	Leite*
EUA	1985	142 (48)	Queijo
Suíça	1983-7	122 (34)	Queijo
Reino Unido	1987-9	> 350	Patê
Dinamarca	1989-0	26 (6)	Queijo
Austrália	1990	9 (6)	Patê
Austrália	1991	4	Mexilhões defumados
Nova Zelândia	1992	4 (2)	Mexilhões defumados
França	1992	279 (85)	Língua suína
França	1993	33	Carne de suíno
Itália	1993	18	Salada de arroz
EUA	1994	45 #	Leite com chocolate
Suécia	1994-5	8 (2)	Peixe defumado
França	1995	33 (4)	Queijo mole
Austrália	1996	4 (1)	Galinha cozida
Itália	1997	748	Farinha de milho
EUA	1998-9	100 (>10)	Cachorro quente
Finlândia	1998-9	18 (4)	Manteiga

* = Baseado somente em associações epidemiológicas, sem a recuperação da cepa envolvida no surto.

= Predominantemente febre e gastroenterite.

2.1.2 Listeriose no Brasil

Até o momento, a notificação dos casos de *L. monocytogenes* em humanos não é compulsória no Brasil, resultando na falta de dados que ilustrem a magnitude da listeriose no país.

Um estudo realizado pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC) analisou durante três décadas a ocorrência de *L. monocytogenes* em várias amostras provenientes de diversas regiões do país. Foram analisadas 266 amostras de material clínico humano, coletadas entre 1969 a 2000, dos seguintes estados: Pernambuco, Bahia, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul. Destas, 245 amostras confirmaram a presença de *L. monocytogenes*, predominantemente em indivíduos com meningite purulenta ou septicemia. A maior prevalência foi observada nas regiões Sudeste e Sul do país (87,8%), embora este microrganismo também tenha sido detectado nas regiões Centro-oeste e Nordeste (10,9%) (Hofer *et al.*, 2006).

Em 1985, no período de abril a dezembro, foram diagnosticados cinco casos de listeriose em pacientes recém-transplantados em um mesmo hospital da cidade de São Paulo. Os dois sorotipos de *L. monocytogenes* diagnosticados foram 1/2a e 4b, sendo este resistente à penicilina (Hofer, Melles, Hofer, 1999). No período de junho a setembro de 1989, o Instituto de Saúde do Distrito Federal diagnosticou três casos de meningite causada por *L. monocytogenes*, resultando em um óbito (Hofer, Nascimento & Oliveira, 1998).

Outro trabalho realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou 10 placentas humanas provenientes de abortos, partos prematuros e de nascimentos pela técnica de imuno-histoquímica. Foi identificada a presença de *L. monocytogenes* em 50% das amostras (Schwab & Edelweiss, 2003). Em 2006, foram descritos por Toyoshima *et al.* dois casos de peritonite

bacteriana espontânea em pacientes com cirrose causados por *L. monocytogenes*.

Em 2009, entrou em vigor a Instrução Normativa 9 (BRASIL,2009), que determina o monitoramento de *L. monocytogenes* em todos os produtos de origem animal que tenham pH>4,4, atividade de água >0,92 e concentração de Cloreto de Sódio <10%. Tanto as matérias-primas como as amostras colhidas no ambiente de fabricação devem ser incluídas nos planos de monitoria.

2.2 CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO *Listeria* sp.

As bactérias do gênero *Listeria* são bacilos Gram-positivos pleomórficos, aeróbicos e anaeróbicos facultativos, não formadores de esporos, catalase positivos e não produtores de indol e gás sulfídrico. Podem apresentar-se na forma de pequenas correntes, com arranjos no formato de “V” ou em grupos paralelos longitudinalmente. Fermentam glicose, com produção de ácido lático e sem a formação de gás. Crescem em uma ampla faixa de temperatura (1 – 45°C), sendo a faixa de crescimento ótimo entre 30 a 37°C. São também classificados como psicotróficos devido à capacidade de multiplicar-se em temperatura de refrigeração. Apresentam flagelos peritríquios responsáveis pelos movimentos celulares rotatórios ou de tombamento, exibindo turvação característica na forma de guarda-chuva quando incubados à 20-25°C em ágar semi-sólido, sendo imóveis a 37°C (Cruz *et al.*, 2008).

A característica psicotrófica depende dos seguintes fatores: a integridade celular, o sistema de transporte energético resistente ao frio que estimula o metabolismo sob baixas temperaturas, proporcionando altas

concentrações de substratos intracelulares e uma fase lag prolongada em temperaturas de refrigeração. Além disso, as bactérias do gênero *Listeria* apresentam maior multiplicação sob concentração reduzida de oxigênio (Mantilla *et al.*, 2007b).

Listeria sp. é inativada por tratamento térmico à 70°C por dois minutos (Jay, 2005), sobrevive em uma ampla faixa de pH (4.3 a 9.6) e baixa atividade de água (Cruz *et al.*, 2008). Outro fator relevante à sobrevivência é a adaptação a ambientes com altas concentrações de NaCl (até 20%) e bile (10 a 40%)(Jay, 2005).

Atualmente o gênero *Listeria* inclui seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* , *L. ivanovii* subsp *londoniensis*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. grayi* (Winn, 2008). Essas espécies são amplamente distribuídas, tanto na natureza quanto em diferentes ambientes de processamento e estoque de alimentos (Nufer *et al.*, 2007).

Dentre as seis espécies de *Listeria* existentes, duas são patogênicas: *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*. *L. monocytogenes* causa doença em humanos e animais, enquanto *L. ivanovii* acomete, exclusivamente, ruminantes (Orndorff *et al.*, 2006).

2.3 ISOLAMENTO E MEIOS DE CULTURA

Os métodos para isolamento de bactérias do gênero *Listeria* nos alimentos diferem significativamente daqueles empregados clinicamente em humanos. Esses métodos envolvem enriquecimento em caldo e subsequente semeadura em vários tipos de meios seletivos, incluindo os cromogênicos. A

identificação e diferenciação de *L. monocytogenes* é possível devido à presença de substâncias químicas específicas como componentes do meio, sendo estas responsáveis pela pigmentação das colônias (Vlaemynck *et al.*,2000).

A Instrução Normativa 62 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2003), que oficializa os Métodos Analíticos Oficiais de Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água, preconiza realizar o enriquecimento seletivo em duas etapas: inicialmente com caldo UVM seguido do caldo Fraser. A finalidade do enriquecimento seletivo é inibir a microbiota competidora, permitindo a recuperação de baixos números de células de *Listeria*. O isolamento nos produtos cárneos é feito através de dois meios de cultura sólidos: ágar triptose com ácido nalidíxico (ATN) e ágar Palcam (AP). A confirmação bioquímica é realizada por meio da verificação da produção de catalase, não produção de oxidase, fermentação de glicose com produção de ácido lático sem produção de gás, provas de Voges Proskauer e vermelho de metila positivos, capacidade de hidrolisar a esculina, e a incapacidade de utilizar a uréia. As espécies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri* são produtoras de β -hemolisina. *L. welshmeri*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri* utilizam a xilose e *L. grayi* utiliza o manitol. No teste CAMP, *L. monocytogenes* e *L. seeligeri* apresentam hemólise sinérgica com o *Staphylococcus aureus* e *L. ivanovii* com *Rhodococcus equi* (Ryser& Donnelly, 2001).

2.4 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes é um patógeno intracelular facultativo, podendo crescer em macrófagos, células epiteliais e fibroblastos cultivados. Apesar de apresentar-se morfologicamente semelhante às demais espécies do gênero, possui características bioquímicas específicas. Caracteriza-se por produzir compostos ácidos a partir de L-ramanose e α -metil-D manosídio. Cresce bem em ágar sangue de carneiro, produzindo colônias branco-acinzentadas com hemólise total. Apresenta Fator CAMP positivo com *Staphylococcus aureus*, mas não com *Rhodococcus equi* (Silva *et al.*, 2007).

Dentre as espécies do gênero, *L. monocytogenes* é a única de importância para saúde pública por causar a listeriose em humanos, enfermidade caracterizada por uma elevada taxa de letalidade (20 a 30%) em populações de risco (principalmente imunossuprimidos) (Mead *et al.*, 2006). A espécie *L. monocytogenes* apresenta a maior diversidade antigênica, sendo dividida em treze sorotipos, com base nos antígenos somáticos (S) e flagelar (H) sendo estes: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e e 7 (Winn *et al.*, 2008). Segundo Hofer *et al.* (2000), o sorotipo 4b é freqüentemente isolado em produtos cárneos e em humanos. Já o sorotipo 1/2a é comum em produtos lácteos e o 1/2b é amplamente distribuído no ambiente.

2.4.1 Patogenicidade e genes de virulência de *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes é um patógeno intracelular com habilidade de penetrar, multiplicar-se no citoplasma das células (macrófagos, fibroblastos e eritrócitos) e invadir células adjacentes sem deixar o citoplasma do hospedeiro

(Tortora *et al.*, 2006). Uma vez atravessando a barreira intestinal, a *Listeria* é carregada por via hematogênica para os linfonodos mesentéricos, baço e fígado. Os macrófagos residentes do fígado desempenham um papel importante na tentativa de conter a infecção, porém os hepatócitos representam um sítio preferencial de multiplicação de *Listeria*. Durante os estágios iniciais da infecção, os hepatócitos respondem à presença de *Listeria* através da liberação de quimiocinas e pela indução de apoptose, resultando na formação de microabscessos e liberação da bactéria na circulação (Campos *et al.*, 2004).

