

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia Agroindustrial



Dissertação

Aspectos epidemiológicos e moleculares de *Listeria*  
spp. e de *Listeria monocytogenes* na cadeia  
produtiva de aves do sul do Rio grande do Sul

**Élen Silveira Nalério**

Pelotas, 2007

ÉLEN SILVEIRA NALÉRIO

**Aspectos epidemiológicos e moleculares de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* na cadeia produtiva de aves do sul do Rio Grande do Sul**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Microbiologia de Alimentos)

**Orientador: Wladimir Padilha da Silva**

**Pelotas, 2007**

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fábio Leivas Leite  
Profa. Dra. Márcia Monks Jantzen  
Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

*À minha querida mãezinha,  
minha heroína.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por estar sempre junto a mim, me guiando.

A minha família, mãe, pai, Natália e Léo, por serem a base de tudo e, incansavelmente, estarem ao meu lado, incentivando e torcendo pelos meus ideais.

Ao Lothar que, incondicionalmente, está ao meu lado e com palavras amigas, mostrou que sempre vale a pena lutar.

A grande família Nalério, onde todos, mesmo que indiretamente, sempre estiveram presentes na minha vida me apoiando, principalmente, minha “irmã” Ivna, que desde a infância sonhou comigo o futuro.

A minha querida amiga Márcia, que compartilhou de todos os momentos deste trabalho e que nunca se limitou em ser colega de trabalho e sim, uma enorme amiga, da qual me orgulho muito por suas atitudes e decisões.

A amiga Andréia, que me auxiliou com a técnica RAPD, além de estar sempre presente com bons conselhos.

A Graci, Milena e Karla por terem fornecido grandes esforços durante todo o trabalho.

Aos amigos Fernando Zocche e Rodrigo França, por auxiliarem nas coletas com muita disposição, mesmo tendo que acordar bem cedinho.

Ao meu orientador e amigo, Wladimir Padilha da Silva, que desde a graduação me mostrou uma conduta profissional exemplar e, acima disso, me proporcionou crescer.

Ao amigo Prof. Celso Medina Fagundes, que, com seu bom humor, nos diverte, além de sempre proporcionar “uma caroninha”.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos Marcelo, Carol, Márcia Jantzen, Kátia, Francine, Kika, Lauri e Eduardo.

Aos professores e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial.

Ao Laboratório de Biotecnologia de Alimentos por proporcionar a execução dos géis de RAPD.

Ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz), em especial ao Dr. Ernesto Hofer, pela sorotipagem das cepas.

Ao colega Médico Veterinário, Eugênio Roberto Costa, por disponibilizar sangue eqüino para a confecção de meio de cultura.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia por proporcionarem a realização do curso.

À CAPES (Coordenação de Apoio a Pesquisa em Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente, contribuíram para este estudo.

*"Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa  
ignorância."  
(John Kennedy)*

## RESUMO

NALÉRIO, ÉLEN SILVEIRA. M.S. Universidade Federal de Pelotas, março, 2007. Aspectos epidemiológicos e moleculares de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* na cadeia produtiva de aves do sul do Rio Grande do Sul. Professor orientador: Wladimir Padilha da Silva.

*Listeria monocytogenes* é o agente etiológico da listeriose, uma severa infecção de origem alimentar, a qual apresenta taxa de mortalidade ao redor de 20-30%. É uma bactéria amplamente distribuída na natureza, assim como, entre os animais e o homem, os quais podem portá-la de modo assintomático. Pelo seu caráter psicrótrófico e ubíquo, tornou-se um grande desafio para a indústria alimentícia e para os órgãos de vigilância sanitária. Com este trabalho objetivou-se estudar a ocorrência e a dispersão de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio grande do Sul. Os estabelecimentos avícolas foram avaliados através de 70 amostras de *swabs* cloacais e de arrasto da cama dos aviários, isolando-se *L. monocytogenes* em 2,9% (1/35) dos *swabs* cloacais e *L. innocua* em 2,9% (1/35) dos *swabs* de arrasto. Das 144 amostras originadas da planta de abate e processamento de frangos, 38,2% (55/144) apresentavam contaminação por *Listeria* spp. A espécie isolada com maior frequência foi *L. innocua*, com 32,6% (47/144), enquanto 10,4% (15/144) apresentaram contaminação por *L. monocytogenes*. Das 25 amostras de frangos refrigerados provenientes do comércio varejista na cidade de Pelotas/RS, isolou-se *Listeria* spp. em 92% (23/25), *L. innocua* em 76% (19/25), *L. monocytogenes* em 20% (5/25) e *L. seeligeri* em 4% (1/25). Observou-se que 66,3% (55/83) isolados de *Listeria monocytogenes* pertenciam ao sorotipo 1/2b, enquanto 14,5% (12/83) pertenciam ao sorotipo 4b, 12% (10/83) ao sorotipo 1/2a, 3,6% (3/83) ao

sorotipo 1/2c e 3,6% (3/83) ao sorotipo 4e. A técnica de RAPD permitiu verificar que alguns isolados de *L. monocytogenes* persistem na planta de processamento, sendo importantes na contaminação cruzada para o produto final.

Palavras-chave: *Listeria* spp., *Listeria monocytogenes*, estabelecimentos avícolas, plantas de processamento, frangos refrigerados.

## ABSTRACT

NALÉRIO, ÉLEN SILVEIRA. M.S. Universidade Federal de Pelotas, march, 2007. Epidemiology and molecular aspects of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in a productive chain of birds in the south of the Rio Grande do Sul. Adviser: Wladimir Padilha da Silva.

*Listeria monocytogenes* is the causative agent of listeriosis, a severe foodborne infection, with a high case fatality rate of 20-30%. It is a bacterium widely distributed in the nature, as well as, among the animals and the man, which can carry it in asymptomatic way. For its psychrotrophic and ubiquitous character, it became a great challenge for the nourishing industry and the agencies of sanitary monitoring. The aim of this work was to study the prevalence and the dispersion of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in the poultry productive chain of the south of the Rio Grande do Sul state. The poultry establishments had been evaluated through 70 samples of cloacal swabs and drag, where was isolated *L. monocytogenes* in 2.9% (1/35) of cloacal samples and *L. innocua* in 2.9% (1/35) of drag samples. From the 144 samples of the poultry slaughterhouse environment, 38.2% (55/144) were contaminated by *Listeria* spp.. The species more frequently isolated was *L. innocua*, with 32.6% (47/144), while 10.4% (15/144) of the samples presented *L. monocytogenes*. With regard to the samples of cooled chicken originated from the retailing of the city of Pelotas/RS, *Listeria* spp. was isolated in 92% (23/25) of the samples, *L. innocua* in 76% (19/25), *L. monocytogenes* in 20% (5/25) and *L. seeligeri* in 4% (1/25). It was observed that 66.3% (55/83) isolates of *Listeria monocytogenes* belonged to serotype 1/2b, while 14.5% (12/83) belonged to serotype 4b, 12% (10/83) to serotype 1/2a, 3.6% (3/83) to serotype

1/2c and 3.6% (3/83) to serotype 4e. The RAPD technique allowed verifying that some isolates of *L. monocytogenes* persists in the processing plant, being important in cross contamination for the final product.

Key-words: *Listeria* spp., *Listeria monocytogenes*, poultry farms, processing plants, chickens.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características bioquímicas de bactérias do gênero <i>Listeria</i> .....	7
Tabela 2 – Pontos de amostragem na linha de abate e processamento.....	27
Tabela 3 – Pontos de amostragem do ambiente e equipamentos na planta de processamento de frangos.....	29
Tabela 4 – Distribuição de <i>Listeria</i> spp. e dos sorotipos de <i>L. monocytogenes</i> na linha de abate e processamento de frangos.....	41
Tabela 5 - Perfis RAPD de 81 isolados de <i>L. monocytogenes</i> provenientes da cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul.....	54

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Representação esquemática da transmissão de *L. monocytogenes* entre habitat e hospedeiros .....10
- Figura 2 – Fatores que influenciam a contaminação por *L. monocytogenes* em alimentos..... 16
- Figura 3 – Representação esquemática da linha de abate e processamento de frangos e dos pontos amostrados em cada etapa.....25
- Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose (1,5%) dos perfis RAPD obtidos com o *primer* UBC 155. Pista M – marcador de peso molecular Ladder 100pb Biolabs®; pista 1 – 21: padrões de bandas de DNA dos perfis de 1 a 21; pista (-): controle negativo.....48
- Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose (1,5%) dos perfis RAPD obtidos com o *primer* UBC 127. Pista M – marcador de peso molecular Ladder 100pb Biolabs®; pista A – S: padrões de bandas de DNA dos perfis de A a S ; pista (-): controle negativo.....48

## SUMÁRIO

	Página
Lista de Tabelas.....	xii
Lista de Figuras.....	xiii
Resumo.....	viii
Abstract.....	x
1. Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica.....	4
2.1 <i>Listeria</i> spp.- história.....	4
2.2 Classificação.....	4
2.3 Características.....	5
2.4 Fontes de <i>Listeria</i> spp. ....	7
2.5 <i>Listeria monocytogenes</i> e listeriose.....	11
2.6 Sorotipos de <i>Listeria monocytogenes</i> envolvidos em listeriose.....	14
2.7 <i>Listeria monocytogenes</i> – risco e ocorrência nos alimentos.....	15
2.8 <i>Listeria monocytogenes</i> e a indústria alimentícia.....	18
2.9 Ferramentas para investigação epidemiológica de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	19
3. Materiais e métodos.....	23
3.1 Estabelecimentos avícolas.....	23
3.1.1 Processo de amostragem.....	23

3.2	Frigorífico-abatedouro.....	23
3.2.1	Processo de amostragem.....	26
3.3	Amostras obtidas no comércio.....	29
3.3.1	Processo de amostragem.....	29
3.4	Isolamento e identificação de <i>Listeria</i> spp.....	30
3.5	Sorotipagem dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	32
3.6	Análise de DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD – <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> ).....	33
3.6.1	Preparo das células.....	33
3.6.2	RAPD.....	33
3.7	Análise dos resultados.....	34
4.	Resultados e discussão.....	35
4.1	Ocorrência de <i>Listeria</i> spp.....	35
4.1.1	Ocorrência de <i>Listeria</i> spp. na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul.....	35
4.1.2	Ocorrência de <i>Listeria</i> spp. nos estabelecimentos avícolas.....	35
4.1.3	Ocorrência de <i>Listeria</i> spp. na planta de abate de frangos.....	36
4.1.4	Ocorrência de <i>Listeria</i> spp. em frangos refrigerados comercializados na cidade de Pelotas/RS.....	44
4.2	Subtipificação dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> por sorologia.....	45
4.3	Subtipificação dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> por RAPD.....	47
4.3.1	Análise dos perfis RAPD individuais.....	49
4.3.2	Análise dos perfis RAPD compostos.....	50
5.	Conclusões.....	58
6.	Referências.....	59

## 1 INTRODUÇÃO

*Listeria monocytogenes* é o agente etiológico da listeriose, uma infecção severa, a qual é veiculada, principalmente, por alimentos, e provoca, entre outras enfermidades, encefalites, septicemias, meningites e abortos (DUSSURGET, PIZARRO-CERDA & COSSART, 2004). Geralmente, atinge idosos, pessoas imunocomprometidas ou com doenças crônicas, bem como mulheres grávidas. E em contrapartida às demais doenças transmitidas por alimentos (DTA), a listeriose, na maioria das vezes, não evolui para sintomatologia gastroentérica (WALLS & BUCHANAN, 2005). A enfermidade apresenta baixa incidência, quando comparada com outras DTAs, no entanto, a elevada taxa de mortalidade, ao redor de 20-30%, é alarmante do ponto de vista da saúde pública (GAHAN & HILL, 2005).

Os principais sorotipos relacionados a casos e surtos são 1/2a, 1/2b e 4b, sendo este último o mais associado a listeriose ao redor do mundo (McLAUHLIN, 1990; ZHANG & KNABEL, 2005). Diversos trabalhos foram executados tentando explicar a razão desta prevalência, no entanto, vários aspectos ainda necessitam ser elucidados. Entre esses, os principais seriam a predisposição do hospedeiro, a patogenicidade da cepa e a dose infectante (LIANOU et al., 2006).

Por ser ubiqüitária, essa bactéria está presente no solo, água, vegetação, alimentos de origem animal e também no homem (ROCOURT & COSSART, 1997; TRABULSI & ALTERTHUM, 2004). Desta maneira, já foi isolada e relacionada a vários surtos de origem alimentar. Alguns dos alimentos envolvidos em surtos são: leite, carnes, pescados, bem como vegetais e seus derivados (AUTIO et al., 2002).

Este patógeno representa um grande desafio para os órgãos de vigilância sanitária, bem como para as indústrias alimentícias, pois, devido a sua vasta

distribuição no ambiente e a suas características peculiares, é capaz de colonizar superfícies de equipamentos, pisos, drenos, entre outros, podendo tornar-se endêmico nas plantas de processamento e, desta forma, contaminar os alimentos (UHITIL et al., 2004). Outro fator importante a ser abordado é o caráter psicrotrófico desta bactéria, já que, atualmente, a cadeia do frio é amplamente empregada para conservar e também, frear o desenvolvimento de microrganismos, tanto os patogênicos, quanto os deteriorantes. Contudo, esta situação, gera uma pressão seletiva que favorece as bactérias do gênero *Listeria*, as quais podem se desenvolver sob estas condições e, conseqüentemente, estarem viáveis no momento da ingestão, em especial quando se trata de produtos prontos para o consumo (RYSER & MARTH, 1999).

Diversos estudos disponíveis na literatura demonstraram que a carne de frango é uma das mais vinculadas a surtos por *L. monocytogenes* (JAY, 1996; MIETTINEN et al., 2001; BARBALHO et al., 2005), ressaltando-se que, cada vez mais, os países importadores preocupam-se com a questão da segurança alimentar, tendo em vista que as DTAs são responsáveis por gastos anuais de bilhões de dólares (MEAD, et al., 1999). Desta maneira, é primordial estabelecer as rotas de contaminação por *L. monocytogenes* nas plantas de processamento, bem como conhecer em que ponto da cadeia este patógeno é incorporado aos alimentos (GUDBJORNSDÓTTIR et al., 2004; THÉVENOT et al., 2006). Para tanto, se faz necessário, além da utilização de técnicas tradicionais de identificação microbiana, o uso de ferramentas de biologia molecular, de modo a esclarecer estes aspectos e estabelecer estratégias para auxiliar na prevenção da contaminação dos alimentos que são oferecidos aos consumidores (LAWRENCE & GILMOUR, 1995; BYUN, JUNG & YOO, 2001; CHASSEIGNAUX et al., 2002).