A partir do trato intestinal, o microrganismo invade os tecidos, penetrando inicialmente em células susceptíveis para iniciar o processo de replicação. No caso dos fagócitos, a entrada ocorre em duas etapas: 1) diretamente pelo fagossoma e 2) do fagossoma para dentro do citoplasma do fagócito. Já a entrada ou passagem para dentro das linhagens de células não-fagocíticas requer a ligação de proteínas à superfície das bactérias, as quais são designadas In1A e In1B. Essas proteínas facilitam a entrada da *L. monocytogenes* nas células hospedeiras. A proteína In1A, denominada internalina A, e seu receptor de superfície em mamíferos, a E-caderina, são necessários para penetrar em culturas de células epiteliais. A In1B é necessária para a invasão de cultura de hepatócitos em camundongos. Outra proteína associada à invasão de *Listeria* é a p60, uma proteína codificada pelo gene *iap*. Ela é secretada por todas as espécies de *Listeria* sp. (Jay, 2005).

L. monocytogenes sobrevive dentro dos macrófagos, escapando da membrana fagolisossomal para dentro do citoplasma sendo esse processo facilitado pela Listeriolisina O (LLO). A LLO é uma hemolisina (Hln) pertencente

à família das toxinas formadoras de poros colesterol-dependente. Com um pH ótimo de 4,5 a 6,5 (semelhante ao ambiente acidificado dos vacúolos), esta hemolisina causa a lise da membrana do fagossoma, bem como o rompimento do vacúolo de dupla membrana formado durante a disseminação da bactéria célula a célula. A perda espontânea da LLO causa perda da virulência. Os poros ou as lesões da membrana causadas facilitam o acesso das fosfolipases, levando a uma total dissolução da barreira física que delimita o compartimento fagossômico (Campos, 2004). Uma vez no citosol, a proteína da superfície ActA (codificada pelo gene *actA*) auxilia na formação da cauda de actina que propulsiona o microrganismo através da membrana citoplasmática. Com a ajuda da LLO e de duas fosfolipases bacterianas, a fosfolipase C fosfatidilinositol específica (codificada pelo gene *plcA*) e uma fosfolipase C não-específica (codificada pelo gene *plcB*), as bactérias são liberadas, e o processo de penetração das células hospedeiras adjacentes é repetido. Posteriormente, ocorrem a projeção da membrana e a formação de um filopódio, o qual é absorvido por uma célula adjacente, e o processo de invasão é repetido. Dessa maneira, a *L. monocytogenes* dissemina-se entre células, sem que necessite sair do interior das células hospedeiras (Jay, 2005; Winn *et al.*, 2008). Todas as cepas virulentas produzem a LLO, que está geneticamente relacionada com a estreptolisina O e a pneumolisina (Murray *et al.*, 2000).

Os níveis significativos de internalização nas células não-fagocíticas são mediados por uma ou mais proteínas de superfície bacteriana, denominadas internalinas. Elas são codificadas por uma família de múltiplos genes, e dois deles (*inlA* e *inlB*) codificam duas internalinas particularmente

importantes para a patogenicidade de *Listeria*: Internalina A (InIA), Internalina B (InIB). Estas internalinas apresentam, em comum, um domínio repetido rico em leucina (*leucine –rich repeats – LRR*), envolvido nas interações proteína-proteína. A InIA é uma proteína cujo receptor celular é a E-caderina, encontrada na região basolateral das células epiteliais intestinais, na superfície de hepatócitos, células dendríticas, endoteliais da microvascularização cerebral, nas células que cobrem o plexo coróide e nas vilosidades coriônicas da placenta (Campos, 2004). A interação da InIA com a E-caderina ocorre através do domínio LRR, levando à adesão e induzindo a fagocitose, através do rearranjo do citoesqueleto de actina da célula hospedeira. A InIB liga-se ao receptor tirosina quinase e é capaz de induzir a entrada da bactéria em vários tipos de células, epiteliais, fibroblastos e hepatócitos (Cossart, 2002). Há relatos de uma internalina denominada Internalina C (InIC), que parece também mediar a invasão de células endoteliais e hepatócitos (Winn, 2008). Por serem exclusivas da espécie *L. monocytogenes*, considera-se que as internalinas sejam as principais responsáveis pela invasão celular e tropismo no hospedeiro (Vásquez-Boland *et al.*, 2001).

No foco da infecção, com a migração de neutrófilos e macrófagos ativados, ocorre a formação de granulomas. Os macrófagos fagocitam a bactéria e apresentam os antígenos, principalmente o LLO, em sua superfície para linfócitos T auxiliares ou CD4 (L3T4+) e citotóxicos ou CD8 (Lyt2+). Os linfócitos T CD4 ativados secretam interleucina-1 (IL-1) e outras citocinas que tornam os macrófagos mais eficientes em destruir as bactérias fagocitadas. Os linfócitos T citotóxicos atuam diretamente sobre células infectadas ocasionando

a lise das mesmas. A imunidade humoral, por sua vez, desempenha um papel menor na proteção do hospedeiro (Portnoy *et al.*, 2002; Jay, 2005).

2.4.2 *L. monocytogenes* em produtos de origem suína

Os produtos cárneos suínos são considerados como um dos veiculadores potenciais de enfermidades transmitidas por alimentos (McMullen, 2000).

A ampla distribuição de *Listeria* sp. na natureza e nas fezes dos animais explica que sua presença em produtos cárneos (Mantilla *et al.*, 2007c). Segundo Chasseignaux *et al.*, (2002), a frequência de *L. monocytogenes* na carne crua, pode ultrapassar 40%, dependendo do tipo de produto.

Na França, nos últimos dez anos, os produtos de origem suína foram envolvidos em surtos de listeriose com uma maior frequência do que os produtos derivados do leite. Este fato ressalta a importância de desenvolver mais pesquisas sobre a presença de *L. monocytogenes* em produtos cárneos e carnes *in natura* (Leclerc *et al.*, 2002).

Associação entre produtos cárneos e casos de listeriose nos países desenvolvidos e o fato *L. monocytogenes* ser isolada com frequência de produtos comercializados no varejo indicam que produtos refrigerados e pratos prontos congelados e inadequadamente reaquecidos representam um risco para Saúde Pública, sendo o risco potencialmente maior naqueles alimentos que não sofrem aquecimento antes da ingestão (BERZINS *et al.*, 2007). Em um estudo realizado em embutidos cozidos de carne suína, comercializados no município de Porto Alegre, Mottin *et al.* (2008) encontraram 26,67% (16/60) de

amostras positivas para *Listeria* sp., sendo identificadas as espécies *L. monocytogenes* (n=7), *L. innocua* (n=8) e *L. grayii* (n=1). Já em outro trabalho realizado em Pelotas em linha de processamento de lingüiça mista frescal (da carne crua até o produto final), Von Laer *et al.* (2009) encontraram presença de *L. monocytogenes* em 23,53% do total analisado (16/68). As amostras de carne crua não estavam contaminadas (0/10), entretanto *L. monocytogenes* foi detectada em 21% das amostras ambientais e equipamentos (9/43), 20% nas mãos dos manipuladores e na massa pronta (1/5) e em todas as amostras do produto final (5/5), demonstrando que a contaminação do produto final ocorreu durante o processamento e a importância da contaminação cruzada. Dos 83 isolados de *L. monocytogenes* investigadas, 59 (71,1%) eram do sorotipo 1/2c, 10 (12,1%) do sorotipo 1/2b, 2 (2,4%) do sorotipo 4b e 12 (14,5%) no sorogrupo 1. A eletroforese em campo pulsado (PFGE) discriminou os 83 isolados em 22 pulsotipos com as enzimas *Apal* e *Ascl*. O produto final apresentou o maior número de pulsotipos únicos, ou seja, sem isolamento a partir de outra amostra. Provavelmente estas cepas estavam presentes na planta de processamento a níveis indetectáveis pelas técnicas de isolamento tradicionais, sofrendo multiplicação após 24 horas de estoque em temperatura de resfriamento, tornado-se detectáveis no produto final.

Fantelli & Stephan (2001) analisaram 408 amostras de carne moída, sendo que 221 eram bovinas e 187 suínas, e isolaram 43 cepas de *L. monocytogenes*. Destas, dezenove cepas pertenciam ao sorotipo 1/2a, duas ao sorotipo 1/2b, doze ao sorotipo 1/2c e dez ao sorotipo 4b.

O setor frigorífico do Rio Grande do Sul sempre desempenhou um papel importante como fornecedores de gêneros alimentícios. Muito dos alimentos consumidos diariamente têm como base a carne suína (produtos na forma de carne fresca, defumados, curada, cozidas, embutidos) (Barcellos, 2006).

No processo de abate de suínos, as seguintes etapas são consideradas como pontos críticos: escaldagem, flambagem, evisceração e entrada da câmara fria. A avaliação do processo de abate tem sido alvo de estudos e revisão na Europa, EUA e Canadá (Santos *et al.*, 2005).

Dentre as etapas do abate de suínos, algumas podem auxiliar na redução do número de contaminantes, incluindo *L. monocytogenes*. O procedimento de escaldagem leva de 6 a 8 minutos e a temperatura da água deve estar entre 60 e 61,5 ° C, sendo que a redução do número de bactérias na carcaça durante a escaldagem é dependente das condições tempo-temperatura utilizadas (Sorquist, 1994). A flambagem correta da carcaça eleva a temperatura e reduz significativamente a contaminação bacteriana superficial, embora não seja suficiente para eliminá-la. É a última etapa que reduz significativamente a carga bacteriana na carcaça (Berends *et al.*, 1997).

As bactérias podem disseminar-se para a carcaça durante a evisceração, devido ao extravasamento do conteúdo gastrintestinal, além da contaminação oral e esofágica. Outra etapa crítica quanto à contaminação da carcaça é a divisão da carcaça, sendo recomendada a desinfecção da serra após o processamento de cada carcaça (Santos *et al.*, 2005). A contaminação da carcaça pode ocorrer também a partir da manipulação por parte dos

manipuladores da indústria de alimentos, uma vez que estes podem ser portadores sadios de *Salmonella* sp., *L. monocytogenes*, *Campylobacter* sp. e *Escherichia coli* enteropatogênica (Mantilla *et al.*, 2007b).

A contaminação de carcaças suínas durante o processo de abate pode ser a partir de fezes dos animais com a presença de *L. monocytogenes* ou a partir do próprio ambiente de abate (superfícies, equipamentos e utensílios contaminados). Na França, diferentes surtos de listeriose foram associados a produtos suínos processados. Alguns estudos revelaram que a frequência de *Listeria* sp. na carne suína crua ficou em torno de 16% e cerca de 68% dos matadouros frigorífico amostrados apresentaram *L. monocytogenes* em suas superfícies de trabalho (Santos *et al.*, 2005).

Superfícies como aço, vidro, polipropileno, plástico, borracha, fôrmica e ferro podem acumular resíduos orgânicos, como restos de alimentos decorrentes da má higienização. Esses resíduos desempenham o papel de meios de cultura adequados para o crescimento e multiplicação de bactérias e fungos (Lópes *et al.*, 2008). Decorrente dessa multiplicação ocorre à formação de polímeros extracelulares e catabólitos, que se unem ao substrato existente, potencializando o poder de adesão de outros microrganismos. A massa formada pelos resíduos, microrganismos e seus produtos extracelulares é denominada biofilme (Nikolaev & Plakunov, 2007).

Os biofilmes formados na superfície de utensílios podem cristalizar e formar depósitos ou crostas extremamente aderentes quando submetidas ao calor, protegendo novos microrganismos e dificultando os procedimentos de lavagem e desinfecção. O tempo necessário para a formação do biofilme

dependerá da frequência de realização do processo de limpeza (Uhtil *et al.*, 2004).

A análise de 41 amostras de matéria-prima, equipamentos e produtos final de lingüiça frescal no Rio Grande do Sul identificou *Listeria* sp. em todas as amostras e 29% delas foram identificadas como *L. monocytogenes*. A carne bovina (33%), a carne suína (33%) e a gordura suína (22%) apresentaram amostras positivas, enquanto *Listeria* não foi encontrada em amostras de carne mecanicamente separada de frango. Nos três frigoríficos avaliados, a prevalência de *L. monocytogenes* variou entre 8 e 47% nas superfícies de contato (Silva *et al.*, 2004).

A Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle (APPCC) pode contribuir para melhorar a vigilância e o controle de *L. monocytogenes* e de outros patógenos transmitidos por alimentos no ambiente de processamento de alimentos (ICMSF, 2001). Em relação à *L. monocytogenes*, a conduta de “tolerância zero” tem sido adotada na inspeção de centros de processamento de alimentos por organismos reguladores internacionais (Rebagliati *et al.*, 2009). Nesse sentido, *L. monocytogenes* foi considerada um contaminante presente no ambiente de abate, permanecendo por meses, ou até anos, no ambiente de processamento, podendo provocar contaminações recorrentes no produto final (Markkula *et al.*, 2005).

Chasseignaux *et al.* (2002) analisaram a presença de *L. monocytogenes* em superfícies de trabalho (equipamentos e ambiente) de cinco plantas de processamento, sendo três de carne suína e duas de aves. De 497 amostras analisadas, 23,7% estavam contaminadas por *L.*

monocytogenes. A superfície de trabalho foi considerada a principal fonte de contaminação da carne. Em duas plantas de processamento de carne suína, *L. monocytogenes* foi encontrada no ambiente da área de recepção, nos equipamentos da área de processamento de carne e de produto. Na outra planta, *L. monocytogenes* foi detectada no equipamento de recepção, nas áreas de processamento de carne e no ambiente da área de processamento de produto. Após as operações de limpeza e desinfecção, a contaminação foi reduzida ligeiramente (2,5%).

Embora as carnes frescas apresentem, geralmente, baixas contagens de *L. monocytogenes*, o grau de processamento é diretamente proporcional ao risco de contaminação (Jay, 2005). Por esse motivo, diversos derivados cárneos têm sido envolvidos, tanto em surtos de listeriose, quanto em casos esporádicos da enfermidade (Farber & Peterkin, 1991; Rocourt & Cossart, 1997).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

As amostras foram coletadas em dois abatedouros frigoríficos sob Inspeção Federal, localizados no Sul do Brasil. Os abatedouros foram escolhidos de forma intencional, de forma a amostrar estabelecimentos diferentes no que diz respeito às instalações e procedimentos operacionais (Tabela 2). O abatedouro A foi visitado duas vezes (23/10/2007; 28/11/2007), enquanto o abatedouro B foi visitado três vezes (17/3/2008; 23/4/2008; 8/6/2009), em dias da semana distintos, como forma de analisar diferentes situações de rotina de trabalho nos estabelecimentos.

Tabela 2: Características observadas nos abatedouros visitados no presente estudo

ITEM OBSERVADO	ABATEDOURO A	ABATEDOURO B
Escalda	Tanque	Tanque
Oclusão do reto	Com lacre	Com barbante
Flambador	Túnel	Manual
Extravasamento de conteúdo intestinal	Raro	Frequente
Piso	Seco	Molhado

Em cada visita foi acompanhado um turno de abate (aproximadamente 4 horas). Aproximadamente a cada 20 minutos, uma carcaça foi amostrada nos seguintes pontos da linha de processamento: após a

escaldagem, após a flambagem, após a evisceração e na entrada da câmara fria. Em cada visita foram amostradas 12 carcaças. Para cada amostragem, esponjas estéreis umidecidas foram passadas em várias direções na superfície da carcaça na região da paleta, em área de 300 cm², delimitada por um molde apropriado. As esponjas foram acondicionadas, individualmente, em sacos plásticos estéreis contendo 55 mL de água peptonada a 0,1%. Também foram coletadas amostras ambientais nas baias de espera, sala de evisceração e câmara fria, passando as esponjas com auxílio de um molde descartável em área de 300 cm², (parede e piso). As amostras foram acondicionadas como descrito acima.

3.2 PESQUISA DE *Listeria* sp.

O isolamento de *Listeria* sp. foi realizado conforme a Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2003). A cepa controle utilizada foi *L. monocytogenes* ATCC 7644.

3.2.1 Enriquecimento Seletivo

Uma alíquota de 1 mL de cada amostra foi adicionada a tubos contendo 9 mL de Caldo de Enriquecimento para *Listeria* (UVM), a seguir homogeneizados e incubados a uma temperatura de 30°C por 24 horas. A partir do UVM, alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para 9,9 mL de caldo Fraser e incubadas a 35°C por 24 - 26 horas. Após o período de incubação, com o auxílio de alça de platina, foram retiradas alíquotas de cada tubo de enriquecimento seletivo e semeadas no ágar seletivo indicador PALCAM (AP),

incubado em microaerofilia a 37°C por 48 horas. Este meio de cultura seletivo contém cloreto de lítio, ceftazidima, polimixina B e cloreto de Acriflavina. É indicado por facilitar o diagnóstico diferencial de *L. monocytogenes* através do uso de um sistema indicador duplo: esculina e íon ferroso; manitol e vermelho de fenol. *L. monocytogenes* hidrolisa esculina, causando a formação de um halo negro ao redor das colônias; e não fermenta manitol, diferenciando-se de outras bactérias acompanhantes como enterococos e estafilococos. As colônias características foram semeadas por esgotamento, em ágar triptose de soja acrescido de 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE) e incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, foram realizados testes bioquímicos para confirmação de colônias suspeitas.

3.2.2 Confirmação da presença de *Listeria* sp.

Colônias que apresentaram crescimento típico foram submetidas à coloração de Gram, teste da catalase e provas bioquímicas: TSI (ágar Tríplice Açúcar e Ferro), vermelho de metila (VM), Voges-Proskauer (VP), motilidade e fermentação dos açúcares manitol, ramnose e xilose (MaCFaddin, 2000). Os isolados que apresentaram forma de bacilos Gram-positivos, catalase positiva e perfil bioquímico compatível com *Listeria* sp. foram submetidos ao Teste de CAMP. O Teste de CAMP foi realizado em placa contendo ágar sangue e culturas de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 49444) e *Rhodococcus equi* (ATCC® 6939). Entre estas culturas, foram semeados os isolados suspeitos de *Listeria* sp. Características fenotípicas utilizadas para identificação de espécies de *Listeria* sp. estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1: Caracterização fenotípica das espécies do gênero *Listeria*

Testes	LM	LIVA	LINN	LW	LS	LG
Hemólise	+	+	-	-	+	-
Nitrato	-	-	-	-	-	-
CAMP Teste - SA	+	-	-	-	+	-
CAMP Teste - RE	V	+	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	+
Ramnose	+	-	V	V	-	-
Xilose	-	+	-	+	+	-
Vermelho de Metila	+	+	+	+	+	+

Legenda:

V = Variável

LM = *L.monocytogenes*

LS = *L.seeligeri*

SA = *Staphylococcus aureus*

LIVA = *L.ivanovii*

LG = *L.grayi*

Fonte: BRASIL (2003)

RE = *Rodococcus equi*

LINN = *L.inocua*

Após a confirmação bioquímica, as cepas sugestivas de *Listeria* sp. foram encaminhadas para o Laboratório de Zoonoses Bacterianas (IOC – FIOCRUZ) para pificação.

3.2.3. Pesquisa de *Listeria* sp. no ágar ALOA

Concomitantemente ao isolamento descrito na IN 62, foi retirada de cada amostra analisada uma alíquota de 100µL e inoculada em uma placa contendo ágar ALOA (Ágar *Listeria* segundo Ottaviani e Agosti) pelo método de plaqueamento de superfície (*spread-plate*). Este meio de cultura possui um componente cromogênico denominado glucoside X utilizado para a detecção da β-glucosidase, enzima encontrada em todas as espécies de *Listeria*. A diferenciação da *L. monocytogenes* é baseada na produção da fosfolipase específica fosfatidilinositol C capaz de hidrolisar um substrato específico presente no meio, resultando na formação de um halo opaco ao redor das colônias de *L. monocytogenes*. As placas foram incubadas a 37°C por 24

horas. Três colônias suspeitas de *Listeria* foram semeadas para posterior confirmação bioquímica, como descrito no Quadro 1.