A partir do exposto, desenvolveu-se este estudo, a fim de contemplar os seguintes objetivos:

- I. Determinar a ocorrência de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em estabelecimentos avícolas da região sul do Rio Grande do Sul;
- II. Determinar a ocorrência de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em uma planta de abate de frangos da região sul do Rio Grande do Sul;

- III. Determinar a ocorrência de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em frangos refrigerados comercializados na cidade de Pelotas/RS;
- IV. Subtipificar os isolados de *L. monocytogenes* através de sorotipagem e RAPD (amplificação aleatória de DNA polimórfico), visando contribuir para o esclarecimento da dispersão de *L. monocytogenes* na cadeia produtiva de aves na região sul do Rio Grande do Sul.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Listeria monocytogenes* – história

*Listeria monocytogenes* foi descrita inicialmente em 1924 por Murray, quando foi isolada de uma epizootia em animais de laboratório. Naquela ocasião, não foi associada a nenhum gênero bacteriano já conhecido, sendo denominada de *Bacterium monocytogenes*, devido a monocitose apresentada pelos animais infectados (MURRAY 1926 apud HOF, 2003). No ano seguinte, a bactéria começou a ser isolada em humanos e em animais por Pirie, o qual a nomeou de *Listerella hepatolytica*, em homenagem a Joseph Lister, médico e pioneiro na área de bacteriologia (PIRIE 1940 apud HOFER & REIS, 2005). Devido às cepas isoladas por Murray (1926) e Pirie (1927) serem muito semelhantes, estes pesquisadores, resolveram modificar o nome para *Listerella monocytogenes*. Contudo, *Listerella* já contemplava um gênero protozoário, então, Pirie sugeriu a mudança da nomenclatura para *Listeria monocytogenes* (AUTIO, 2003).

### 2.2 Classificação

O gênero *Listeria* pertence a “sub-ramificação” de *Clostridium*, da mesma forma que *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Bronchothrix*. A posição filogenética de *Listeria* é estável com baixo conteúdo de G+C em seu DNA, ao redor de 36-42% (ALLERBERGER, 2003).

Inicialmente, para a comunidade científica, *Listeria monocytogenes* era a única espécie representante deste gênero bacteriano (HOF, 2003). Contudo, atualmente, *L. monocytogenes* é apenas uma das seis espécies do gênero, sendo as demais: *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. grayi*. Além dessas, duas novas subespécies de *Listeria ivanovii* foram descritas: *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* e *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* (ALLERBERGER, 2003).

Em uma classificação mais antiga, existiam ainda, as espécies *L. murray* e *L. denitrificans*. Contudo, baseado em ensaios de hibridização DNA-DNA, foi verificado alta similaridade entre *L. murray* e *L. grayi*, que, a partir de então, passaram a ser consideradas como uma única espécie, denominada *L. grayi* (ROCOURT et al., 1992). Já a espécie *L. denitrificans*, foi reclassificada a partir de um estudo taxonômico e passou a ser denominada de *Jonesia denitrificans* (ROCOURT, WEHMEYER & STACKERBRANDT, 1987).

Apesar do exposto, somente duas espécies são potencialmente patogênicas: *L. monocytogenes* para humanos e *L. ivanovii* para outros mamíferos. *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. grayi* são, aparentemente, não patogênicas (SCHMID et al., 2005). No entanto, existem alguns relatos de *L. ivanovii* e *L. seeligeri* como geradoras de doença em humanos (GASANOV, HUGHES & HANSBRO, 2005). Além destas, recentemente, foi relatado na França a morte de uma idosa de 62 anos de idade devido a complicações de uma bacteremia ocasionada por *L. innocua* (PERRIN, BEMER & DELAMARE, 2003).

### 2.3 Características

*Listeria* spp. são bacilos curtos, gram-positivos, com diâmetro entre 0,4-0,5µm e 0,5-2µm de comprimento. É um microrganismo desprovido de cápsula e incapaz de formar esporos (SEELIGER & JONES, 1986; FARBER & PETERKIN, 1991), anaeróbio facultativo e produtor da enzima catalase (SCHMID et al., 2005). Apresenta motilidade a 25°C pela formação de flagelo polar, perdendo essa capacidade quando incubado a 35°C (ICSMF, 1996). É uma bactéria intracelular facultativa, que pode invadir e replicar-se em macrófagos e em células epiteliais (DUSSURGET, PIZZARO-CERDA & COSSART, 2004).

A temperatura ótima para o crescimento desse microrganismo está situada entre 30 e 37°C (AUTIO, 2003), embora seu desenvolvimento possa ocorrer em temperaturas entre -0,4 e 45°C (BELL & KYRIAKIDES, 2005). Apresenta, como característica peculiar, uma relativa resistência térmica e a capacidade de multiplicação em temperaturas de refrigeração (ICSMF, 1996). A atividade de água mínima em que pode se desenvolver é 0,92, e o pH varia entre 4,3 e 9,4 (BELL & KYRIAKIDES, 2005).

O caráter psicrotrófico de *Listeria* deve ser ressaltado quando se estuda alimentos cujo processo de conservação envolve o resfriamento. Nestas condições de temperatura, a maioria da microbiota acompanhante presente no produto tem sua taxa de desenvolvimento reduzida, diminuindo, assim, a competição com os microrganismos do gênero *Listeria*, os quais tem sua multiplicação e seu desenvolvimento favorecidos. Esta seleção involuntária pode ocasionar um aumento na população do patógeno e, conseqüentemente, o risco do produto vir a se tornar uma fonte de infecção (RYSER & MARTH, 1999).

As características bioquímicas das bactérias do gênero *Listeria* podem ser observadas analisando a Tab. 1, a qual foi adaptada de Holt et al. (1994).

Tabela 1 – Características bioquímicas de bactérias do gênero *Listeria*

Teste bioquímico	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. welshimeri</i>
Motilidade rotatória (20-25°C)	+	+	+	+	+
Motilidade guarda-chuva	+	+	+	+	+
Camp-test					
<i>S. aureus</i>	+	-	+	-	-
<i>R. equi</i>	-	-	-	+	-
Catalase	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-
Crescimento em TSI <sup>a</sup>	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
H <sub>2</sub> S (TSI)	-	-	-	-	-
Teste de vermelho de metila	+	+	+	+	+
Teste de Voges-Proskauer	+	+	+	+	+
Teste de nitrato	-	-	-	-	-
β-hemólise	+	-	+	+	-
Fermentação					
Manitol	-	-	-	-	-
Xilose	-	-	+	+	-
Ramnose	+	V	-	-	V
Dextrose	+	+	+	+	+

<sup>a</sup> Reações em TSI (ágar triplice açúcar ferro) rampa/fundo: A= ácido e K= alcalino

Fonte: Adaptado de Holt et al, 1994.

## 2.4 Fontes de *Listeria* spp.

As bactérias pertencentes ao gênero *Listeria* possuem a característica de serem muito difundidas na natureza, uma vez que estão presentes no solo, água, alimentos e na microbiota intestinal do homem e dos animais (TRABULSI & ALTERTHUM, 2004). Não obstante, o habitat primário de *L. monocytogenes* é o solo e a água, podendo contaminar, desta forma, os vegetais. Já os animais podem carrear a bactéria assintomaticamente e, assim, disseminá-la para os alimentos de origem animal, tais como carne e leite (ROCCOURT & COSSART, 1997; CDC, 2005).

Este patógeno é ubíquo e tem sido descrito em mais de 40 espécies de animais domésticos e selvagens (DONACHIE & LOW, 1997). Entre os animais de produção, provavelmente os ruminantes sejam a chave para a manutenção de *Listeria* spp. no ambiente rural, através de um contínuo ciclo fecal-oral (VASQUEZ-BOLAND et al., 2001). Nesse sentido, *Listeria* pode ser albergada em vacas lactantes por longos períodos em consequência de mastite, podendo ser disseminada, desta forma, através do leite (HOF, 2003). De acordo com Fenlon (1985 apud JAY, 1996) apesar da bactéria ser encontrada nas fezes de vários animais, o intestino não é o habitat primário deste microrganismo. Entretanto, segundo estes autores, a taxa de contaminação das silagens varia entre 2,5 a 44%, e sendo os animais alimentados com este insumo contaminado, o microrganismo pode se estabelecer em seu trato intestinal. O solo, adubado com fezes de animais, também representa elevado risco de disseminação de *L. monocytogenes* para a cadeia alimentar. Um exemplo desta assertiva é o primeiro surto de listeriose humana veiculado por alimentos, o qual foi desencadeado através do consumo de *coleslaw* (produto fermentado de repolho) contaminado com *L. monocytogenes*, uma vez que, a plantação de repolhos em questão tinha sido adubada a partir de fezes de ovinos com histórico da doença (IVANEK, GROHN & WIEDMANN, 2006).

Alimentos contaminados são as maiores fontes de infecção por *Listeria monocytogenes*, e o trato gastrointestinal é o sitio primário de entrada da bactéria no organismo hospedeiro (VASQUES-BOLAND et al., 2001).

A contaminação por *L. monocytogenes* é de difícil controle, tendo em vista sua ubiqüidade e suas características fisiológicas, as quais permitem seu desenvolvimento sob condições usualmente desfavoráveis para outras bactérias patogênicas (UHITIL et al., 2004). Assim sendo, tornou-se um dos maiores problemas para a indústria de alimentos (BAZACO, 2004) e a sua entrada nas plantas de processamento ocorre através de sapatos e vestuário dos colaboradores, equipamentos, alimentos crus de origem animal e vegetal e, possivelmente, a partir de portadores assintomáticos (ROCOURT; JACQUET ; REILLY, 2000).

A ocorrência de *L. monocytogenes* em diferentes alimentos, tanto de origem animal quanto vegetal, tem sido descrita em diversos trabalhos. Entre os produtos de origem animal, a carne de frango é um dos alimentos freqüentemente envolvidos em casos e surtos de listeriose. Dessa forma, segundo Petersen & Madsen (2000), existe um grande interesse da indústria alimentícia e dos consumidores em

investigar a ocorrência de *L. monocytogenes* desde o setor primário da produção, tal como nos estabelecimentos avícolas, visando o controle deste microrganismo durante toda a cadeia produtiva.

A ocorrência de *L. monocytogenes* em um estabelecimento rural foi investigada por Skovgaard & Morgen (1988 apud JAY, 1996), os quais verificaram que 62% das amostras de alimentos oferecidos às aves estavam contaminadas, e que em 33% das fezes oriundas destes frangos havia a presença do patógeno.

Muitos estudos têm descrito a ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos avícolas, a exemplo de Rørvic et al. (2003), que obtiveram entre 41-84% de presença desse microrganismo em carcaças de frango, e 0-61% de contaminação em produtos derivados da carne desta ave. O Centro de Controle de Doenças (CDC), examinando alimentos provenientes da geladeira de pacientes com listeriose, revelou que 31% das amostras de frango investigadas estavam contaminadas por *L. monocytogenes* (HUME et al., 1998).

Hume et al. (1998) relataram que aproximadamente 5% dos frangos podem ser carreadores de *L. monocytogenes*, sendo o ceco o sítio principal para a colonização, e que a taxa de portadores varia entre lotes. Descrevem, ainda, que nos abatedouros, a contaminação das carcaças ocorreria durante o processo de evisceração, e que *Listeria* se disseminaria para as outras carcaças durante as etapas do processamento.

Quessy & Messier (1992) sugerem uma outra forma de dispersão de *L. monocytogenes*, através de pássaros silvestres, como por exemplo, as gaivotas, as quais podem portar este patógeno em seu intestino e, a partir das fezes, contaminar silagens e ambiente. Dessa forma, esta contaminação poderia ocorrer em áreas próximas às indústrias, favorecendo a disseminação do agente para as plantas processadoras.

Outro importante fator na disseminação de patógenos, é a cama do aviário, que é uma cobertura de aproximadamente 5 cm disposta sobre o piso do galpão, que utiliza materiais como raspas ou serragem de pinho, eucalipto, madeira de lei, casca de arroz, sabugo de milho ou palha, podendo ser renovada a cada ciclo de produção ou reutilizada a cada quatro a seis lotes de frango, com cada lote possuindo uma duração entre 40 a 50 dias (OLIVEIRA et al., 2003). A cama assume a dupla função, de piso e de biodigestor dos dejetos. Desta forma, absorve a umidade, dilui o material fecal, isola os animais do piso e atua como colchão

protetor. No entanto, a umidade da cama, independente do tipo de material, é o principal fator determinante para o aumento da proliferação microbiana (McWARD & TAYLOR, 2000). Assim, o equilíbrio dinâmico dos microrganismos depende da sua capacidade de adaptação ao meio, o que vai determinar sua maior ou menor competitividade. Entretanto, na cama de aviário, pode ser encontrado o equivalente à microbiota bacteriana intestinal das aves, acrescido de patógenos eventuais (KWAK, HUH & McCASKEY, 2005). Nesse sentido, com o intuito de controlar a disseminação de patógenos na cadeia produtiva de frangos, o Ministério da Agricultura estabeleceu um Programa de Sanidade Avícola – PNSA (BRASIL, 1994), o qual preconiza, num primeiro momento, o isolamento de *Salmonella* a partir de *swabs* cloacais e de arrasto sobre a cama de aviário (BRASIL, 1995).

De acordo com Ivanek, Grohn & Wiedmann (2006), a ecologia e a transmissão de *L. monocytogenes* é muito complexa, desse modo, o conceito de prevenção da infecção nos diversos hospedeiros, inclusive no homem, está mudando. Esses autores sugerem um modelo de transmissão de *L. monocytogenes* entre hospedeiros e habitats, o qual pode ser visualizado na Fig. 1.