3.3 ANTIBIOGRAMA DAS AMOSTRAS DE *L. monocytogenes*

Os isolados de *L. monocytogenes* foram testados pelo método de difusão com disco segundo Kirby-Bauer (BAUER *et al.*, 1966) descrito no documento M31-A2 do (CLSI, 2002).

Colônias puras de cada isolado foram transferidas para caldo triptose de soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE) e incubado a 37°C por 24 horas, após transferido para ágar TSA-YE incubado a 37°C por 24 horas, e destas transferidas cinco colônias para solução salina 0,85% até alcançar a turbidez de uma solução padrão de MacFarland 0,5.

Com auxílio de suabe estéril embebido na solução do inóculo este foi passado em toda a superfície seca da placa de ágar Muller Hinton (Oxoid) com 0,6% de extrato de levedura. Após, aguardou-se 5 minutos, de maneira a permitir que qualquer excesso de umidade fosse absorvido antes de aplicar os discos de antimicrobianos. Os discos foram colocados na superfície da placa de ágar Muller Hinton com extrato de levedura, sendo levemente pressionados de encontro a esta, assegurando contato completo com toda a superfície do ágar. Os discos impregnados com antimicrobianos foram: amicacina (30µg), ampicilina (10µg), cefalotina (30µg), ciprofloxacina (5µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg), canamicina (30µg), norfloxacina (10µg), penicilina (10units), tetraciclina (30µg) e vancomicina (30µg). Foram utilizados como

controle da qualidade dos discos as cepas *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 e *Escherichia coli* ATCC® 25922

A leitura foi realizada após 24 horas de incubação na estufa a 37 °C, o diâmetro (em mm) de cada halo de inibição ao redor do disco de antibiótico foi medido e interpretado de acordo com os critérios do CLSI (2002).

3.4 ANÁLISE DE *L. monocytogenes* POR MACRORESTRIÇÃO (PFGE)

A preparação do DNA total, para a realização da eletroforese em campo pulsado (PFGE), foi conduzida como descrito previamente (Pulsenet, 2009), com adaptações.

3.4.1 Suspensão celular

As células foram cultivadas em caldo de soja tríptica com 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE) e incubadas por 24h a 37°C. A partir deste caldo, uma alíquota foi semeada por esgotamento em placas de TSA-YE incubadas por 24 h a 37 °C. Após este período, selecionaram-se colônias das placas TSA-YE, que foram semeadas em tubos contendo 4 mL de tampão TE até atingir a absorbância de 610nm. Esse valor de absorbância correspondente a 6,5 na escala de McFarland.

A partir dessa suspensão, foram transferidos 190µL de cada solução de células bacterianas para microtubos de 1,5mL. Em seguida, foram adicionados 10µL de lisozima (20mg/mL) em cada microtubo. Estes foram

cuidadosamente homogeneizados e incubados em banho-maria a 55-60°C por 20 minutos.

3.4.2 Solução SSP

A solução SSP é formada pelos seguintes componentes: 1% de agarose Pulsed Field (Bio-Rad), 1% de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) (Invitrogen) e 0,5mg/mL de proteinase K (LGC Bio) em tampão TE (10Mm Tris:1mM EDTA, pH 8.0).

3.4.3 Blocos de agarose

Aos microtubos contendo a suspensão de células em lisozima foram adicionados 200µL de solução SSP aquecida a 56°C. Os microtubos foram homogeneizados e, imediatamente, a suspensão foi dispensada nos moldes para blocos. A solidificação foi realizada a temperatura de refrigeração (7°C) por 10 minutos.

3.4.4 Lise celular

O tampão de lise foi preparado utilizando-se 4mL de solução de lise (2M Tris-HCL, 0,5 M EDTA pH 8,0, 1% de sarcosina e 0,1mg/mL de proteinase K) para cada amostra. Após a solidificação, os blocos de agarose foram transferidos para tubos tipo Falcon contendo 4mL do tampão de lise. Em seguida, foram incubados por 2 horas em banho-maria a 54°C.

3.4.5 Lavagens

Após a lise, os blocos de agarose foram lavados. Realizaram-se duas lavagens por 15 minutos cada, com água bidestilada estéril (pré-aquecida a 54°C) sob agitação constante. Em seguida, foram realizadas cinco lavagens com tampão TE pH 8,0 (pré-aquecido a 54°C), com duração de 15 minutos cada. Após a última lavagem, os blocos de agarose foram armazenados em microtubos com 900µL de tampão TE, e mantidos sob refrigeração 4°C, até a restrição.

3.4.6 Restrição do DNA cromossomal

Os blocos de agarose contendo o DNA cromossomal foram cortados em fatias de aproximadamente 2mm cada, as quais foram submetidas à digestão com as enzimas de restrição. As cepas de *L. monocytogenes* foram digeridas com as enzimas *Apal* e *Ascl* (New England BioLabs) e a cepa padrão de *Salmonella enterica* sorotipo Braenderup, com a enzima *Xbal* (Fermentas, Glen Burnie). A digestão foi realizada por duas horas e meia à 25°C para a enzima *Apal*, com uma concentração de 50U/ µL (1 µL/amostra), e a 37°C para as enzimas *Xbal* e *Ascl*, com concentrações de 10U/µL (2µL/amostra) e 10U/µL (4µL/amostra), respectivamente.

3.4.7 Eletroforese em campo pulsado

Os produtos da digestão enzimática foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,0 % agarose Pulsed Field, BioRad) em tampão TBE 0,5X (0,9M Tris base, 0,9 M ácido bórico, 0,02 M EDTA), sendo os fragmentos

separados em um aparelho CHEF-DR II (BioRad), em temperatura de 14°C, durante um período de 19 horas (6 V/cm-1). O tempo de pulso inicial foi de 4 segundos e o tempo final de 40 segundos. Após a corrida, o gel de agarose foi corado em solução de brometo de etídio 50µL (10mg/mL) em 500mL de água destilada por 30 minutos e descorado por 60 minutos, trocando a água destilada a cada 20 minutos. A imagem foi capturada com o auxílio de um transiluminador (*Transiluminador High Performance UV Transilluminator*, UVP). As imagens foram salvas como arquivos TIFF.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 270 suabes analisados, 21 (7,7%) foram positivos para o gênero *Listeria*, distribuídos nas seguintes espécies: *L. innocua* (10), *L. monocytogenes* (9), *L. ivanovii* (1) e *L. seeligeri* (1).

Em relação às duas metodologias adotadas para o isolamento de *Listeria* sp., observou-se que todos os isolados de *L. innocua* foram recuperados por ambas as metodologias, enquanto dois isolados de *L. monocytogenes* obtidos no ágar PALCAM não foram identificados no ágar ALOA. Por outro lado, os isolados de *L. ivanovii* e *L. seeligeri* foram obtidos exclusivamente no ágar ALOA.

Na última década, inúmeros meios sólidos seletivos cromogênicos têm sido desenvolvidos para isolamento de *Listeria* sp. Notermans *et al.* (1991) foram os primeiros a utilizar o produto do gene *plcA* para a identificação de *L. monocytogenes*, acrescentando uma sobrecamada de L-alfa-fosfatidilinositol a meio sólido para isolamento de *Listeria* sp. Isolados de *L. monocytogenes* apresentam o gene *plcA* incluído no operon que contém o gene *hlyA*, responsável pela hemólise e reação de CAMP observados nessa espécie. Portanto, são capazes de produzir a enzima fosfatidilinositol-fosfolipase C que cliva o L-alfa-fosfatidilinositol ocasionando uma zona opaca ao redor da colônia. Posteriormente, Ottaviani *et al.* (1997) combinaram esse sistema de

detecção com o substrato cromogênico 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-beta-D-glucopiranosídeo acrescidos ao meio-base de enriquecimento seletivo que foi denominado Agar Listeria segundo Ottaviani e Agosti (ALOA). Nesse meio, a atividade de Beta-D-glucosidase do gênero *Listeria* é detectado pelo aparecimento de colônias azul turquesas, ao passo que *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* apresentam adicionalmente um halo opaco ao redor da colônia pela ação da fosfolipase C. Após o desenvolvimento desse meio, vários outros fabricantes lançaram meios cromogênicos com o mesmo propósito, atualmente, incluídos na maioria das metodologias para isolamento de *Listeria* (Reissbrodt, 2004).

O sucesso desses meios está relacionado ao fato de que o isolamento de *L. monocytogenes* pelas técnicas convencionais é laborioso e demanda vários dias para a obtenção do resultado definitivo. Ao lado disso, em alimentos onde existe baixa proporção de *L. monocytogenes* em relação às espécies não-patogênicas, pode ocorrer um alto índice de falso-negativos, uma vez que os meios convencionais não propiciam o aparecimento de colônias distintas nos dois grupos (Vlaemynck *et al.*, 2000; Stessl *et al.*, 2009). Ainda outra vantagem dos meios cromogênicos seria a possibilidade de semeadura direta, sem uma etapa de enriquecimento seletivo em caldo, permitindo a enumeração de *L. monocytogenes* nos alimentos (Reissbrodt, 2004).

No presente estudo, dois isolados de *L. monocytogenes* originados de duas amostras de carcaça não puderam ser recuperados na semeadura em ágar ALOA, significando uma menor sensibilidade da técnica de isolamento direto. Essa observação está possivelmente relacionada a um baixo número de

L. monocytogenes na superfície da carcaça e/ou a presença de microbiota acompanhante que interferiu com o seu crescimento no meio cromogênico. Nesse sentido, a utilização de uma etapa de crescimento em meio líquido seletivo favorece o aumento da população de *Listeria* sp. em relação aos contaminantes e permite uma maior produtividade no meio sólido seletivo. Ao lado disso, o ágar PALCAM tem demonstrado maior seletividade que o ALOA, provavelmente por conter uma maior concentração de cloreto de lítio e incluir acriflavina em sua formulação, o que contribui para a inibição da microbiota acompanhante (Stessl *et al.*, 2009). Por outro lado, apenas o ALOA permitiu a identificação de isolados de *L. ivanovii* e *L. seligeeri*. Nesse caso, a substância cromogênica deve ter favorecido a identificação de colônias suspeitas frente a microbiota acompanhante, permitindo a detecção de *Listeria* sp. na amostra. Esse resultado está de acordo com outros estudos que demonstraram que o ágar ALOA apresenta uma inclusividade do gênero *Listeria* superior ao ágar PALCAM, porém não é capaz de diferenciar *L. ivanovii* e *L. monocytogenes*, uma vez que ambas tem atividade de fosfolipase C (Vlaemynck *et al.*, 2000; Stessl *et al.*, 2009).

A enumeração de colônias típicas no Ágar ALOA não foi possível no presente estudo, principalmente pela presença de grande número de bactérias contaminantes, algumas inclusive com colônias semelhantes às do gênero *Listeria*. A presença do gênero *Bacillus* e *Enterococcus* demonstrou que pode resultar em colônias com pigmento azul turquesa, uma vez que produzem a enzima Beta-D-glucosidase (Stessl *et al.*, 2009). Portanto, a semeadura direta em ágar ALOA, sem ser precedida por uma etapa de enriquecimento seletivo

em caldo que propicie a inibição dos contaminantes, ao mesmo tempo que permite o aumento da população de *Listeria* sp., pode impedir a correta interpretação de colônias típicas. Dessa forma, ainda não é possível recomendar a adoção do isolamento direto em ALOA, porém é possível inferir que esse meio cromogênico pode contribuir para maior índice de detecção de *L. monocytogenes* após uma etapa de enriquecimento em caldo seletivo, como proposto por outros autores (Vlaemynck *et al.*, 2000; Stessl *et al.*, 2009).

Apesar de *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* serem patogênicas para animais, apenas raros casos de infecção por *L. ivanovii* são relatados em humanos (Hitchins, 2002). Assim, *L. monocytogenes* é a espécie investigada no âmbito da inocuidade dos alimentos. Entretanto, a presença de outras espécies de *Listeria* pode ser interpretada como um indicativo de condições adequadas para a presença da espécie patogênica (Vitas *et al.*, 2004), portanto seu isolamento deve ser considerado um risco no ambiente do frigorífico e nas carcaças.

No estabelecimento A, apenas uma carcaça foi positiva para *L. innocua*, em amostra colhida após a escaldagem, representando 1,04% do total (n=96) de amostras colhidas. Todas as amostras ambientais foram negativas. No estabelecimento B, 12 carcaças foram positivas para *Listeria* sp. em uma ou mais amostras colhidas ao longo da linha de abate, constituindo 8,33% do total (n=144). Nas amostras ambientais colhidas na indústria B, foi isolada *L. seeligeri* no piso da câmara fria na primeira coleta (17/3/2008), dois suabes de câmara fria foram positivos para *L. monocytogenes* na segunda coleta

(23/4/2008), e *L. innocua* foi encontrada no piso da evisceração na terceira coleta (8/6/2009).

As amostras de carcaça com maior frequência de isolamento de *L. innocua* foram colhidas após a escalda e a flambagem, enquanto após a evisceração predominou o isolamento de *L. monocytogenes* (Tabela 3). Na entrada da câmara fria, duas carcaças foram positivas para *L. monocytogenes* e uma para *L. innocua*.

Tabela 3: Resultado da pesquisa de *Listeria* sp. em suabes de carcaça colhidos em diferentes etapas da linha de abate de suínos em um frigorífico do sul do Brasil

Visita	Carcaça	Escaldagem	Flambagem	Evisceração	Câmara fria
1	1 A			Lm 1/2c	
2	2 A	Liva			
	2 B	Lin			Lm 1/2c
	2 C	Lin		Lm 1/2c	
	2 D			Lm 1/2c	
	2 E			Lm 1/2c	
	2 F				Lin
	2 G		Lin		
	2 I	Lin	Lin		
	2 J	Lin			
	2 K		Lin		
3	3 H			Lm 1/2c	Lm 1/2c
TOTAL		5	3	5	3
Lin = <i>Listeria innocua</i>		Liva = <i>L. ivanovii</i>		Lm = <i>L. monocytogenes</i>	

Os nove isolados de *L. monocytogenes* foram classificados em três diferentes: os sete isolados de carcaça foram identificados como sorotipo 1/2c, enquanto os isolados ambientais pertenciam aos sorotipos 1/2a e 1/2b. Esses sorotipos são os mais frequentemente encontrados em produtos cárneos e no ambiente de plantas de abate (Thevenot *et al.*, 2006; Swaminathan & Gerner-Schmidt, 2007; Gianfranceschi *et al.*, 2009). No Brasil, o sorotipo 1/2b foi o

mais encontrado em amostras colhidas em abatedouro de aves, enquanto o sorotipo 1/2c foi isolado em apenas uma amostra de um total de 31 carcaças de frango resfriado (Nalério *et al.*, 2009). Numa planta de processamento de salmão, o sorogrupo 1 também foi predominante, tanto em amostras colhidas no ambiente como em produtos (Cruz *et al.* 2008).

Von Laer *et al.* (2009) encontraram, em uma planta de produção de lingüiça, oitenta e três isolados de *L. monocytogenes*, sendo 59 (71,1%) do sorotipo 1/2c, 10 (12,1%) do sorotipo 1/2b e dois (2,4%) do sorotipo 4b. O sorotipo 1/2c foi isolado em todos os pontos de amostragem, com exceção de mistura pronta para embalagem. A elevada prevalência do sorotipo 1/2c pode estar associada à maior capacidade de aderência a superfícies de aço inoxidável, muito utilizado em ambientes de processamento de alimentos, permitindo que cepas residentes permaneçam por longo período nesse ambiente e contaminem os produtos em contato (Lundén *et al.* 2002; Thevenot *et al.*, 2006)

Dentre os sorotipos encontrados em nosso estudo, os sorotipos 1/2a e 1/2b têm sido relacionados com casos esporádicos de listeriose em humanos e, juntamente com o sorotipo 4b são responsáveis por 95% dos casos relatados no mundo (Schuchat *et al.*, 1991; Jacquet *et al.*, 2002; Jesus *et al.*, 2003; Gianfranceschi *et al.*, 2009; Clark *et al.*, 2010), indicando que pode haver risco, caso esses isolados encontrados na câmara fria contaminem as carcaças e cheguem até os produtos oferecidos ao consumidor. Por outro lado, o sorotipo 1/2c, único encontrado em carcaças, aparece esporadicamente em casos de listeriose humana, sido isolado com menor freqüência a partir de

amostras de humanos. Na Itália, Gianfranceschi *et al.* (2009), do total de 57 isolados de *L. monocytogenes* proveniente de humanos, encontraram apenas quatro do sorotipo 1/2c, ao passo que os sorotipos 1/2a (n=29) e 4b (n=14) foram os predominantes. A mesma situação foi relatada no Canadá, onde em 756 isolados de humanos, apenas oito pertenciam ao sorotipo 1/2c, enquanto 589 isolados estavam distribuídos homogeneamente entre os sorotipos 1/2a e 4b (Clark *et al.*, 2010). Tem sido sugerido que o sorotipo 4b seja mais virulento que os demais, uma vez que a taxa de fatalidade dos casos associados a esse sorotipo é muito mais elevada. Ao lado disto, há uma tendência à ocorrência de aborto, morte fetal e meningo-encefalite nas infecções pelo sorotipo 4b (Swaminathan & Gerber-Schmidt, 2007; Clark *et al.*, 2010).

O critério adotado para a inocuidade dos alimentos em vários países é a “tolerância zero” (ausência de *L. monocytogenes* em 25 gramas de alimento), não sendo considerado o sorotipo do isolado. Mesmo em países como Canadá e França, que aceitam a presença de *L. monocytogenes* em contagens inferiores a 100 UFC/g em alimentos considerados de baixo risco, a identificação do sorotipo não é levada em consideração (Thevenot *et al.*, 2006). Dessa forma, a ocorrência de qualquer isolamento de *L. monocytogenes* deve ser motivo de preocupação e resultar em medidas de controle no frigorífico.

Os isolados de *L. monocytogenes* foram genotipificados por macro-restrição seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE), segundo o protocolo do PulseNet, utilizando as enzimas *Apal* e *Ascl*. Ambas as enzimas, originaram dois pulsotipos (Figuras 1 e 2). O primeiro pulsotipo englobou os isolados obtidos de carcaças amostradas na primeira e na segunda visita ao

frigorífico, enquanto o segundo pulsotipo incluiu os isolados originados da câmara fria na segunda visita e de carcaça na terceira visita. O isolado obtido na primeira visita não foi clivado pela enzima *Ascl*. A resistência à clivagem por enzimas de restrição em cepas de *L. monocytogenes* foi relatada anteriormente, em relação à enzima *Apal* (Chasseignaux *et al.*, 2002) e associada a uma possível modificação do sítio de clivagem da enzima.

PFGE tem sido utilizado para detectar clones de *L. monocytogenes* envolvidas em surtos e discriminar a origem dos mesmos (Graves & Swaminathan 2001; Sauders 2003; Clark *et al.*, 2010). De acordo com Fugett (2007), a enzima *Apal* costuma ser mais discriminatória que a enzima *Ascl*, porém a combinação das duas enzimas deve ser adotada para identificar sub-grupos de *L. monocytogenes*. No presente estudo, a combinação das duas enzimas produziu dois grupos clonais entre os isolados.