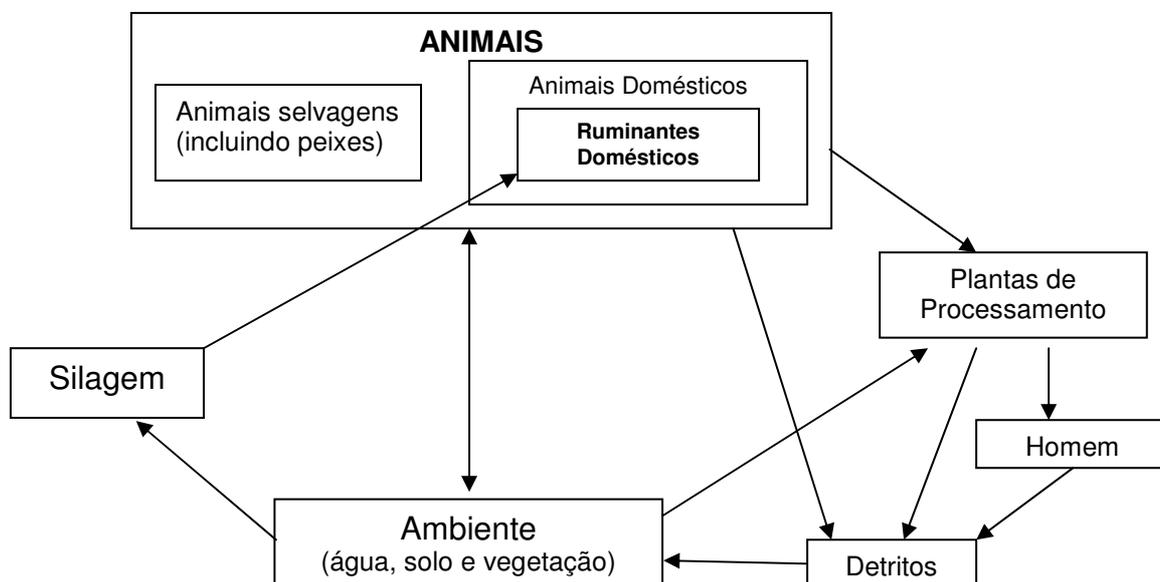


Figura 1 – Representação esquemática da transmissão de *L. monocytogenes* entre habitat e hospedeiros

Fonte:Ivanek, Grohn & Wiedmann (2006)

## 2.5 *Listeria monocytogenes* e listeriose

*Listeria monocytogenes* é um patógeno de origem alimentar, de grande interesse em saúde pública e para a indústria alimentícia (GUDMUNDSDÓTTIR et al., 2005) e, embora tenha sido reconhecido como um patógeno humano antes dos anos 70 (GOMBAS et al., 2003), somente nas três últimas décadas foi associado aos alimentos e classificado como patógeno de origem alimentar.

É o agente etiológico da listeriose, uma severa infecção de origem alimentar, a qual apresenta taxa de mortalidade entre 20-30% (DUSSURGET, PIZZARO-CERDA & COSSART, 2004; WALLS & BUCHANAM, 2005). A doença caracteriza-se por meningite, encefalite, gastroenterite, aborto e infecção perinatal (DUSSURGET, PIZZARO-CERDA & COSSART, 2004). Contudo, diferindo da maioria das infecções de etiologia alimentar, o quadro clínico, geralmente, evolui para uma sintomatologia não entérica (ANTONIOLO, 2001).

Antes dos anos 80, a listeriose era uma enfermidade associada exclusivamente à animais, provocando abortos e encefalite em ovinos e bovinos. No entanto, evidências indicam que a listeriose veterinária era, na verdade, uma doença de origem alimentar, devido ao consumo de silagem contaminada, seguida do adoecimento dos animais e disseminação do agente através das fezes e material proveniente de aborto (INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS, 2004). Como conseqüência, a bactéria distribuiu-se no ambiente, tornou-se hábil em sobreviver por longos períodos de tempo sob condições adversas e de se desenvolver a baixas temperaturas (INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS, 2004).

Leite e derivados, vegetais, produtos cárneos, frangos e seus produtos, são os alimentos mais freqüentemente implicados na transmissão de listeriose (AUTIO et al., 2002). Em 2002, um amplo surto de listeriose envolvendo 46 pessoas, sete mortes e três abortos, resultou no *recall* de 12,4 milhões de quilos de frango e peru, frescos e congelados prontos para o consumo nos Estados Unidos (NAIR, VASUDEVAN & VENKINARAYANAN, 2005). Estima-se que, naquele país, as infecções por *L.monocytogenes* causam aproximadamente, 2500 casos de doenças severas e destes, 500 vão a óbito (CZUPRYNSKI, FAITH & STEINBERG, 2002).

O primeiro surto de listeriose veiculado por alimentos, ocorreu no Canadá, envolvendo sete adultos e 34 mulheres grávidas, que adoeceram após terem

ingerido *coleslaw* contaminado (DONACHIE & LOW, 1997; HOF, 2003). Todavia, segundo McLauchlin (1997 et al apud ALLERBERGER, 2003) a primeira descrição de listeriose humana, ocorreu no final da primeira guerra mundial, quando um soldado desenvolveu quadro de meningite.

Um surto nos Estados Unidos, durante o ano de 1985, envolvendo 142 casos, com 48 mortes foi, provavelmente, o alerta na disseminação de listeriose por alimentos, a qual, desde então, tem sido associada a vários surtos de origem alimentar (ICMSF, 1996). Destaca-se que o primeiro caso de listeriose humana envolvendo carne ocorreu em 1988, na Inglaterra, sendo frango cozido o veículo da contaminação (KERR et al., 1988 apud JAY, 1996).

No Brasil, os primeiros casos relatados de listeriose ocorreram em 1989, no Distrito Federal, envolvendo três pessoas, as quais desenvolveram meningite bacteriana: um recém-nascido com 10 dias de idade, uma portadora de lúpus eritematoso sistêmico, e uma criança com 8 anos. Destes, somente a mulher portadora de doença imunossupressora veio a óbito. Contudo, não foi possível estabelecer qual foi a origem de transmissão de *L. monocytogenes* a estes indivíduos (HOFER, NASCIMENTO & OLIVEIRA, 1998).

Em adultos, a listeriose pode ocorrer de forma invasiva ou não invasiva. A primeira ocorre tipicamente em indivíduos pertencentes à população de risco (WALLS & BUCHANAM, 2005). A grande maioria das pessoas que adoecem por listeriose apresenta condições que predispõem à infecção, sendo que os grupos de risco são mulheres grávidas, neonatos, etilistas, dependentes químicos, diabéticos, HIV positivos, pacientes que recebem tratamento imunossupressor, pacientes com câncer e idosos. Ocasionalmente, indivíduos saudáveis sem nenhuma predisposição à doença, podem apresentar sintomas de gastroenterite (AUTIO, 2003, LUKINMAA et al., 2003, WALLS & BUCHANAM, 2005).

Durante a gravidez, a listeriose ocorre mais freqüentemente no terceiro trimestre e pode cursar com aborto espontâneo, morte fetal, natimorto, severa septicemia neonatal ou meningite (ROCOURT; JACQUET & REILLY, 2000). Ao passo que nas gestantes, a doença, na maioria das vezes, não apresenta sintomatologia característica e se manifesta similarmente a um resfriado, com mialgias, febre e cefaléia (CDC, 2005; HOF, 2003). Dessa maneira, *L. monocytogenes* infecta, principalmente, indivíduos com deficiência da imunidade

mediada por células (ROCOURT; JACQUET & REILLY, 2000), ou seja, dos linfócitos T.

Gastroenterite é a forma não invasiva da doença e ocorre em hospedeiros saudáveis que consomem alimentos contaminados (AUTIO, 2003). Esta forma foi, recentemente, reconhecida como possível manifestação da infecção por *Listeria* (INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS, 2004) e já tem sido documentada em vários surtos (WALLS & BUCHANAN, 2005). Os sintomas, que incluem febre, diarreia, dor de cabeça, mialgias e vômito, ocorrem após curto período de incubação, entre 18-28 horas. A ocorrência desta variedade da doença está associada a ingestão de grandes quantidades do patógeno (INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS, 2004), as quais, segundo Autio (2003), situam-se ao redor de  $1,9 \times 10^5 - 1,6 \times 10^9$  UFC (Unidades Formadoras de Colônia) por grama de alimento. Usualmente, os indivíduos imunocompetentes irão superar a infecção inicial e albergarão *Listeria* por alguns dias no intestino e desta maneira, eliminando-a nas fezes (HOF, 2003).

Conforme descrito por Trabulsi & Alterthum (2004), o período de incubação da listeriose invasiva pode variar de 20 a 30 dias, com dose infectante ao redor de  $10^9$  UFC. Contudo, a dose infectante depende de muitas variáveis, tais como status imunológico do indivíduo, virulência do patógeno, tipo e quantidade de alimento contaminado consumido, concentração do patógeno no alimento e número repetitivo de desafios (SCIENTIFIC COMMITTEE ON VETERINARY MEASURES RELATING TO PUBLIC HEALTH, 1999).

Listeriose é comumente relatada em países industrializados, com pouco ou nenhum relato na África, Ásia e América do Sul, o que reflete diferentes hábitos e padrões de consumo, diferentes suscetibilidades dos indivíduos ou, ainda, indisponibilidade de testes diagnósticos (ROCOURT; JACQUET & REILLY, 2000). Recentes estimativas do CDC, indicam que a incidência de mortes causadas por *L. monocytogenes* é oito vezes maior que as causadas por *Escherichia coli* O157:H7 (MARSH et al., 2003). No Brasil ainda não existem relatos de listeriose humana associada ao consumo de alimentos contaminados, no entanto, *L. monocytogenes* tem sido isolada de uma ampla variedade de alimentos (ANTONIOLO et al., 2003; LIMA, 2004; LAER et al., 2005), portanto, não se sabe ao certo se não há ocorrência ou se é devido aos nossos sistemas de vigilância serem pouco eficientes.

## 2.6 Sorotipos de *Listeria monocytogenes* envolvidos em listeriose

As cepas de *L. monocytogenes* possuem diferentes determinantes antigênicos expressos na superfície celular, incluindo ácidos lipoprotéicos, proteínas de membrana e organelas extracelulares (como flagelos e fímbrias), e essas diferenças podem ser identificadas pela tipificação sorológica (LIMA, 2004). As cepas de *L. monocytogenes* são divididas em 4 sorogrupos (1, 3, 4 e 7) e estes em 13 sorotipos, baseado nos antígenos somático (O) e flagelar (H): 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4ab e 7 (JARADAT & BHUNIA, 2003).

Qualquer cepa de *L. monocytogenes* pode ser considerada potencialmente patogênica para os humanos. Entretanto, várias observações sugerem que *L. monocytogenes* apresenta virulência heterogênea, em função dos sorotipos, os quais estariam associados, de alguma forma, com o potencial de patogenicidade do microrganismo (JACQUET et al., 2002). Dos 13 sorotipos conhecidos, somente três deles (1/2a, 1/2b e 4b) têm sido relacionados a 90% dos surtos e casos esporádicos de listeriose (CABRITA et al., 2004), sendo as cepas do sorotipo 4b mais comumente isoladas em surtos, e cepas dos sorotipos 1/2a e 1/2b em casos esporádicos (FARBER & PETERKIN, 1991; LIANOU et al., 2006). *L. monocytogenes* sorotipo 4b foi responsável por 60% dos casos de listeriose humana reportados no Japão, enquanto que as do sorotipo 1/2b foram responsáveis por cerca de 30% (NAKAMA et al., 1998), predominância similar à relatada em outros países (McLAUHLIN, 1990; FARBER & PETERKIN, 1991). Entretanto, o número de casos associados à cepas do sorogrupo 1/2 tem aumentado nos últimos anos (UNNERTAD, 2001). Na Suécia, por exemplo, os casos de listeriose humana foram igualmente distribuídos entre os sorotipos 1/2 e 4, ao passo que na Finlândia, recentemente, os sorotipos 1/2 têm sido os mais isolados de pacientes com esta enfermidade (JOHANSSON et al., 1999). Já no Brasil, dos três casos de listeriose relatados, em dois deles o sorotipo responsável foi o 4b e no terceiro foi o sorotipo 1/2a (HOFER, NASCIMENTO & OLIVEIRA, 1998). Segundo Czuprynski, Faith & Steinberg (2002), a relação entre o sorotipo 4b e os surtos e casos de listeriose deve-se à alta habilidade destas cepas em se translocar através da mucosa intestinal e causar infecção sistêmica.

Lawrence & Gilmour (1995) reportaram que o isolamento recorrente de isolados do sorogrupo 1/2 de uma ampla variedade de alimentos e de plantas de

processamentos, pode ser atribuída aos antígenos de superfície presentes nos exemplares deste sorogrupo, o que, provavelmente, facilitaria a habilidade de *L. monocytogenes* em colonizar equipamentos no ambiente de processamento.

Existe a possibilidade de que a alta virulência de determinadas cepas de *L. monocytogenes*, tal como a Scott A, pertencente ao sorotipo 4b, seja um reflexo da elevada resistência à inativação pelo baixo pH estomacal (CZUPRYNSKI, FAITH & STEINBERG, 2002). Conforme descrito por Gahan & Hill (2005), a habilidade dos patógenos em sobreviverem aos vários micro-ambientes do trato gastrointestinal é essencial para que estes consigam desencadear enfermidades. Portanto, antes que *Listeria* alcance o intestino para aderir-se e invadir os enterócitos, é necessário que esta sobreviva às condições ácidas do estômago, assim como à elevada osmolaridade e a presença de sais biliares no intestino delgado. Estudos recentes relatam que *L. monocytogenes* coloniza a vesícula biliar de ratos infectados, o que aumenta as possibilidades deste órgão atuar como fonte crônica de disseminação da bactéria pelo organismo, de maneira similar ao que ocorre com *Salmonella Typhi* (HARDY et al., 2004).

## **2.7 *Listeria monocytogenes* - risco e ocorrência nos alimentos**

Determinados alimentos são considerados de alto risco, por apresentarem elevada probabilidade de veicular listeriose e, desta maneira, o ILSI Research Foundation / Risk Science Institute (2005), estabeleceu cinco critérios para um alimento ser assim considerado. São eles: (1) ter potencial de contaminação por *L. monocytogenes*, (2) suportar o crescimento deste patógeno em altos números, (3) ser pronto para o consumo, (4) necessitar de refrigeração, e (5) ser estocado por extenso período.