Relacionando os pulsotipos com os sorotipos identificados, observa-se que o primeiro grupo clonal compreendia apenas isolado dos sorotipos 1/2c, enquanto o segundo grupo incluía três sorotipos distintos (1/2c, 1/2a e 1/2b). O agrupamento de isolados de sorotipos diferentes num mesmo pulsotipo foi igualmente observado por Chasseignaux *et al.* (2002) em isolados obtidos em abatedouros de aves e suínos. De acordo com Brosch *et al.* (1994), haveria duas divisões genômicas em *L. monocytogenes*: a primeira incluiria os sorotipos 1/2a, 1/2c e 3b; a segunda abrangeria 1/2b, 4b, 4d e 4e. Estudos mais recentes (Doumith *et al.* 2004a; Ragon *et al.*, 2008) propõem que o sorotipo 1/2b derivaria do sorotipo 4b; enquanto o sorotipo 1/2c teria evoluído do 1/2a. Isso explicaria a classificação dos isolados 3H e 3H' (sorotipo 1/2c) no

mesmo pulsotipo do isolado ambiental do sorotipo 1/2a, porém a inclusão do isolado obtido na câmara fria (1/2b) no mesmo grupo constitui uma observação que não encontra sustentação nessa hipótese.

De acordo com os genótipos encontrados, é possível identificar duas categorias de isolados: I. isolados proveniente de carcaças da primeira e segunda visita ao frigorífico; II. isolados provenientes da câmara fria da segunda visita e de carcaça da terceira visita. Em ambos os casos, configuram-se a distribuição e persistência de isolados de *L. monocytogenes* na indústria de alimentos, concordando com as observações feitas por Giovannacci *et al.* (1999), Chasseignaux *et al.* (2002), Von Laer *et al.* (2009) e Nalerio *et al.* (2009). A baixa diversidade encontrada entre os isolados no presente estudo podem representar a persistência de grupos clonais no ambiente da indústria, bem como uma possível adaptação de certos grupos ao suíno, determinando a contínua entrada desses isolados na linha de abate. Por outro lado, estudos têm demonstrado que mais de um grupo clonal pode estar presente no ambiente e nos alimentos, indicando que a tipificação de mais de um isolado por amostra pode ser aconselhável (Chasseignaux *et al.*, 2002). No presente estudo, apenas um isolado de cada amostra foi tipificado e, portanto, a avaliação da diversidade pode ter sido comprometida.

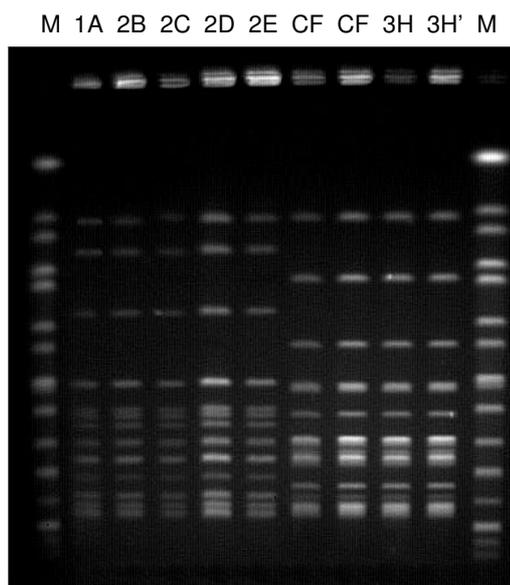


Figura 1. Perfil de macro-restrição de isolados de *L. monocytogenes*, obtidos em três coletas realizadas em abatedouro de suínos, clivados com enzima *Apal*. 1A, isolado de carcaça após a evisceração na primeira visita; 2B, isolado de carcaça na entrada da câmara fria na segunda visita; 2C/2D/2E, isolados de carcaças após a evisceração na segunda visita; 3H, isolado de carcaça após a evisceração na terceira visita; 3H", isolado de carcaça na entrada da câmara fria na terceira visita; CF, isolados de piso da câmara fria na segunda visita; M, marcador de peso molecular *Salmonella* Braenderup clivada com *Xba*I.

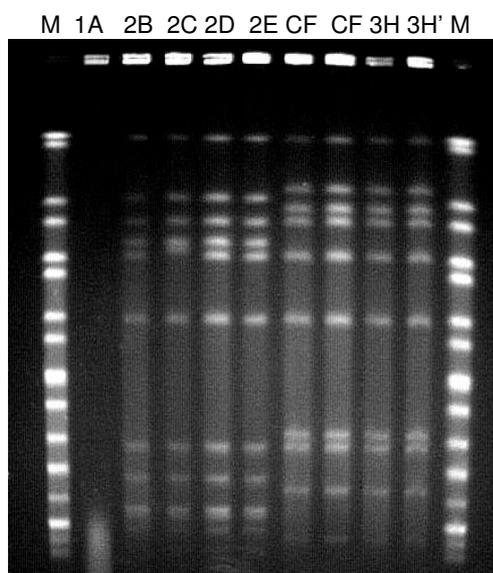


Figura 2. Perfil de macro-restrição de isolados de *L. monocytogenes*, obtidos em três coletas realizadas em abatedouro de suínos, clivados com enzima *Ascl*. 1A, isolado de carcaça após a evisceração na primeira visita; 2B, isolado de carcaça na entrada da câmara fria na segunda visita; 2C/2D/2E isolados de carcaças após a evisceração na segunda visita; 3H, isolado de carcaça após a evisceração na terceira visita; 3H", isolado de carcaça na entrada da câmara fria na terceira visita; CF isolados do piso da câmara fria na segunda visita; M, marcador de peso molecular *Salmonella* Braenderup clivada com *Xba*I.

A origem da contaminação de carcaças suínas por *L. monocytogenes* tem sido tema de discussão na literatura. Suínos carregam a bactéria no trato gastrointestinal, como pode ser observado em estudos que amostraram fezes e suabes peri-anais de animais ao abate (Skovgaard & Norrung, 1989; Beloeil *et al.*, 2003). Lotes com maiores prevalências de carreadores parecem estar associados ao fornecimento de ração líquida e à deficiente desinfecção na granja (Fosse *et al.*, 2009). A partir desses animais carreadores, as carcaças seriam contaminadas pelo extravasamento do conteúdo intestinal na linha de processamento (Thevenot *et al.*, 2006). Essa hipótese é compatível com o resultado obtido no presente estudo, onde todos os isolados de *L. monocytogenes* foram encontrados após a evisceração e apenas no frigorífico onde foi observada a ocorrência de extravasamento de conteúdo intestinal durante a retirada das vísceras. Outros estudos demonstram que as tonsilas albergam populações ainda mais elevadas de *L. monocytogenes* que o intestino e que o contato de tonsilas e língua com o restante da carcaça durante a retirada das vísceras e da cabeça seria uma importante origem de contaminação (Autio *et al.*, 2000; Thevenot *et al.*, 2006). A entrada contínua desses isolados contaminaria o ambiente da indústria, propiciando que alguns grupos clonais permanecessem como população residente, inclusive sobrevivendo aos procedimentos de limpeza e desinfecção (Lundén *et al.*, 2002). No presente estudo, a transferência de um isolado de mesmo pulstotipo entre quatro carcaças processadas no mesmo turno de abate pôde ser comprovada. Ao lado disso, a entrada repetida ou a sua permanência na indústria ao longo do tempo pode ser suspeitada, uma vez que o isolado

encontrado em carcaças na primeira e na segunda visita foi do mesmo pulsotipo. A identificação de um isolado de pulsotipo distinto no ambiente durante a segunda visita e seu isolamento a partir de carcaças na terceira visita, após 14 meses, reforça a hipótese de entrada permanente de grupos clonais e sua permanência no ambiente, constituindo um ciclo de contaminação e recontaminação na indústria.

Comparando as linhas de abate dos estabelecimentos A e B, observou-se que a indústria A contava com uma planta dotada de túnel de flambagem e práticas de fabricação consideradas apropriadas para evitar o extravasamento de conteúdo intestinal, além de adotar procedimentos para evitar o excesso de umidade no ambiente. A evidente preocupação com o controle de qualidade nessa planta pode ter refletido na baixa frequência de isolamento de *Listeria* sp. e a ausência de *L. monocytogenes* nas carcaças. Ao contrário, a indústria B apresentou deficiência em suas instalações e nas práticas adotadas na linha de abate, o que pode ter influenciado com a maior frequência de contaminação de carcaças e do ambiente.

De forma geral, as recomendações propostas para o controle tem sido uma maior investigação da importância do suíno como forma de introdução de *Listeria* sp. na linha de abate, bem como os fatores de risco que contribuem para a infecção de tonsilas e intestino com essa bactéria. Ao lado disto, medidas de higiene e desinfecção direcionadas ao ambiente da indústria e às práticas adotadas na linha de abate devem ser avaliadas e discutidas para impedir o estabelecimento e a permanência de grupos clonais.

Outro aspecto que tem sido muito investigado diz respeito à resistência aos antimicrobianos, de extrema importância para saúde pública (Mantilla *et al.*, 2008a). Por essa razão, os isolados de *L. monocytogenes* do presente estudo foram submetidos ao antibiograma, demonstrando ser suscetíveis frente a todos os antimicrobianos testados.

O gênero *Listeria* apresenta susceptibilidade aos antimicrobianos (Aureli *et al.*, 2000). Em geral, *L. monocytogenes* é sensível à penicilina, ampicilina, aminoglicosídeos, eritromicina e tetraciclina (Martinez *et al.*, 2001). Pagotto *et al.* (2006) verificaram, ao testar a susceptibilidade de *L. monocytogenes* frente a vários agentes antimicrobianos, que o tratamento para listeriose pode ser realizado através da associação entre ampicilina e gentamicina. No entanto, Rang *et al.* (2001) indicam que o tratamento de listeriose deve ser realizado com amoxicilina e eritromicina como antibióticos de primeira e segunda escolha, respectivamente. Para o tratamento de bacteremia e de gestantes com listeriose, indica-se a vancomicina e a eritromicina, respectivamente (White *et al.*, 2002). A alta taxa de sensibilidade das cepas de *L. monocytogenes* isoladas neste estudo aponta para uma situação menos preocupante em relação aos perfis de resistência, encontrados em outras bactérias transmitidas por alimentos. Entretanto, cepas resistentes já foram identificadas em outros estudos. Chiarini (2007) testou 210 cepas *L. monocytogenes*, identificando cinco isolados provenientes de superfície e de afiador de faca, resistentes à eritromicina e ao cloranfenicol. Cento e vinte e sete isolados apresentaram também resistência à clindamicina, e um à ciprofloxacina.