*L. monocytogenes*, por ser psicrotrófico e halotolerante, pode crescer em alimentos salgados e refrigerados, os quais, freqüentemente, têm extenso período de vida-útil. Além disso, produtos que não recebem qualquer tipo de tratamento antes da ingestão, os chamados “prontos para o consumo”, tais como, queijos, carnes e pescado, podem conter altos níveis de *L. monocytogenes* (HUSS, JORGENSEN & VOGEL, 2000). Dessa forma, as características químicas e físicas dos produtos, assim como o tempo de estocagem, permitem classificar os alimentos como de alto ou baixo risco.



Vitas, Aguado & Garcia-Jalon (2004) ressaltam que a extensa distribuição no ambiente, combinado com as características de crescimento deste patógeno, representam a principal causa da alta prevalência nos diferentes alimentos. De acordo com Jay (1996), *L. monocytogenes* é muito comum em carnes e seus derivados e, desta forma, verificou-se que a prevalência dessa bactéria em diversos tipos de carnes entre os anos de 1971-1994 foi de 17% em amostras de carne de frango e de carne suína.

Miettinen et al. (2001) relatando sobre a presença de *L. monocytogenes* em frango, reportaram que este patógeno tem sido isolado em vários países. A exemplo, dos Estados Unidos, onde 23% das carcaças de frango, oriundas do comércio varejista apresentaram contaminação por essa bactéria, enquanto na Noruega, a ocorrência foi de 61%. Contudo, Chasseignaux et al. (2002), avaliando a presença de *L. monocytogenes* em plantas de processamento de frangos e de suínos, observaram 38,9% e 37% de contaminação, respectivamente.

A ocorrência de *L. monocytogenes* foi avaliada em alimentos crus e processados provenientes do comércio da Espanha, por Vitas, Aguado & Garcia-Jalon (2004), os quais, diagnosticaram que, as maiores taxas de contaminação foram obtidas para os alimentos cárneos crus. Onde, 34,9% das carnes suínas e bovinas moídas estavam contaminadas por este microrganismo e que 36,1% das carnes de frango apresentavam-se na mesma situação.

Gudbjornsdóttir et al. (2004), pesquisando a incidência global de *L. monocytogenes* em plantas de processamento de carne, frango e de pescados dos Países Nórdicos, identificaram que as plantas processadoras de frangos foram o setor mais problemático, visto que obtiveram elevada contaminação de seus ambientes de processamento, ou seja, entre 20,6 e 24,1%. Entretanto, ao avaliarem os produtos oriundos destas plantas de processamento, evidenciaram que 39% dos pescados eram positivos para esta bactéria, seguido por 22,2% de contaminação da carne de frango e 15,6% para carne bovina.

Com relação aos pescados, a FDA (Food and Drug Administration) publicou 37 recalls entre os anos de 2000 a 2002, devido a contaminação por *L. monocytogenes* (FDA, 2003). Num outro exemplo, Foley et al. (2005) analisaram saladas de frutos do mar, na Bélgica, e constataram a presença de *L. monocytogenes* em 27% das amostras. Entretanto, de acordo com Huss, Jorgensen

& Vogel (2000), os produtos de pescado prontos para o consumo, tais como, peixes defumados refrigerados, têm sido esporadicamente associados a casos de listeriose.

A presença de *Listeria*, tanto em produtos crus quanto em processados, pode gerar conseqüências econômicas problemáticas para a indústria de alimentos. Na União Européia e nos Estados Unidos, sistemas de recusa de alimentos estão operantes e têm sido as principais razões para a rejeição de produtos de pescado refrigerados e congelados contaminados por *L. monocytogenes* (EKLUND et al., 1995). Assim, a redução da incidência de listeriose requer controle completo de toda a cadeia alimentar para minimizar a probabilidade dos alimentos, principalmente, os prontos para o consumo, de se tornarem contaminados por *Listeria* (WALLS & BUCHANAN, 2005). Esse controle é demasiadamente difícil no ambiente de processamento de alimentos, já que este patógeno, além de ser capaz de aderir às superfícies que entram em contato com o alimento, apresenta resistência a desinfetantes, tais como os derivados de amônia quaternária (GUDBJÖRNSDÓTTIR et al., 2005). Outro importante pré-requisito para o controle de *L. monocytogenes* é o conhecimento de seus nichos de contaminação durante a produção de alimentos (VOGEL et al., 2001b).

## **2.8 *Listeria monocytogenes* e a indústria alimentícia**

Os surtos e casos isolados de listeriose registrados foram, em sua grande maioria, associados à produtos processados industrialmente. A contaminação pós-processamento tem sido a causa mais freqüente, seja através de contaminação cruzada dentro da indústria, seja, por contaminação no ponto de distribuição ou venda (ROCOURT & COSSART, 1997). As conseqüências dos surtos de listeriose podem ser devastadoras para as indústrias alimentícias envolvidas (MURPHY et al., 2003). De acordo com Augustin (2003), a geração de sistemas de vigilância para a listeriose em muitos países, especialmente, nos desenvolvidos assim como, as modificações nos hábitos alimentares e o aumento de indivíduos imunocomprometidos, podem ter provocado o incremento do número de casos da doença. Além disso, é imprescindível relatar que as mudanças na forma de produção, processamento e estocagem de alimentos, principalmente no que diz respeito ao emprego da cadeia de frio, propiciam a multiplicação de *Listeria* spp

(ROCOURT; JACQUET ; REILLY, 2000). Conforme descrito por Antoniollo (2001), a refrigeração, em virtude de paralisar o crescimento ou até mesmo destruir determinados microrganismos, pode atuar como forma de pressão seletiva para espécies psicrófilas como *Listeria* spp., permitindo, desta maneira, o aumento da população deste patógeno até níveis potencialmente capazes de comprometer a saúde dos consumidores.

Nas indústrias processadoras de carne, *L. monocytogenes* é considerado o microrganismo mais importante a ser controlado (HEIR et al., 2004), tendo em vista que a contaminação dos produtos alimentícios por essa bactéria ocorre mais comumente durante o processamento e é freqüente resultar da persistência de algumas cepas na planta processadora (AUTIO et al., 2002). Conforme relatam Laer et al. (2005), a presença de *L. monocytogenes* em 100% das amostras de produto final de lingüiça mista do tipo frescal analisadas em seu estudo, se deve às práticas insatisfatórias de produção, haja vista que as matérias-primas utilizadas para a elaboração do produto não apresentavam contaminação detectável.

Outro fator de grande preocupação é a capacidade de *L. monocytogenes* produzir biofilme. Alguns autores, tais como Lundén (2004), destacam que após a formação do biofilme, a remoção dos microrganismos aderidos é dificultada, já que esta aderência protege os patógenos de agentes sanitizantes e antimicrobianos, favorecendo, desta forma, o desenvolvimento de resistência aos desinfetantes, pela exposição a concentrações subletais.

## **2.9 Ferramentas para investigação epidemiológica de *Listeria monocytogenes***

De acordo com o ILSI Research Foundation / Risk Science Institute (2005), as estratégias para a redução da listeriose são: prevenir a contaminação dos alimentos por *L. monocytogenes*, evitar o crescimento da bactéria em números elevados e educação da população de risco. Além disso, a aplicação de técnicas discriminatórias, como sorotipagem e subtipagem molecular, é muito importante em investigações epidemiológicas para traçar associações entre as fontes de contaminação e alimentos envolvidos e, desta forma, detectar as possíveis fontes responsáveis pelos casos e surtos da doença (ILSI RESEARCH FOUNDATION / RISK SCIENCE INSTITUTE, 2005).

.....  
A subtipagem, com a conseqüente caracterização da cepa, é essencial para investigar a rota de contaminação e localizar as fontes do patógeno dentro da planta de processamento de alimentos. Assim, conforme descrito por Lima (2004), a amostragem do ambiente e do produto, ao longo da linha de processamento é uma forma de localizar as áreas relacionadas à contaminação do alimento e de analisar as condições higiênicas do ambiente de processamento. A identificação de um isolado bacteriano em nível de espécie é suficiente para definir se um alimento está contaminado com um patógeno e, desta forma, ser recolhido do mercado, ou, se pode ser comercializado. Todavia, em diversas ocasiões, a subtipificação bacteriana é essencial, uma vez que permite a identificação da origem de um determinado isolado proveniente de plantas de processamento e, deste modo, permite inferir em que local e/ou momento que ele é incorporado no alimento e onde pode ser, ocasionalmente, eliminado.

A indústria alimentícia carece de ferramentas práticas para traçar as rotas de contaminação, bem como, para avaliar quando os procedimentos de limpeza estão ou não adequados. Nesse sentido, com o desenvolvimento e a popularização das técnicas baseadas em PCR (reação em cadeia da polimerase), as técnicas moleculares têm sido cada vez mais testadas e utilizadas para a subtipificação de microrganismos patogênicos, principalmente com o intuito de elaborar perfis epidemiológicos de microrganismos isolados. Neste contexto, inúmeras são as técnicas desenvolvidas para auxiliar os pesquisadores na prevenção e na elucidação de surtos de listeriose, dentre os quais pode-se citar: PFGE (*Pulsed Field Gel Eletrophoresis*) (GUDMUNSDÓTTIR et al., 2004; THÉVENOT et al., 2006), MEE (*Multilocus Enzyme Eletrophoresis*) (RØRVIC et al., 2000), PCR-REA (PCR-*Restriction Enzyme Analysis*) (RØRVIC et al., 2000; CABRITA, et al., 2004) e seqüenciamento genético (ALLERBERGER, 2003). Entretanto, essas técnicas ainda não são convenientes para as rotinas laboratoriais, além disso, são demasiadamente laboriosas e onerosas (BOERLING et al., 1995; BYUN, JUNG & YOO, 2001).

O desenvolvimento de técnicas de subtipagem acuradas e ágeis é importante para o monitoramento da listeriose. De acordo com Byun, Jung & Yoo (2001), das inúmeras técnicas de subtipagem utilizadas para diferenciar *Listeria* em nível de subespécie, a sorotipagem é a mais comumente e extensivamente usada. Contudo,

essa técnica apresenta limitado valor para estudos epidemiológicos, devido ao seu insuficiente poder discriminatório (THÉVENOT et al., 2006).

A possibilidade de amplificação de segmentos específicos do DNA de um genoma foi um dos aspectos fundamentais para a revolução causada pela PCR, no entanto, a técnica apresentava limitações significativas na obtenção de marcadores moleculares distribuídos pelo genoma, uma vez que a construção de *primers* para a amplificação via PCR dependia do conhecimento prévio das seqüências de nucleotídeos que flanqueavam a região de interesse no DNA, tornando necessária clonagem e seqüenciamento dessa região (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Desta forma, Williams et al. (1990) propuseram a técnica RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* - DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso), que se baseia no emprego de *primers* mais curtos (entre 8-10 nucleotídeos), e de seqüência arbitrária, eliminando, assim, a necessidade do conhecimento prévio da seqüência alvo.

Um das peculiaridades dessa técnica é a utilização de um único *primer* com seqüência arbitrária, que possibilita a análise de polimorfismos de DNA (ZAHA, FERREIRA & PASSAGLIA, 2003). Além disso, a PCR empregada para a elaboração do RAPD é realizada sob baixas condições de estringência, obtendo-se, portanto, uma alta variabilidade de perfis, os quais são utilizados para diferenciar os isolados. Não obstante, a detecção de polimorfismos é relativamente simples de ser avaliada pela visualização direta das bandas no gel de agarose (WILLIAMS et al., 1990).

Outra característica interessante citada por aqueles autores é a simplicidade da técnica, haja vista que não se faz necessária a purificação do DNA, com isso, o RAPD pode ser executado com DNA não purificado, e até mesmo com células íntegras. Com relação à essa característica, Medeiros & Farber (2001) padronizaram uma variação da técnica RAPD, utilizando células íntegras, a qual foi comparada contra diversos kits comerciais para extração de DNA, assim como, contra tratamento com Triton-X-100 e fervura de suspensão bacteriana. O resultado dos testes evidenciou que, o emprego de células íntegras foi mais reprodutível e mais rápido. Essa mesma forma de utilização de DNA foi utilizada por outros autores (DESTRO, 1995; SILVA et al., 2001; LIMA, 2004), com resultados altamente satisfatórios.

RAPD foi a técnica molecular escolhida por diversos autores devido ao conjunto de vantagens oferecidas, dentre as quais pode-se citar: poder discriminatório, simplicidade, rapidez e sensibilidade (BOERLIN et al., 1995;

YOSHIDA et al., 1999; BYUN, JUNG & YOO, 2001; SILVA et al., 2001; MARTINEZ et al., 2003; LIMA, 2004; CABRITA, et al., 2004; ERTAS & SEKER, 2005).

Ferreira & Grattapaglia (1998), compararam RAPD e RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição) e relataram, entre outros atributos, que, enquanto os marcadores RFLP se baseiam na hibridização de DNA, os marcadores RAPD se baseiam na amplificação de DNA. Neste aspecto, estas diferenças resultam em uma série de vantagens práticas que podem ser resumidas em duas características: simplicidade e rapidez. Entretanto, ressalta-se que essa técnica ainda apresenta baixa reprodutibilidade, especialmente quando os dados são comparados entre laboratórios (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Com relação, particularmente, à *L. monocytogenes*, diversas pesquisas têm utilizado RAPD como ferramenta para estudos epidemiológicos. Boerlin et al. (1995), comparando RAPD com outras cinco técnicas de subtipagem (sorotipagem, ribotipagem, fagotipagem, MEE e REA), relataram que esta técnica alcançou o melhor poder discriminatório, além de ter apresentado boa reprodutibilidade. Entretanto, ressaltam que os problemas relatados por outros autores na padronização do RAPD devem ser resolvidos antes da execução da técnica.

Diversos pesquisadores têm relatado a dificuldade de padronização e de reprodutibilidade do RAPD. Entretanto, seu bom poder discriminatório tem sido freqüentemente relatado em diversos estudos. Vogel et al. (2001a), por exemplo, avaliaram PFGE, AFLP (polimorfismo de comprimentos de fragmentos amplificados) e RAPD, demonstrando que essa última técnica apresentou poder discriminatório semelhante às outras duas, as quais são mais laboriosas e caras.

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Estabelecimentos avícolas**

As amostras foram coletadas entre agosto de 2005 e maio de 2006, em estabelecimentos avícolas pertencentes a produtores cooperados a um abatedouro-frigorífico localizado na região sul do Rio Grande do Sul.