Harakeh *et al.* (2009) encontraram, no Líbano, isolados resistentes à penicilina (90%), ampicilina (60%) e vancomicina (26%). Apesar de a resistência à vancomicina apresentar uma menor frequência, é considerada como muito relevante, pois é a droga de eleição para tratamento de casos graves. A origem da elevada resistência nesse estudo foi atribuída ao tratamento freqüente da listeriose no Líbano. Entretanto, o uso de antimicrobianos de forma indiscriminada na população humana e animal, constituem um risco permanente para a seleção de cepas resistentes de patógenos.

5. CONCLUSÕES

O gênero *Listeria* pôde ser encontrado no ambiente de matadouros-frigoríficos, bem como contaminando a superfície de carcaças suínas em linhas de abate. A freqüência de isolamento demonstrou ser mais elevada em condições de instalação e práticas de fabricação mais deficientes. Nessa situação, grupos clonais de *L. monocytogenes* distribuem-se entre carcaças e no ambiente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIPECS – Associação Brasileira da Indústria Brasileira Produtora e Exportadora de Carne Suína. **Estatísticas**. Disponível em <<http://www.abipecs.org.br>>. Acesso em 12 de abril de 2010.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis Y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3 ed. Washington: Organização Panamericana de Saúde (OPS), 2001.

ARRUDA, G. A. **Perfil genotípico de cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de alimentos: análise crítica das técnicas de PCR e PFGE e importância para a saúde pública**. São Paulo; s.n; 2006. 108 p. tab, Graf-BVS- Biblioteca Virtual em Saúde

AURELI P.; *et al.* **An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes***. New England Journal of Medicine 2000; 342: 1236–1241.

AUTIO, T.; *et al.* ***Listeria monocytogenes* contamination pattern in pig slaughterhouses**. J. Food Prot 63, 2000. 1438–1442.

BARCELLOS, A. S. J. **Análise Evolutiva da indústria de Frigoríficos de Produtos Suínos no Rio Grande do Sul do ano de 1950 até o ano de 2004: Declínio ou simples Concentração de Mercado?** Universidade do Vale do Rio dos Sinos – Centro de Ciências Econômicas – Mestrado em Administração-2006

BAUER, A. W.; *et al.* **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method**. American Journal of Clinical Pathology, v. 45, p 493-496, 1966.

BELOEIL, P,A.; *et al.* ***Listeria monocytogenes* contamination of finishing pigs: an exploratory epidemiological survey in France**. Vet. Res. 34 (2003) 737–748

BERENDS, B. R.; *et al.* **Identification and qualification of risk factors regarding *Salmonella* spp.** On Pork carcasses. International Journal of Food Microbiology, v. 36, p. 199-206, 1997.

BERZINS, A.; *et al.* **Factors associated with *Listeria monocytogenes* contamination of cold-smoked pork products in Latvia and Lithuania.** Int Journal Food Microbiol. 115, p. 173-179, 2007.

BORUCKI, M. K.; CALL, D, R. ***Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR.** J Clin Microbiol . Dec. 2003; 5537-40.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº9, de 8 de abril de 2009.** Institui os procedimentos de controle de *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para consumo.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Instrução Normativa nº 62 de 26/08/2003.** Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial da União, Brasília. Seção 1, p. 14. 2003.

BROSCH, R.; CHEN,J.; LUCHANSKY, J. B. **Pulsefield fingerprinting of *Listeriae*: identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar.** Applied and Environmental Microbiology. 60, 2584-92. 1994.

CAMPOS, L. C. **Microbiologia.** 4. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2004. 235-242p.

CHASSEIGNAUX, E.; *et al.* **Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw meat processing plants.**FEMS Microbiol Lett.p.210, 271-275, 2002.

CHIARINI, Eb. ***Listeria monocytogenes* em matadouros de aves: marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação.** 2007. 146 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência Dos Alimentos Área de Bromatologia, Faculdade de Ciência Farmacêuticas, São Paulo, 2007.

CLARK, C. G.; *et al.* **Surveillance for *Listeria monocytogenes* and listeriosis**, 1995–2004. *Epidemiol. Infect.* 138, 559–572. 2010.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, formerly NCCLS). **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard, second edition**. CLSI/ NCCLS document M31-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards, 2002.

COSSART, P. **Molecular and cellular basis of the infection by *Listeria monocytogenes*: An overview**. *International Journal of Medical Microbiology*. 291(6-7):401-409, 2002.

CRUZ, C. D.; MARTINEZ, M. B.; DESTRO, M. T. ***Listeria monocytogenes*: Um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil**. *Alim. Nutr.*, Araraquara v.19, n.2, p. 195-206, abr./jun. 2008

CVE- Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. **Manual das doenças transmitidas por alimentos. *Listeria monocytogenes*** www.cve.saude.sp.gov.br (Centro de Vigilância Epidemiológica-“Prof. Alexandre Vranjac”) 01/09/09 . 14:57

DOUMITH, M.; *et al.* **Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR**. *Journal Clin Microbiol* . p.3819-3822. 2004a.

DOUMITH, M.; *et al.* **New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays**. *Infect Immun* 72: 1072–1083, 2004b.

FANTELLI, K.; STEPHAN, R. **Prevalence and characteristics of shigatoxin-producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland**. *International Journal Food Microbiology*, Amsterdam, v. 70, n. 1/2, p. 63-69, 2001.

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

FOSSE, J.; SEEGER, H.; MAGRAS, C. **Foodborne zoonoses due to meat: a quantitative approach for a comparative risk assessment applied to pig slaughtering in Europe.** Vet. Res. 2009. 39:01

FUGETT, E. B; *et al.* **Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of temporally matched *Listeria monocytogenes* isolates from human clinical cases, foods, ruminant farms, and urban and natural environments reveals source-associated as well as widely distributed PFGE types.** Journal of clinical microbiology 2007;45(3):865-73.

GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P, M. **Methods for the isolation and identification of *Listeria sp.* and *Listeria monocytogenes*: a review.** FEMS Microbiol Rev. p.851-875, 2005.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos.** São Paulo: Varela, 2003.

GIANFRANCESCHI, M. V.; *et al.* **Distribution of serotypes and pulsotypes of *Listeria monocytogenes* from human, food and environmental isolates (Italy 2002–2005).** Food Microbiology 26 (2009) 520–526

GIOVANNACCI, I.; *et al.* ***Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants. Use of RAPD, PFGE, and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology.** Int J Food Microbiol 53, 127–140, 1999.

GRAVES, L. M.; SWAMINATHAN, B. **PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis.** Int. J. Food Microbiol. 65:55 – 62, 2001.

HARAKEH, S.; *et al.* **Science of the Total Environment.** 407, 4022–4027, 2009.

HITCHINS, A. D. **Critical Steps in detection of *L.monocytogenes* using the FDA BAM culture methodology.** Lecture on the 5th Annual Food Pathogen Analysis Conference. St. Pete Beach, Florida, 29th July, 2002.

HOFER, C. B.; MELLES, C. E, A.; HOFER, E. ***Listeria monocytogenes* in renal transplant recipients.** Rev Soc Bras Med Trop. São Paulo 41: 375-377, 1999.

HOFER, E.; NASCIMENTO, R. S.; OLIVEIRA, M. A. **Meningite por *Listeria monocytogenes***. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. Rev Soc Bras Med Trop 31: 173-177. 1998.

HOFER, E.; REIS, C. M.; HOFER, C. B. **Serovars of *Listeria monocytogenes* and related species isolated from human clinical specimens**. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.39, n.1, p.32-37, Jan.-Feb. 2006.

HOFER, E.; RIBEIRO, R.; FEITOSA, D. P. **Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997**. Memórias do Instituto Adolfo Cruz, São Paulo, v. 95, n.5, p.615-620, 2000.

INSTITUTO DE ESTUDOS DO COMÉRCIO E NEGOCIAÇÕES INTERNACIONAIS - ICONE. Disponível em: <www.iconebrasil.org.br>. Acesso: 08 de fevereiro de 2010.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS – ICMSF. **Microorganisms in Foods 7**. Microbiological Testing in Food Safety Management, New York, Springer Science, Business Media, p.285-309, 2001.

JACQUET, C.; *et al.* **Expression of ActA, Ami, InlB, and Listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of Human and Food Origin**. Applied And Environmental Microbiology, Feb. 2002, p. 616–622

JAY, J. M. **Listerioses de origem animal**. In. Microbiologia de alimentos. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap. 25, p. 517-542, 711.

JEMMI, T.; *et al.* **Prevalence and risk for contamination with *Listeria monocytogenes* of imported and exported meat and fish products in Switzerland**. 1992-2000. Preventive Veterinary Medicine, n.54, p.25-36, 2002.

JESÚS, A. J.; WHITING, R. C. **Thermal inactivation, growth, and survival studies of *Listeria monocytogenes* strains belonging to three distinct genotypic lineages**. Journal of Food Protection, v. 66, n. 9, p. 1611-1617, 2003.

KUNIGK, L.; ALMEIDA, M. C. B. **Action of peracetic acid on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in suspension or settled on stainless steel surfaces.** Brazilian Journal of Microbiology. São Paulo, v.32, p 38-41, jan 2001.

LECLERC, V.; *et al.* **Phatogens in meat and milk products: surveillance and impact on human health in France.** Livestock Production Science n. 76,p. 195-202, 2002.