#### **3.1.1 Processo de amostragem**

O monitoramento de *Listeria* foi realizado em 35 lotes de frango de corte, a partir de amostras de *swabs* cloacais e de *swabs* de arrasto das camas dos galpões, conforme preconizado pelo Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA, 1994), e pela Portaria n° 126, de 03 de novembro de 1995, com algumas modificações, conforme descrito a seguir. Cada *swab* cloacal representava duas aves, totalizando 8 aves por coleta. Já para os de arrasto, cada *swab* representava 1 galpão. Os *swabs* foram imersos em frascos contendo água destilada estéril e transportados para o laboratório para o processamento das amostras.

### **3.2 Frigorífico-abatedouro**

As amostras foram coletadas entre novembro de 2005 e maio de 2006, em uma planta de abate de frangos, localizada na região sul do Rio Grande do Sul. O estabelecimento possui inspeção sanitária realizada por Médicos Veterinários do

Serviço de Inspeção Federal (SIF), do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, abatendo ao redor de 22 mil aves por dia.

Segue, abaixo, uma breve descrição da linha de abate e processamento de frangos da indústria avaliada, assim como um fluxograma simplificado representado na Fig. 3.

As aves chegam à indústria através de caminhões, acomodadas em caixas plásticas de transporte, agrupadas em lotes de 8 a 10 por caixa. Na plataforma de desembarque, são penduradas na nórea, onde recebem atordoamento através de eletronarcose, com 50 volts. As aves são conduzidas pela nórea até chegarem a sala de sangria, onde sofrem secção manual da veia jugular, esse procedimento de sangria se estende por até 4 minutos. Decorrido este período as aves, são encaminhadas para a escaldagem com água a 58°C, onde permanecem por 2 a 3 minutos e, em seguida, são direcionadas à depenadeira. Após, são submetidas a consecutivas lavagens com água clorada a temperatura ambiente e, são dirigidas à sala de evisceração, para a retirada das vísceras. As vísceras comestíveis (coração, moela e fígado) são conduzidas até um resfriador (*chiller*) de vísceras e, as demais, são direcionadas para a graxaria. Após esse procedimento, as carcaças são encaminhadas, através da nórea, para a sala de resfriamento, onde permanecem no pré-resfriador (*pré-chiller*) em torno de 12 minutos, até alcançarem temperatura de, no máximo, 14 a 16°C. Quando essa temperatura é atingida, são retiradas desse equipamento, com auxílio de uma rosca sem fim, e direcionadas para o resfriador (*chiller*), onde permanecem por 24 a 25 minutos, até alcançarem a temperatura final de, no mínimo, 4°C.

Transcorrido o resfriamento, as carcaças são enviadas para a sala de cortes e colocadas em uma esteira plástica, para serem embaladas e armazenadas em câmara fria.

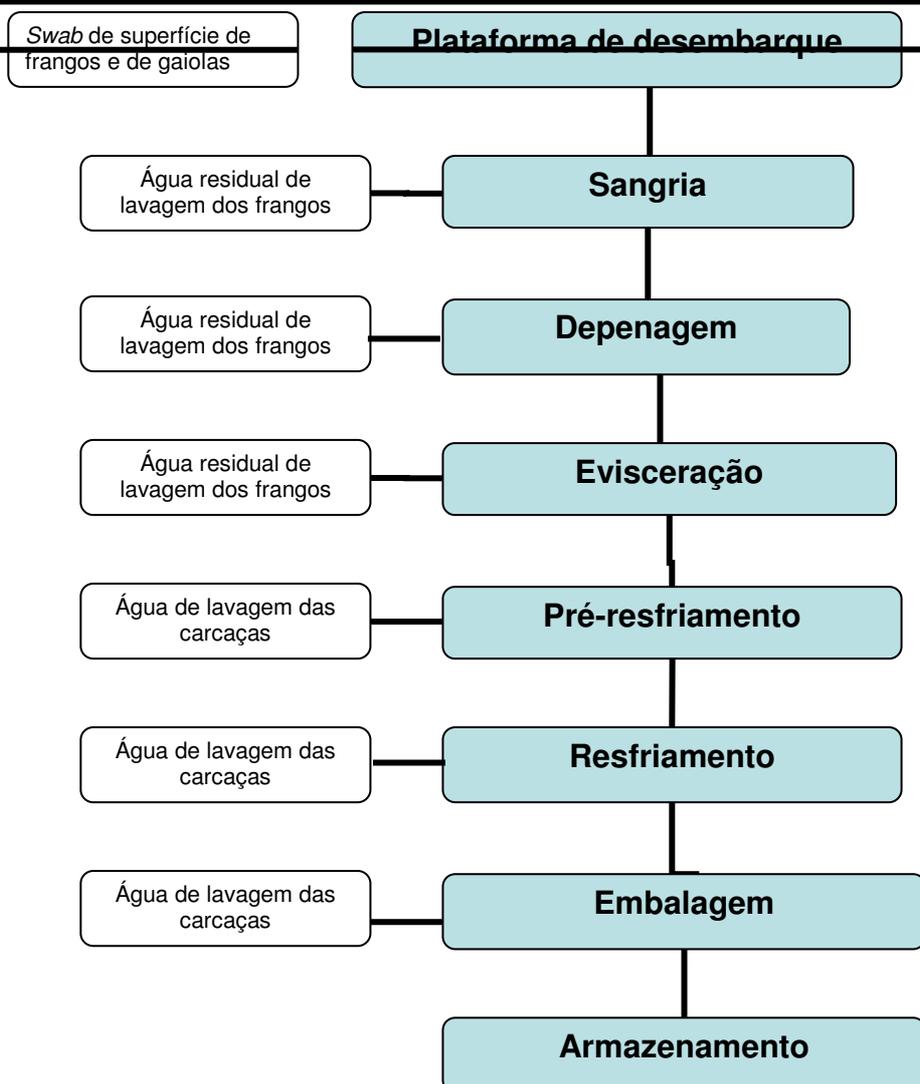


Figura 3 – Representação esquemática da linha de abate e processamento de frangos e dos pontos de coleta em cada etapa

### 3.2.1 Processo de amostragem

Todos os procedimentos de amostragem foram executados conforme os protocolos propostos pela APHA (2001).

#### **Amostras de frango e de carcaças**

As amostras de frango e de carcaças foram coletadas em três diferentes fases do abate: no início do processamento (início), na fase intermediária (intermediária), e ao final do abate (término). E para tanto, em cada uma dessas fases, cinco frangos eram escolhidos aleatoriamente na plataforma de desembarque, amostrados superficialmente com o auxílio de *swabs* e marcados com lacres de diferentes cores, formando uma amostra composta referente a cada uma das fases. As quinze aves marcadas foram amostradas ao longo da linha de processamento e a forma de coleta da amostra dependia da etapa de processamento. Dessa forma, na plataforma de desembarque, a amostra referia-se a *swab* de superfície (penas, pele e cloaca) dos frangos; na linha de processamento, foi realizada pela água utilizada nas lavagens dos frangos e das carcaças; e nos produtos prontos para a comercialização, por lavagem da carcaça com água peptonada 0,1% (Tab. 2).

Tabela 2 – Pontos de amostragem em uma linha de abate e processamento de frangos do sul do Rio Grande do Sul

<b>Ponto amostrado</b>	<b>Forma de coleta</b>	<b>Período das atividades do abate</b>
<b>Plataforma de desembarque</b>	<i>swab</i> de superfície de frangos	Início Intermediário Término
<b>Sangria</b>	Água residual de lavagem dos frangos	Início Intermediário Término
<b>Depenagem</b>	Água residual de lavagem dos frangos	Início Intermediário Término
<b>Evisceração</b>	Água residual de lavagem dos frangos	Início Intermediário Término
<b>Pré-resfriamento</b>	Água de lavagem das carcaças	Início Intermediário Término
<b>Resfriamento</b>	Água de lavagem das carcaças	Início Intermediário Término
<b>Carcaças prontas para comercialização</b>	Água de lavagem das carcaças	Início Intermediário Término

A amostragem da superfície dos frangos na plataforma de desembarque foi realizada com *swabs* esterilizados umedecidos no próprio Caldo de Enriquecimento para *Listeria* (LEB UVM – 1, Oxoid<sup>®</sup>) adicionado do suplemento SR141E (Oxoid<sup>®</sup>), no momento em que as aves foram retiradas das caixas plásticas de transporte e penduradas na nórea.

A amostragem dos frangos e das carcaças na linha de processamento, foi realizada utilizando-se alíquotas de 100mL da água que escorria após a lavagem de cada frango marcado com lacre, as quais foram coletadas em frascos de vidro esterilizado contendo 0,1mL de tiosulfato de sódio a 1%. Os pontos de coleta dessas amostras foram: sangria, depenagem e evisceração. Nas carcaças amostradas durante as etapas de pré-resfriamento, resfriamento e produto final, foi empregado lavagem da carcaça inteira, com 225mL de água peptonada 0,1% estéril. Retiravam-se alíquotas de 25mL, tanto da água que escorria dos frangos, quanto

das águas de lavagens das carcaças, inoculava-se em 225mL de LEB e, em seguida, incubava-se a 30 °C durante 24 horas.

### **Amostras de equipamentos e ambiente**

O ambiente de abate foi amostrado instantes antes do início das atividades de abate, com o auxílio de *swabs* esterilizados umedecidos em LEB. As amostras do ambiente da planta de processamento foram provenientes dos drenos e pisos da sala de evisceração e dos drenos da sala de resfriamento, enquanto que as amostras dos equipamentos foram provenientes das caixas plásticas em que os frangos eram transportados até a indústria, das escovas da depenadeira, das mesas utilizadas para manipular carcaças de frango e vísceras (antes e durante o processamento), do disco de corte de patas, das facas usadas na evisceração, da mesa de transpasse (utilizada para depositar as carcaças após o corte de patas e direcioná-las para a nórea da sala de evisceração), das esteiras plásticas (antes e no final do processamento), onde as carcaças eram conduzidas para serem embaladas, e da água de recirculação da sala de depenagem (a qual era o resíduo da água utilizada para a lavagem dos frangos após o processo de depenagem e reaproveitada, através de recirculação, durante todo o período de abate para carrear as penas), conforme pode ser melhor visualizado na Tab. 3.

Tabela 3 – Pontos de amostragem do ambiente e equipamentos em uma planta de processamento de frangos da região sul do Rio Grande do Sul

<b>Ponto amostrado</b>	<b>Período do abate e processamento</b>
Gaiolas de transporte	Início
Gaiolas de transporte	Durante
Gaiolas de transporte	Final
Escovas de depenagem	Início
Disco de corte de patas	Início
Mesa de transpasse	Início
<i>Pool</i> de facas	Durante
Piso da sala de evisceração	Início
Dreno da sala de resfriamento	Início
Dreno da sala de depenagem	Início
Mesa de separação de miúdos	Início
Mesa de separação de miúdos	Durante
Esteira de cortes	Início
Esteira de cortes	Final
Água de recirculação da sala de depenagem	Final

### **3.3 Amostras obtidas no comércio**

Foram avaliadas amostras de carcaças de frango refrigeradas, provenientes do comércio da cidade de Pelotas/RS, no período de agosto a outubro de 2006. Todas as amostras foram provenientes de indústrias situadas no estado do Rio Grande do Sul.

#### **3.3.1 Processo de amostragem**

Foram coletadas 25 amostras compostas, formadas por cortes de frango refrigerados (coxa, sobrecoxa e peito), tendo em vista que os frangos refrigerados não são comercializados na forma de carcaça inteiras. Os procedimentos de amostragem foram realizados de acordo com as recomendações de APHA (2001).

Cada amostra composta foi lavada com 225mL de água peptonada 0,1% e, em seguida, retiravam-se alíquotas de 25mL, que foram inoculadas em 225mL de LEB, incubando-se a 30 °C durante 24 horas.

Após a obtenção das amostras, estas foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo e transportadas até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos – MICROBIAL, no Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, na Universidade Federal de Pelotas, onde foram submetidas à análise microbiológica.

### **3.4 Isolamento e identificação de *Listeria* spp.**

O isolamento e a identificação de espécies de *Listeria* foram realizados conforme descrito por Farber et al. (1994) e contempla as seguintes etapas:

#### **3.4.1 Enriquecimento seletivo**

O enriquecimento seletivo primário foi realizado semeando-se as amostras em LEB e incubando-as a 30°C durante 24 horas. Alíquotas de 25mL das amostras oriundas de água de lavagem, foram transferidas para 225mL de LEB. Já as amostras de *swab*, que haviam sido inoculadas diretamente em LEB, após chegarem ao laboratório foram imediatamente incubadas.

#### **3.4.2 Enriquecimento seletivo diferencial**

A partir das amostras previamente enriquecidas em LEB, retirou-se 0,1mL, inoculou-se em caldo Fraser (Oxoid®) adicionado do suplemento SR 156 (Oxoid®) e incubou-se a 35-37°C por até 48horas.

#### **3.4.3 Isolamento de colônias típicas**

Após o período de incubação em caldo Fraser, as amostras que apresentavam modificação do meio, visualizada através de escurecimento - devido a degradação da esculina presente no meio de cultura – foram semeadas, com auxílio de alça de níquel-cromo, em dois ágaros seletivos e diferenciais: ágar Oxford (Oxoid®) adicionado do suplemento SR140E (Oxoid®) e ágar Palcam (Oxoid®)

adicionado do suplemento SR150E (Oxoid<sup>®</sup>). As placas contendo os ágaros foram incubadas a 35 °C por 48 horas.

#### **3.4.4 Seleção e cultivo de colônias**

A partir de cada um dos meios de cultura seletivos, foram escolhidas 3 colônias características de *Listeria* spp., as quais foram repicadas para caldo Triptona de Soja com 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE, Acumedia<sup>®</sup> e Vetec<sup>®</sup>), e incubadas por 35 ° durante 24 horas.

#### **3.4.5 Identificação bioquímica de *Listeria* spp.**

Para a identificação bioquímica em nível de espécie, foram empregados os seguintes testes: produção de catalase, motilidade a 25 °C em ágar semi-sólido, β-hemólise em ágar sangue de cavalo desfibrinado, fermentação de carboidratos (ramnose, dextrose, manitol e xilose), conforme descrito a Tab. 1.

As colônias presuntivas do gênero *Listeria* que haviam sido cultivadas em TSB-YE, foram repicadas para ágar Trypticase de Soja com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE, Acumedia<sup>®</sup> e Vetec<sup>®</sup>), e incubadas por 35 °C durante 24 horas, para posterior manutenção dos isolados.

Para a realização do teste da catalase, produziu-se uma suspensão bacteriana (retirando-se uma alçada do crescimento bacteriano e ressuspendendo em água salina 0,85% estéril) em uma lâmina de vidro, previamente higienizada com álcool etílico e, em seguida, adicionou-se água oxigenada a 3%. A reação positiva para o teste, ou seja, a presença da enzima, é evidenciada com o aparecimento de bolhas de oxigênio.

A motilidade foi avaliada a partir da inoculação dos isolados, com o auxílio de agulha de níquel-cromo, em 4mL de ágar Motilidade (Motility Test Medium, Difco<sup>®</sup>), os quais foram incubados a 25 °C por até 7 dias. Durante esse período, os isolados foram monitorados diariamente, a fim de detectar a motilidade característica de *Listeria* spp., a qual se apresenta em formato de guarda-chuva, comprovando desta forma, a propriedade microerofílica dessa bactéria.

O teste de  $\beta$ -hemólise foi realizado em placas de petri contendo ágar Sangue de Cavalo (7%), as quais foram divididas em 20 espaços, onde cada isolado foi inoculado com a utilização de agulha de níquel-cromo, e incubadas a 35°C durante 24 horas. Finalizado o período de incubação, as placas foram observadas sob luz clara, a fim de detectar produção de hemolisina. O resultado para cada isolado foi registrado como  $\beta$ -hemolítico (presença de zona de clareamento total ao redor do inóculo) ou como não  $\beta$ -hemolítico (sem produção de zona de clareamento ao redor do inóculo).

A fermentação de carboidratos foi efetuada com a adição dos respectivos açúcares [xilose (Vetec<sup>®</sup>), dextrose (Reagen<sup>®</sup>), manitol (Vetec<sup>®</sup>) e ramnose (Vetec<sup>®</sup>)] isoladamente, em ágar Púrpura de Bromocresol (Quimis<sup>®</sup>), o qual é o agente indicador de pH na reação de fermentação. As placas de petri, utilizadas para avaliar a fermentação de cada carboidrato, foram divididas em 20 espaços para a posterior inoculação dos isolados a serem testados. Uma vez inoculadas, as placas foram incubadas a 35-37°C, por 24 horas e, depois de transcorrido este período, os isolados foram considerados positivos para fermentação de cada carboidrato se, ao redor do local da inoculação, havia a produção de um halo amarelo, devido à degradação do açúcar e conseqüente produção de ácido e alteração do pH do meio. Os resultados negativos eram aqueles em que, ao redor do local da inoculação, não havia mudança da coloração do ágar.

### **3.5 Sorotipagem dos isolados de *Listeria monocytogenes***

Após a triagem bioquímica, todos os isolados identificados como *L. monocytogenes* foram cultivados em tubos tipo Eppendorf contendo TSA-YE, incubados por 35-37°C durante 24 horas e, posteriormente, encaminhados para o Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo cruz – FIOCRUZ, para serem submetidos a sorotipagem.

### 3.6 Análise de DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD)

#### 3.6.1 Preparo das células

Os isolados de *L. monocytogenes*, já sorotipados, foram cultivados em TSB-YE, a 35-37°C durante 24 horas. Os cultivos bacterianos foram centrifugados a 4000rpm por 15 minutos (Centrífuga Excelsa Baby II Modelo 206 – R Fanem<sup>®</sup>), o sobrenadante foi descartado, os precipitados de células foram ressuspensos em 1mL de solução salina 0,85% e transferidos para tubos tipo Eppendorf estéreis. Essas suspensões de células bacterianas foram centrifugadas a 16000rpm por 15 minutos (Centrifuge 5415 D Eppendorf<sup>®</sup>), os sobrenadantes removidos e os precipitados de células suspensos em 500µL de água destilada estéril. As suspensões foram diluídas com água destilada estéril até alcançarem uma densidade ótica de 1,8 a 600nm ( $A_{600}$ ) (Espectrofotômetro UV/ visível Ultrospec 2000, Pharmacia<sup>®</sup>). Essas suspensões, contendo aproximadamente  $10^7$  células por µL, foram utilizadas na reação de PCR.

#### 3.6.2 RAPD

A amplificação do DNA cromossomal foi executada pela técnica de RAPD, conforme protocolo proposto por Lima (2004), adaptado de Destro (1996). Foram utilizados, separadamente, os *primers* UBC 127 (5' – CTG GCG GCT G – 3') e UBC 155 (5' – ATC TGG CAG C – 3') ambos adquiridos da Invitrogen<sup>™</sup>.

A reação de amplificação foi realizada com um volume final de 25µL, contendo: 2,5µL de tampão de carga 10x, 2mM de cloreto de magnésio, 2,5mM de dNTPs, 1,5µL de *primer* (UBC 127 ou UBC 155), 3µL de suspensão de células bacterianas e 1U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen<sup>™</sup>). A amplificação foi realizada em Termociclador PTC - 100<sup>®</sup> (Peltier Thermal Cycler), seguindo os seguintes padrões: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C durante 5 minutos e, após, 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 35°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos. Terminados esses 40 ciclos, houve uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A conservação

dos produtos da PCR foi realizada por manutenção das amostras a 4°C por até 18 horas.

Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (Invitrogen™) 1,5%, corado com brometo de etídio e, para efeitos comparativos, adicionou-se à corrida o marcador de 100 pares de bases (Invitrogen™).

Finalizada a eletroforese, os géis foram fotografados sob iluminação em luz ultravioleta (TFX 35M, Life Technologies, Gibco BRL®), com conseguinte comparação das bandas geradas e, assim, os isolados foram agrupados em perfis RAPD.

### 3.7 Análise dos resultados

As bandas obtidas através da técnica RAPD com cada *primer* foram comparadas visualmente e os isolados foram agrupados conforme seus perfis polimórficos.

O poder discriminatório da sorotipagem e do RAPD foi alcançado calculando-se o índice de discriminação  $D$  (HUNTER & GASTON, 1988), que preconizam a equação:

$$D = 1 - [\sum n(n-1) / N(N-1)]$$

Sendo,  $n$  = número de amostras encontradas em cada um dos subtipos analisados e  $N$  = número total de amostras.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Ocorrência de *Listeria* spp.

#### 4.1.1 Ocorrência de *Listeria* spp. na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul

A ocorrência de *Listeria* spp. nas 239 amostras coletadas na cadeia produtiva de frangos foi de 37,2% (89/239), com 28% (67/239) das amostras positivas para *L. innocua*, 8,8% (21/239) positivas para *L. monocytogenes* e 0,4% (1/239) para *L. seeligeri*.

#### 4.1.2 Ocorrência de *Listeria* spp. nos estabelecimentos avícolas

O monitoramento de plantéis de frangos para a presença de *Listeria* foi realizado através da avaliação de 70 amostras obtidas a partir de *swabs* cloacais e de arrasto de cama de aviário e, em duas amostras (2,9%), isolaram-se bactérias pertencentes a esse gênero. Uma amostra (2,9%) dos 35 *swabs* cloacais foi positiva para *L. monocytogenes*, e em uma (2,9%) das 35 de *swabs* de arrasto isolou-se *L. innocua*.

Petersen & Madsen (2000), investigando a distribuição de *Listeria* spp. a partir de *swabs* cloacais coletados em lotes de frango, isolaram *L. monocytogenes* em 3% das amostras, dado que corrobora o resultado encontrado neste estudo. Em contrapartida, esses autores encontraram *L. innocua* em 13% das amostras de *swabs* cloacais, totalizando 16% de ocorrência de *Listeria* spp., valores superiores

aos obtidos neste trabalho. Nesse sentido, Quessy & Messier (1992), estudando a incidência de *Listeria* em gaivotas, encontraram *L. monocytogenes* em 9,5% e *L. innocua* em 13,6% das amostras de *swab* cloacal, e alertam que esses pássaros são capazes de contaminar frutas, vegetais e silagens.

Por outro lado, Ojeniyi et al. (1996), não isolaram *L. monocytogenes* de amostras de ceco de frango, assim como Fenlon et al. (1996), que analisando fezes de frangos e suínos, não detectaram bactérias do gênero *Listeria*. Esses últimos autores relatam que a presença deste patógeno no material fecal está relacionada com o tipo de alimentação disponibilizada aos animais, uma vez que dietas baseadas, por exemplo, em silagem, podem ser veículo de transmissão de *Listeria* spp.

As disparidades entre os resultados podem ser originadas pela região geográfica, pelas condições de criação das aves, pelos diferentes materiais amostrados, bem como, pelos distintos métodos empregados para o isolamento. Além disso, em face do pequeno número de relatos disponíveis na literatura com relação a prevalência de *Listeria* no trato intestinal de aves, há dificuldade na discussão dos resultados obtidos neste estudo. No entanto, os frangos podem carrear *L. monocytogenes* em seu trato intestinal e, dessa forma, contaminar os criatórios e abatedouros de frangos. Neste estudo observou-se a presença de microrganismos do gênero *Listeria* nos plantéis avícolas, o que permite inferir que a disseminação desse patógeno possa iniciar já a partir desse ponto da cadeia produtiva.

#### **4.1.3 Ocorrência de *Listeria* spp. na planta de abate de frangos**

Das 144 amostras oriundas da planta de abate e processamento de frangos, 55 (38,2%) apresentavam contaminação por bactérias do gênero *Listeria*.

A espécie isolada com maior frequência foi *L. innocua*, com 47 amostras (32,6%) contaminadas por esse patógeno, ao passo que 15 (10,4%) apresentaram contaminação por *L. monocytogenes*. É interessante frisar que sete amostras apresentaram contaminação simultânea com *L. innocua* e *L. monocytogenes*, o que pode ser notado ao observar as ocorrências deste estudo. A distribuição de *Listeria* spp. na linha de abate e de processamento avaliada pode ser melhor visualizada através da Tab. 4.

De forma geral, as bactérias do gênero *Listeria* somente não foram isoladas a partir da superfície dos frangos, na plataforma de desembarque, e na água de lavagem de frangos nas etapas de sangria e depenagem. Já a espécie *L. monocytogenes* não foi isolada das gaiolas de transporte e da superfície dos frangos na plataforma de desembarque, assim como, das águas de lavagens dos frangos nas etapas de sangria e depenagem, da água de recirculação, dos discos de corte de patas e dos drenos na sala de depenagem e, por fim, das facas na sala de evisceração. Em contrapartida, Barbalho et al. (2005), estudando a ocorrência de *Listeria* spp. em uma planta de abate e processamento de frangos no estado da Bahia - Brasil, somente isolaram *L. monocytogenes* em um ponto desta linha, ou seja, a partir das carcaças coletadas no setor de embalagem, as quais estavam prontas para serem encaminhadas ao comércio.

Neste estudo, a presença de *L. monocytogenes* foi evidenciada nas escovas da depenadeira, na mesa de transpasse, na água de lavagem dos frangos na etapa de evisceração, no pré-resfriamento, no resfriamento e no produto final. Além disso, também foi encontrada em amostras do piso da sala de evisceração, no dreno da sala de resfriamento, na mesa de separação de miúdos, assim como nas esteiras de cortes.

Gudbjornsdóttir et al. (2004), pesquisando a incidência de *Listeria* spp. em plantas de processamento de carne bovina, de frango e de pescados, observaram que a maior frequência foi obtida nas plantas de processamento de frangos, onde, em média, 45,3% das amostras foram positivas para *Listeria* spp., e 21,9% para *L. monocytogenes*. Frequências inferiores foram detectadas por Miettinen et al. (2001), que investigando a prevalência de *L. monocytogenes* em dois abatedouros de frangos, da Finlândia, verificaram a presença desse patógeno em 1 e 11% das amostras, respectivamente.

Alguns autores, tais como, Chasseignaux et al. (2002), comentam que, nas diversas plantas de processamento de frangos estudadas, as principais fontes de contaminação por *L. monocytogenes* foram os equipamentos e utensílios, tais como, esteiras e bandejas, além dos pisos e drenos. Uma vez que, estes mesmos pesquisadores, evidenciaram o isolamento deste patógeno em 23,7% das amostras provenientes do ambiente de processamento. Já no presente estudo, isolou-se *Listeria* spp. em 65% (39/60) das amostras de equipamentos e do ambiente de

abate e processamento, dos quais, 48,3% (29/60) eram contaminadas por *L. innocua* e 16,7% (10/60) por *L. monocytogenes*.

Nesta pesquisa, o isolamento de *Listeria* spp. a partir da superfície dos frangos na plataforma de desembarque pode ter sido dificultado pela elevada carga microbiana de origem fecal existente nestas amostras. Nas primeiras coletas, observou-se que as aves permaneciam em gaiolas apresentando condições inadequadas de higiene, mantendo, dessa forma, um ambiente impróprio para o desenvolvimento de *Listeria*, uma vez que esse microrganismo não é um bom competidor. Entretanto, na última coleta, onde as gaiolas de transporte apresentavam-se em boas condições higiênicas, foi possível isolar *L. innocua* (Tab.4).

Martinez et al. (2003), empregando RAPD também não conseguiram estabelecer uma relação entre os frangos que chegavam para o abate, e a fonte de contaminação dentro da indústria. Já Lawrence & Gilmour (1995), utilizando RAPD para mapear os pontos de contaminação por *L. monocytogenes* em uma planta de abate de frangos, observaram que a origem da contaminação era as aves que chegavam ao frigorífico para serem abatidas. Através dos dados obtidos por sua pesquisa, foi possível verificar a predominância do genótipo proveniente das aves na planta processadora, indicando que, ou a matéria-prima atua como contínua fonte de contaminação, ou, estas cepas aderidas às superfícies de contato com os frangos em processamento, são as fontes de contaminação cruzada.