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. **Microbiologia de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente.** Ciência Rural, v. 31, n. 6, p. 1063-1067, 2001.

LÓPES, V.; *et al.* **Molecular tracking of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig abattoir and processing plant.** Meat Sci.,78, p. 130-134, 2008.

LUKINMA, S.; *et al.* **Molecular epidemiology of *Clostridium perfringens* related to food-borne outbreaks of disease in Finland from 1984 to 1999.** Appl. Environ. Microbiol. 68:3744–3749, 2002.

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

MaCFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria.** 3. ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins. Cap. 43, p. 544-545, 2000.

MANTILLA S, P, S.; *et al.* **Resistência antimicrobiana de bactérias do gênero *Listeria* spp. Isoladas de carne moída bovina.** Braz. J. vet. Res. Anim. Sci, São Paulo, v.45, n2,p116-121, 2008a.

MANTILLA, S. P. S.; *et al.* **Importância da *Listeria monocytogenes* em alimentos de origem animal.** Revista da FZVA. Uruguaiana, v 14, n° 1, p.180-192, 2007b.

MANTILLA, S. P. S.; *et al.* **Ocorrência de *Listeria* spp. em amostras de carne bovina moída comercializadas no município de Niterói, RJ, Brasil.** Ciência Agrotec. Lavras, v. 31,n.4,p. 1225-1230, Jul/ Ago., 2007c.

MARKKULA, A.; *et al.* **Raw and processed fish show identical *Listeria monocytogenes* genotypes with pulsed-field gel eletrophoresis.** Journal of Food Protection, v. 68, n. 6, p. 1228-1231, 2005.

MARTINEZ-MARTINEZ, L.; *et al.* **Activities of gemifloxacin and five other antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* and coryneform bacteria isolated from clinical samples.** Antimicrob Agents Chemother. V45, 2390-2392,2001.

MCLAUCHLIN, J. **The identification of *Listeria* species.** International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v.38, p.77-81, 1997.

MCMULLEN, L. M. **Intervention Strategies to Improve the Safety of Pork.** Advances in Pork Production, n.11,p.165-173, 2000.

MEAD, P. S.; *et al.* **Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat.** Epidemiol. Infect. 134. p. 744-751, 2006.

MIELE, M.; MACHADO, J. S. **Panorama da Carne Suína Brasileira.** Agroanalysis: A Revista de Agronegócios da FGV, São Paulo, v. 30, n. 01, p.36-42, jan. 2010. Mensal.

MOTTIN, V. D. **Avaliação Microbiológica de apresuntados, fatiados e comercializados em supermercados de Porto Alegre, RS.** Dissertação Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. Porto Alegre, RS, Fevereiro, 2008.

MURRAY, P. R.; *et al.* ***Listeria*, *Erysipelothrix* e outros bacilos Gram-positivos.** Microbiologia médica. Ed. 3, Rio de Janeiro.Guanabara Koogan,cap. 27, p. 181-184, 2000.

NALÉRIO, E. S.; *et al.* ***Listeria monocytogenes*: monitoramento desse perigo biológico na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 29(3): 626-630, jul.-set. 2009

NIKOLAEV, Y. A.; PLAKUNOV, V. K. **Biofilm “City of Microbes” or an Analogue of Multicellular Organisms?** Micribiology. 76(2), 125-138, 2007.

NOTERMANS, S. H.; *et al.* **Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species.** Appl Environ Microbiol. 1991 Sep; 57 (9): 2666–2670.

NUFER, U.; STEPHAN, R.; TASARA, T. **Growth characteristics of *Listeria monocytogenes*, *Listeria welshimeri* and *Listeria innocua* strains in broth cultures and a sliced bologna-type product at 4 and 7 °C.** Food Microbiology, 2007; 24: 444–451.

OLIVEIRA, M. M. M., *et al.* **Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential.** Brazilian Journal of Microbiology 41: 97-106, 2010.

ORNDORFF, E.; *et al.* **Veterinary Microbiology** . v.114 p1-15, 2006.

OTTAVIANI, F.; OTTAVIANI, M.; AGOSTI, M. **Differential Agar medium for *Listeria monocytogenes*.** Quimper Froid. Symposium proceedings'. P6 A.D.R.I.A. Quimper (F), 16–18, 1997.

PAGOTTO, F.; CORNEAU, N.; FARBER, J. ***Listeria monocytogenes* infections in:** RIEMANN, H.; CLIVER, D., eds. FOOD-borne infections and intoxications. 3 ed. New York, London: Academic Press, 2006. cap 9, p 313-340.

PINTO, U. M.; CARDOSO, R. R.; VANETTI, M. C. D. **Detecção de *Listeria*, *Salmonella* e *Klebsiella* em serviço de alimentação hospitalar.** Rev. Nutr., Campinas, 17: 3, p.319-326, Jul/Set.,2004.

PORTNOY, D. A.; AUERBUCH, V. **The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity.** J. Cell Biol, 5: 158(3), p. 409-14, Aug, 2002.

PULSENET - The National Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance - **Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of *Listeria monocytogenes* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).** 2009

RAGON, M.; *et al.* **A New Perspective on *Listeria monocytogenes* Evolution.** Plos Pathogens, Paris, v. 4, n. 9, p.1-14, set. 2008.

RANG, H. P.; *et al.* **Farmacologia.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p 703.

REBAGLIATI, V.; *et al.* **Prevention of foodborne listeriosis.** Indian Journal of Pathology and Microbiology. 52(2), April/ June, 2009.

REISSBRODT, R. **Review New chromogenic plating media for detection and enumeration of pathogenic *Listeria* spp. - an overview.** International Journal of Food Microbiology 95 (2004) 1 – 9

ROCOURT, J; COSSART, P. ***Listeria monocytogenes.*** In: Doyke, M.P.; BEUCHAT, L.R; Montville, T.J. Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. 337-352. 1997.

RYSER, E. T.; DONNELLY, C. W. ***Listeria.*** In: DOWNES, F.P. & ITO, K. (Eds.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. p.63-67.

SANTOS, L. A. G.; *et al.* **Detecção de *Listeria monocytogenes* como subsídio à determinação de pontos críticos de controle no abate de suínos.** Biosc. J. Uberlândia, v. 21, n.2, p. 131-135, May/Aug, 2005.

SAUDERS, B. D.; *et al.* **Molecular subtyping to detect human listeriosis clusters.** Emerg. Infect. Dis. v.9 p.672–680. 2003.

SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C.V. **Epidemiology of human listeriosis.** Clin Microbiol Rev 4, 169– 183, 1991.

SCHWAB, J. P.; EDELWEISS, M. I. A. **Identificação de *Listeria monocytogenes* em placentas humanas e espécimes de aborto pela técnica de imunohistoquímica.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial 39(2): 111-114, 2003.

SHINOHARA, N. K. S.; *et al.* ***Clostridium perfringens* em alimentos.** Higiene Alimentar. São Paulo. Vol 17, n°106, Mar 2003.

SILVA, N. V. C. A.; *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3ª Ed. São Paulo, Varela. P. 552, 2007.

SILVA, W.P.; *et al.* ***Listeria* spp. no processamento de lingüiça fresca em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil**. *Ciência Rural*, v. 34, n. 3: 911-916, 2004.

SKOVGAARD, N.; NORRUNG, B. **The incidence of *Listeria* spp in faeces of Danish pigs and in minced pork meat**. *Int J Food Microbiol* 8, 59–63, 1989.

SÖRQUIST, S. **Heat resistance of different serovars of *Listeria monocytogenes***. *J. Appl Bact.*, n.76, p. 383-388,1994.

STESSL, B. *et al.* **Performance testing of six chromogenic ALOA-type media for the detection of *Listeria monocytogenes***. *Journal Of Applied Microbiology*, Vienna, Austria, p. 651-659, 2009.

SWAMINATHAN, B.; *et al.* **PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States**. *Emer. Infect. Dis.* 7, 382–389, 2001.

SWAMINATHAN, B., & GERNER-SMIDT, P. **The epidemiology of human listeriosis**. *Microbes Infect.* 9,1236-1243. 2007.

THEVENOT, D.; DERBURG, A.; VERNZOZY-ROZAND, C. **An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products**. *Journal of Applied Microbiology* v.101,p. 7–17, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B, R.; CASE, C, L. **Microbiologia**. 2006 8ª ed. p.619-620. Porto Alegre: Artmed.

TOYOSHIMA, M. T. K.; *et al.* ***Listeria monocytogenes* peritonitis in cirrhotic patients: first description in Brasil**. *Rev.Inst.Med.Trop.S.Paulo*, 48(5), p. 291-293, Sep a Oct 2006.

UHITIL, S.; *et al.* **Prevalence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in cakes in Croatia**. *Food Control*, 15, p. 213-216, 2004.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. (USDA) *Agricultural Research Service. Annual Report 2008: Controlling *Listeria monocytogenes* in Further Processed Meat.* Retrieved January 4, 2009.

VAZQUEZ-BOLAND, J. A.; *et al.* ***Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants.** Clin. Microbiol. Rev. 14, p. 584. 2001.

VITAS, A. I.; AGUADO, V.; GARCIA-JALON, I. **Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain).** International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v. 90, n. 3, p. 349-356, Feb. 2004.

VLAEMYNCK, G.; LAFARGE, V.; SCOTTER, S. **Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium.** J. Appl. Microbiol.88, 430– 441, 2000.

VON LAER, A. E.; *et al.* **Characterization Of *Listeria Monocytogenes* Isolated From A Fresh Mixed Sausage Processing Line In Pelotas-Rs By PFGE.** Brazilian Journal of Microbiology (2009) 40: 574-582

WHITE, O. G.; *et al.* **Antimicrobial resistance of foodborne pathogens.** Microbes and Infection, v. 4, p.405-412, 2002

WINN Jr., W. C.; *et al.* **Koneman Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas** Colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan. 760-851 p., 2008.