A ausência de *Listeria* spp. na água de lavagem dos frangos na etapa de depenagem, pode ser atribuída à temperatura da água, a qual situava-se entre 58 e 60 °C, o que pode provocar um estresse térmico capaz de injuriar o microrganismo, dificultando sua recuperação nos meios de cultura utilizados. É interessante frisar que, nos pontos de amostragens subseqüentes à esta etapa do processamento, tais como, nas escovas da depenadeira, foi possível isolar tanto *L. monocytogenes*, quanto *L. innocua*. Deste modo, é possível inferir que as escovas, até mesmo por sua diferenciada estrutura anatômica, a qual dificulta a higienização, podem ser um dos pontos onde há persistência de *Listeria*, facilitando, desta forma, a disseminação desses microrganismos para as carcaças de frango. Em contrapartida a esses resultados, Barbalho et al. (2005), obtiveram sucesso ao isolar *L. innocua* em carcaças de frangos nos setores de sangria e depenagem.

Consultando-se a literatura, observa-se que não há uniformidade entre os pontos amostrados nos diferentes abatedouros de frangos referenciados na literatura, o que dificulta, de certo modo, a comparação entre resultados. Este fato pode ser explicado pelos distintos equipamentos utilizados nas diversas plantas de abate e processamento ao redor do mundo. No entanto, Miettinen et al. (2001), avaliando duas plantas de processamento na Finlândia, isolaram *L. monocytogenes* da esteira no setor de embalagem dos frangos nos dois estabelecimentos, semelhantemente ao encontrado no presente estudo. Este ponto de amostragem pode ser um importante sítio de contaminação por *Listeria*, haja vista que, através dela, as carcaças são conduzidas para a embalagem, seguido então, de armazenamento para a posterior comercialização. Uma vez que, *Listeria* spp. é um microrganismo psicrotrófico, a contaminação nesta etapa prévia à conservação pelo frio, pode aumentar o risco de proliferação bacteriana associado ao produto. Miettinen et al. (2001) relatam ainda, que a contaminação das carcaças de frango nos abatedouros também pode ocorrer durante as etapas de resfriamento e de retirada da pele, já que o patógeno em questão não foi detectado antes desses procedimentos.

É interessante salientar que num mesmo ponto de amostragem houve alternância no isolamento de espécies de *Listeria* nas diferentes coletas (Tab. 4), tendo em vista que, por vezes foi observada a presença de *L. monocytogenes* e, em outras, *L. innocua*. Fato semelhante foi observado por Vitas, Aguado & Garcia-Jalon (2004), os quais relataram que a contaminação com diferentes espécies de *Listeria* foi observada em vários tipos de alimentos, em especial os crus, e que, amostras contaminadas por *L. monocytogenes* e *L. innocua*, foi a combinação mais freqüente. De acordo com Lawrence & Gilmour (1994), isso se justifica pelo fato dos nichos ecológicos de *Listeria* spp. se sobreporem e, desta maneira, não é rara a ocorrência de mais de uma espécie em uma mesma amostra. Esse fato é preocupante do ponto de vista de saúde pública, tendo em vista que, segundo Azevedo et al. (2005), a presença de qualquer espécie do gênero *Listeria* pode ser indicativa de higiene inadequada e de cenários de contaminação cruzada, que podem favorecer a contaminação e a persistência de *L. monocytogenes*.

A presença de *L. monocytogenes* em superfícies de equipamentos, tais como nas esteiras de transporte da sala de cortes é preocupante, devido ao fato delas poderem contribuir para a disseminação da bactéria para o produto que está sendo

processado, o que, possivelmente, ocorreu neste estudo. De acordo com Ojeniyi et al. (1996), a maior probabilidade de contaminação das carcaças por *L. monocytogenes* ocorre durante o processamento. Nesse caso, o frango refrigerado, ao ser manipulado nos domicílios, pode ocasionar contaminação cruzada para outros alimentos, a qual representa o principal fator de veiculação de *L. monocytogenes* (VITAS, AGUADO & GARCIA-JALON, 2004).

Tabela 4 - Distribuição de *Listeria* spp. e dos sorotipos de *L. monocytogenes* na linha de abate e processamento de frangos

Ponto amostrado	Coleta	Período do abate e processamento			
		Início	Intermediário	Final	
Espécie <i>Listeria</i> / sorotipo					
Plataforma de desembarque	Swab de gaiolas de transporte	1	-*	-	-
		2	-	-	-
		3	-	-	-
		4	<i>L. innocua</i>	-	-
	Swab de superfície dos frangos	1	-	-	-
		2	-	-	-
		3	-	-	-
		4	-	-	-
Sangria	Água residual de lavagem dos frangos	1	-	-	-
		2	-	-	-
		3	-	-	-
		4	-	-	-
Depenagem	Água residual de lavagem dos frangos	1	-	-	-
		2	-	-	-
		3	-	-	-
		4	-	-	-
	Swab das escovas da depenadeira	1	<i>L. monocytogenes</i> / 4b	NA*	NA
		2	-	NA	NA
		3	<i>L. innocua</i>	NA	NA
		4	-	NA	NA
	Água de recirculação	1	NA	NA	<i>L. innocua</i>
		2	NA	NA	<i>L. innocua</i>
		3	NA	NA	<i>L. innocua</i>
		4	NA	NA	<i>L. innocua</i>
Swab do disco de corte de patas	1	<i>L. innocua</i>	NA	NA	
	2	<i>L. innocua</i>	NA	NA	
	3	<i>L. innocua</i>	NA	NA	
	4	<i>L. innocua</i>	NA	NA	

\* sem crescimento  
NA - não amostrado

Continuação da Tabela 4 - Distribuição de *Listeria* spp. e dos sorotipos de *L. monocytogenes* na linha de abate e processamento de frangos

Ponto amostrado	Coleta	Período do abate e processamento			
		Início	Intermediário	Final	
Espécie <i>Listeria</i> / sorotipo					
Depenagem	Swab da mesa de transpasse	1	<i>L. innocua</i>	NA	NA
		2	<i>L. monocytogenes</i> / 1/2b	NA	NA
		3	<i>L. innocua</i>	NA	NA
		4	<i>L. innocua</i>	NA	NA
	Swab dos drenos	1	<i>L. innocua</i>	NA	NA
		2	-	NA	NA
		3	<i>L. innocua</i>	NA	NA
		4	<i>L. innocua</i>	NA	NA
Evisceração	Água residual de lavagem dos frangos	1	<i>L. innocua</i>	-	<i>L. innocua</i>
		2	-	-	-
		3	-	-	-
		4	<i>L. innocua</i>	-	<i>L. monocytogenes</i> (1/2b) / <i>L. innocua</i>
	Swab do pool de facas	1	NA	<i>L. innocua</i>	NA
		2	NA	-	NA
		3	NA	-	NA
		4	NA	-	NA
Swab do piso	1	NA	NA	-	
	2	NA	NA	<i>L. innocua</i>	
	3	NA	NA	<i>L. monocytogenes</i> (1/2b) / <i>L. innocua</i>	
	4	NA	NA	<i>L. monocytogenes</i> (1/2b)	
Resfriamento de carcaças do pré-resfriamento	1	-	-	-	
	2	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	
	3	<i>L. monocytogenes</i> / 1/2b	-	-	
	4	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	

\* sem crescimento  
NA - não amostrado

Continuação da Tabela 4 - Distribuição de *Listeria* spp. e dos sorotipos de *L. monocytogenes* na linha de abate e processamento de frangos

Ponto amostrado	Coleta	Período do abate e processamento			
		Início	Intermediário	Final	
Espécie <i>Listeria</i> / sorotipo					
Resfriamento	Água de lavagem das carcaças do resfriamento	1	-	-	-
		2	-	-	-
		3	-	-	<i>L. monocytogenes</i> / 1/2b
		4	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>
	Swab dos drenos	1	-	NA	NA
		2	<i>L. monocytogenes</i> (1/2b) / <i>L. innocua</i>	NA	NA
		3	<i>L. innocua</i>	NA	NA
		4	<i>L. innocua</i>	NA	NA
	Swab da mesa de separação de miúdos	1	<i>L. monocytogenes</i> / 1/2b	-	NA
		2	-	<i>L. innocua</i>	NA
		3	-	-	NA
		4	-	-	NA
Sala de cortes	Swab da esteira de cortes	1	<i>L. innocua</i>	NA	-
		2	<i>L. innocua</i>	NA	<i>L. innocua</i>
		3	<i>L. monocytogenes</i> (1/2b) / <i>L. innocua</i>	NA	<i>L. monocytogenes</i> / 1/2b
		4	<i>L. monocytogenes</i> (1/2b) / <i>L. innocua</i>	NA	<i>L. monocytogenes</i> (1/2b) / <i>L. innocua</i>
	Produto Final	1	-	-	-
		2	-	-	-
		3	<i>L. monocytogenes</i> / 1/2b	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>
		4	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i> (1/2b) / <i>L. innocua</i>

\* sem crescimento  
NA - não amostrado

#### 4.1.4 Ocorrência de *Listeria* spp. em frangos refrigerados comercializados na cidade de Pelotas/RS

A partir das 25 amostras de frangos refrigerados provenientes do comércio varejista na cidade de Pelotas/RS, isolou-se *Listeria* spp. em 23 amostras (92%), sendo 19 (76%) contaminadas com *L. innocua*, cinco (20%) com *L. monocytogenes* e uma (4%) com *L. seeligeri*.

Miettinen et al. (2001) avaliaram a ocorrência de *L. monocytogenes* em cortes de frango procedentes do comércio finlandês, e encontraram 62% de contaminação. Já Vitas, Aguado & Garcia-Jalon (2004), avaliando alimentos frescos e processados comercializados na Espanha, observaram que 36,1% dos frangos crus estavam contaminados por *L. monocytogenes*, e que *L. innocua* estava presente em 67,4% das amostras analisadas.

Esses resultados estão de acordo com os obtidos neste estudo no sentido de que *L. innocua* é mais freqüente que *L. monocytogenes*. Segundo Yokoyama et al. (1998), isto se deve ao fato de *L. innocua* possuir uma taxa de crescimento superior a de *L. monocytogenes*, além de produzir substâncias semelhantes a bacteriocinas, que teriam a capacidade de inibir o crescimento de *L. monocytogenes* durante o período de enriquecimento em meios de cultura. Ressalta-se que o isolamento de espécies não-patogênicas de *Listeria* não elimina a possibilidade de *L. monocytogenes* estar presente na mesma amostra e não ser detectada (Curiale & Lewus, 1994).

Araújo et al. (2002) ao analisarem produtos de carne de peru, constataram que as amostras adquiridas inteiras não estavam contaminadas com bactérias do gênero *Listeria*, ao passo que as amostras fatiadas, apresentavam contaminação ao redor de 80-90%. Esses autores relatam, ainda, que a ausência de *Listeria* em produtos inteiros, e a alta ocorrência em fatiados, sugerem práticas inadequadas de manipulação, higiene e armazenamento nos locais onde são realizados o fracionamento e a venda de produtos cárneos. Essas informações também são válidas para os cortes de frango, os quais muitas vezes são vendidos a granel e, dessa maneira, sofrem grande manipulação.

Além disso, é de extrema importância destacar que, alimentos com atividade de água e valores de pH adequados ao crescimento microbiano (tal como a carne de frango), e estocados sob refrigeração, dificultam a multiplicação da microbiota

competitiva e permitem que patógenos psicotróficos, como *L. monocytogenes*, atinjam densidades celulares elevadas (VITAS, AGUADO & GARCIA-JALON, 2004).

#### 4.2 Subtipificação dos isolados de *L. monocytogenes* por sorologia

Através de testes bioquímicos e sorológicos, obteve-se 83 isolados de *Listeria monocytogenes*, o que permitiu traçar um perfil epidemiológico desse microrganismo na cadeia produtiva de frangos da região sul do Rio grande do Sul. A ocorrência geral foi de 66,3% (55/83) dos isolados pertencentes ao sorotipo 1/2b, 14,5% (12/83) ao sorotipo 4b, 12% (10/83) ao sorotipo 1/2a, 3,6% (3/83) ao sorotipo 1/2c e 3,6% (3/83) ao sorotipo 4e.

Os três isolados provenientes de *swab* cloacal pertenciam ao sorotipo 4e. Ao passo que, na planta de abate, todos os isolados (57) pertenciam aos sorotipos 1/2b e 4b, havendo prevalência do primeiro, com 79% (45/57). Já nas amostras de frangos refrigerados do comércio local, foram obtidos 23 isolados, pertencentes aos sorotipos 1/2a (43,5%), 1/2b (43,5%) e 1/2c (13%).

Vários autores relatam que os sorotipos mais envolvidos em casos e surtos de listeriose são o 4b, 1/2a e 1/2b, os quais foram os mais isolados neste estudo. Já o sorotipo 1/2c, também obtido neste trabalho, nunca foi envolvido em casos e surtos de listeriose, embora, todo isolado de *Listeria monocytogenes* deva ser considerado potencialmente patogênico ao homem. Esta informação contrapõe os resultados encontrados nas pesquisas de Miettinen et al. (2001), que avaliaram plantas de abate e processamento de frangos, bem como, produtos finais em nível de comércio, e detectaram que 65% de todos os isolados pertenciam ao sorotipo 1/2c, 25% ao sorotipo 1/2a e 10% ao sorotipo 4b. Esses resultados vão de encontro às informações obtidas neste estudo, uma vez que o sorotipo 1/2b, o mais isolado, não foi diagnosticado por aqueles autores, bem como pelo fato do sorotipo 1/2c, ser o menos freqüente neste trabalho.

Já Vitas, Aguado & Garcia-Jalon (2004) analisando, dentre outros alimentos, carnes de frango, encontraram o sorotipo 1/2b como o mais freqüente (36,8%), seguido pelo 1/2a, 4b e 1/2c. Esses dados estão em concordância com os resultados obtidos neste estudo, tendo em vista que o sorotipo 1/2b também foi o mais isolado, e o 1/2c foi o sorotipo menos freqüente.

Por outro lado, Araújo et al. (2002), investigando a presença de *L. monocytogenes* em produtos de carne de peru obtidos no comércio da cidade de Niterói/RJ, constataram que 51,9% dos isolados pertenciam ao sorotipo 4b, 34,6% ao sorotipo 1/2c, 7,7% ao sorotipo 1/2b e 5,8% ao 1/2a. Esses resultados divergem dos encontrados neste estudo, uma vez que, o sorotipo 4b não foi encontrado nas amostras originadas do comércio, no entanto, os outros sorotipos, apesar das frequências de isolamento distintas, são similares e também os mais relacionados a produtos cárneos.

Thévenot et al. (2006), estudando a distribuição de sorotipos de *L. monocytogenes* em carne salgada de suíno, detectaram que 49,9% das amostras pertenciam ao sorotipo 1/2a, 20,4% ao sorotipo 1/2c, 12% ao sorotipo 1/2b, 4% ao sorotipo 4b, e 0,1% das amostras eram positivas para o sorotipo 4e. Os resultados encontrados por esses autores contrastam com os evidenciados neste estudo, todavia, também detectaram o sorotipo 4e em pequena escala, o que também foi observado neste estudo. Deve-se salientar que os isolados pertencentes ao sorotipo 4e, obtidos neste estudo, são provenientes da cloaca dos frangos oriundos dos estabelecimentos avícolas.

Qualquer cepa de *L. monocytogenes* pode ser considerada potencialmente patogênica para humanos. Entretanto, várias observações sugerem que *L. monocytogenes* apresenta virulência heterogênea em função de seus sorotipos, os quais estariam associados, de alguma forma, com o potencial de patogenicidade do microrganismo (JACQUET et al., 2002). De todos os sorotipos conhecidos, somente 1/2a, 1/2b e 4b foram envolvidos em surtos e casos esporádicos da doença (McLAUHLIN, 1997 apud LIANOU et al., 2006), sendo mais comumente isoladas cepas do sorotipo 4b em surtos, e cepas dos sorotipos 1/2a e 1/2b em casos esporádicos (JESÚS & WHITING, 2003).

Apesar dos isolados pertencentes ao sorotipo 4b possuírem capacidade patogênica comprovada, estes não são prevalentes em alimentos e existem algumas hipóteses que tentam explicar esse fato. Em uma delas, Bruhn, Vogel & Gram (2005), esclarecem que cepas pertencentes a esse sorotipo são mais sensíveis aos meios seletivos de enriquecimento utilizados para isolamento de *L. monocytogenes* do que os demais sorotipos, fato que subestimaria sua presença em alimentos e em plantas de processamento.

A avaliação do índice discriminatório obtido para a sorotipagem foi realizada de acordo com as recomendações de Hunter & Gaston (1998), alcançando  $D=0,53$ , o que é baixo segundo aqueles autores, tendo em vista que é necessário um índice discriminatório maior que 0,90 para que haja boa diferenciação entre as cepas. Os dados do presente estudo vão ao encontro daquele alcançado por Lima (2004), que ao analisar seus resultados da sorotipagem constatou que o índice discriminatório entre seus isolados era de 0,46.

### 4.3 Subtipificação dos isolados de *L. monocytogenes* por RAPD

A avaliação do polimorfismo do DNA dos 81 isolados de *Listeria monocytogenes* foi realizada através da técnica RAPD com os *primers* UBC 155 e UBC 127.

Como certificação da reprodutibilidade da técnica, todos os ensaios, tanto o preparo das células, quanto as reações de amplificação, foram realizados duas vezes e em dias diferentes. A utilização de células íntegras bacterianas como molde para as amplificações gerou padrões de bandas reprodutíveis, tal como foi previamente relatado por Destro (1995).

O polimorfismo genético gerado a partir do iniciador UBC 155, originou 21 diferentes perfis de DNA, com 1 a 9 bandas distintas, e pesos moleculares variando entre 200 e 2669 pares de bases (Fig. 4). Ao analisar os perfis RAPD, percebe-se que 15,7% dos isolados de *L. monocytogenes* pertenceram ao perfil 5, enquanto 10% estavam albergados no perfil 10. Em cada um dos perfis 2, 13, 18 e 19, estavam distribuídas 7,1% dos isolados, enquanto os demais isolados pertenceram aos perfis restantes.

Os 12 isolados pertencentes ao sorotipo 4b, ficaram distribuídos entre os perfis 1 a 6, sendo que nos perfis 1, 2 e 3 distribuíram-se três isolados em cada. No entanto, somente os perfis 1, 3 e 4 foram exclusivos para o referido sorotipo. Já os perfis 2, 5 e 6 foram compartilhados com isolados do sorogrupo 1 e com um isolado do sorotipo 4e, tal como pode ser visualizado na Tab. 5.

O iniciador UBC 127, gerou 18 distintos perfis genéticos, apresentando, da mesma forma que o *primer* UBC 155, 1 a 9 diferentes bandas. Contudo, os pesos moleculares oscilaram entre 200 e 2403 pares de bases (Fig. 5). Neste caso, os

perfis J e P albergaram 17,2% dos isolados cada um, enquanto ao perfil A pertenceram 10,3% dos isolados e aos perfis B e I, 6,8% em cada. Os isolados restantes ficaram distribuídos nos demais perfis.

Os isolados do sorotipo 4b distribuíram-se entre os perfis A e E, todavia, com exceção do perfil A, os demais perfis foram exclusivos a este sorotipo. Os outros perfis RAPD, gerados com este *primer*, foram específicos para o sorogrupo 1.

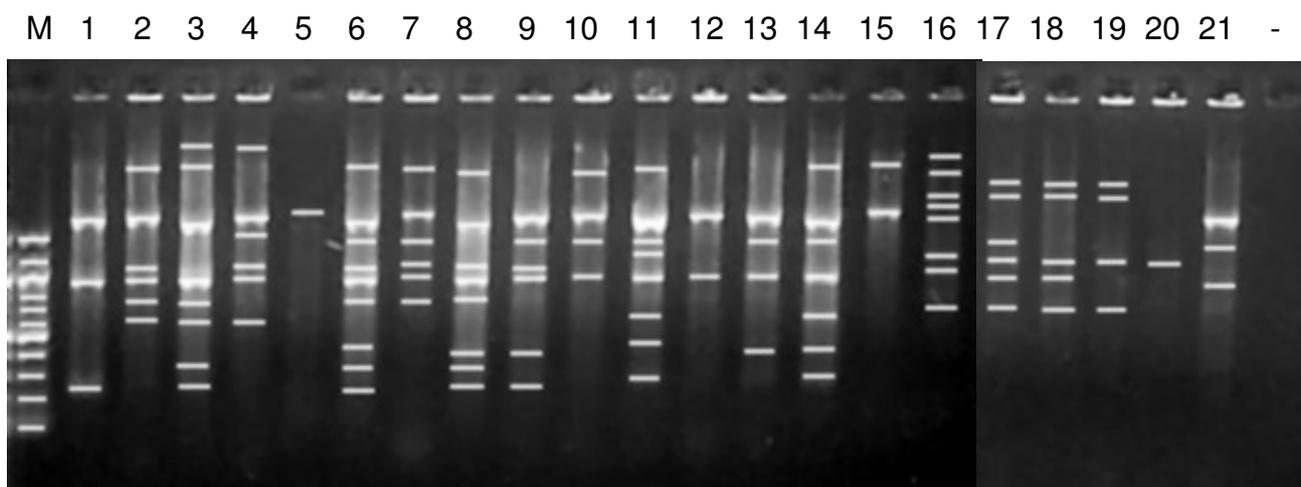


Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose (1,5%) dos perfis RAPD obtidos com o *primer* UBC 155. Pista M – marcador de peso molecular Ladder 100pb Biolabs®; pista 1 – 21: padrões de bandas de DNA dos perfis de 1 a 21; pista (-): controle negativo.

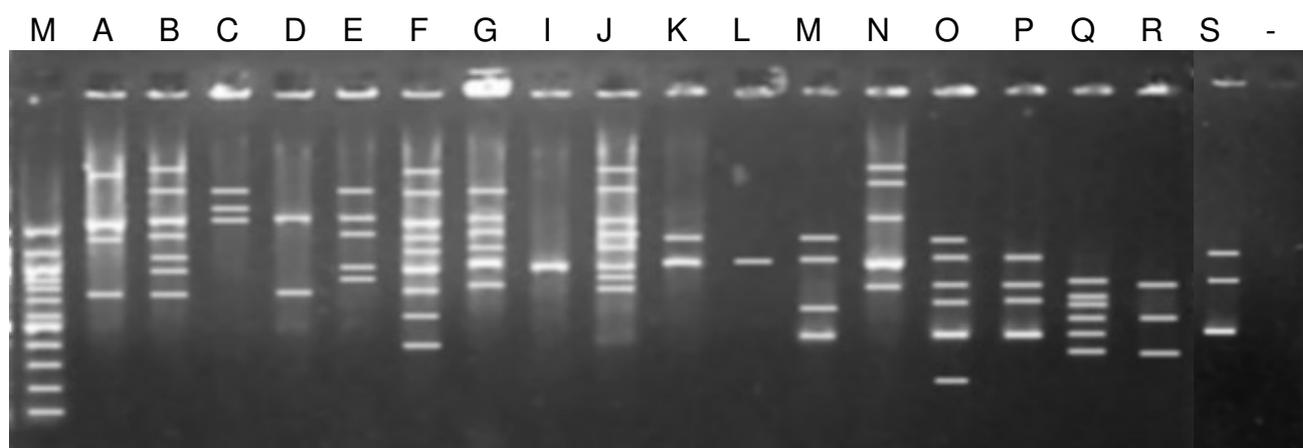


Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose (1,5%) dos perfis RAPD obtidos com o *primer* UBC 127. Pista M – marcador de peso molecular Ladder 100pb Biolabs®; pista A – S: padrões de bandas de DNA dos perfis de A a S; pista (-): controle negativo.

### 4.3.1 Análise dos perfis RAPD individuais

Com o *primer* UBC 127 observou-se que isolados pertencentes ao perfil J, foram encontrados na esteira, antes e depois do processamento, bem como no produto final (Tab. 5). É interessante frisar que as carcaças de frango, antes de serem embaladas e encaminhadas para o comércio, entram em contato direto com a esteira e, desta forma, este pode ser um importante ponto de contaminação cruzada.

No perfil 15, obtido com o *primer* UBC 155, ficaram alocados dois isolados provenientes da cloaca de frangos dos estabelecimentos avícolas, ao qual também pertenceu um isolado do produto final. Se levarmos em consideração apenas os resultados obtidos com esse *primer*, a presença de isolados com o mesmo perfil genético nos estabelecimentos avícolas e no frigorífico abatedouro, sugere a possibilidade de contaminação da planta processadora com as fezes destas aves, possivelmente na etapa de evisceração. Entretanto, o DNA dos isolados da cloaca dos frangos não amplificou com o *primer* UBC 127, enquanto o isolado procedente das carcaças apresentou o perfil O, o que dificultou a análise dos resultados.

Isolados pertencentes ao perfil 5 apresentaram grande dispersão no universo amostrado (Tab. 5). Nesse perfil estavam alocados isolados obtidos nas 4 coletas realizadas no frigorífico-abatedouro, um dos isolados provenientes dos estabelecimentos avícolas, e isolados das amostras de frangos comercializados na cidade de Pelotas. Ressalta-se que todos os isolados com este perfil molecular e provenientes do comércio, foram oriundos do frigorífico-abatedouro estudado (dados não mostrados). Dessa forma, pode-se inferir que isolados com esse perfil estão distribuídos nessa cadeia produtiva, uma vez que são encontrados desde a granja até o comércio.

É importante destacar que as coletas se estenderam por um período de seis meses e, mesmo assim, isolados com o perfil 5 continuaram sendo obtidos na planta de processamento. Este resultado sugere práticas de limpeza e de sanitização insatisfatórias, já que o microrganismo persistiu durante esse período. Fato semelhante foi relatado por Gusmundsdóttir et al. (2004), os quais observaram que a contaminação por *L. monocytogenes* pode se disseminar através do ambiente de processamento, desde a matéria-prima até o produto final, e resistir aos procedimentos de limpeza. De acordo com Lawrence & Gilmour (1995), a persistência de microrganismos em determinados nichos pode reforçar as

habilidades de adesão e de formação de biofilmes, oferecendo, desta maneira, uma proteção contra agentes antimicrobianos utilizados no controle de patógenos.

A formação de biofilmes e a persistência de determinados clones de *L. monocytogenes* no ambiente de processamento de alimentos têm sido considerados importantes do ponto de vista de segurança alimentar e de garantia da indústria em programas de certificação de qualidade. Conforme reportado por Thévenot et al. (2006), os isolados de *L. monocytogenes* são considerados persistentes quando um mesmo perfil ocorre em amostras coletadas em uma mesma indústria e no mesmo equipamento, depois de um intervalo de, no mínimo, duas semanas. Tanto a prevalência do mesmo isolado de *L. monocytogenes* por longos períodos, quanto a contaminação por múltiplos isolados, indicam contaminação contínua, bem como contaminação cruzada dos equipamentos, utensílios e/ou funcionários em uma indústria (MARTINEZ et al., 2003).

#### **4.3.2 Análise dos perfis RAPD compostos**

Através dos perfis compostos, gerados a partir da combinação dos resultados obtidos com os dois *primers*, os 81 isolados de *L. monocytogenes* foram reagrupados em 29 perfis, no entanto, observou-se que poucos isolados foram alocados em cada perfil (1 a 4 isolados). Este fato pode ser atribuído tanto à diversidade genética apresentada pelos isolados ou quanto à falta de amplificação do DNA de alguns isolados bacterianos. O perfil que agrupou o maior número de isolados foi o 8I, no qual foram alocados quatro isolados. Já os perfis 1A, 3B, 10J, 13J, 18P, 19P e 5R, agruparam três isolados cada, enquanto os demais perfis alocaram somente um ou dois isolados cada.

Segundo Silva et al. (2001), o número de perfis genéticos reportados pelos diferentes grupos de pesquisa que trabalham com RAPD é extremamente variável. Isto se deve as distintas seqüências de *primers* utilizadas, fonte dos reagentes, equipamentos e programas para execução do RAPD, assim como às características dos isolados.

Ao analisar a Tab. 5, nota-se que os perfis compostos obtidos pela combinação dos dois iniciadores geraram perfis exclusivos para os isolados do sorotipo 4b, assim, pode-se inferir que o RAPD permitiu a diferenciação entre isolados oriundos desse sorotipo, informação que não seria possível somente com a

utilização da sorotipagem. Esta situação também foi observada por Lima (2004), que utilizou RAPD com o mesmo conjunto de *primers* para estudar a disseminação de *L. monocytogenes* em uma planta processadora de lingüiça mista do tipo frescal, e conseguiu diferenciar isolados pertencentes ao sorogrupo 4, contudo, a autora relata que existiram dois perfis combinados que também contemplavam isolados do sorogrupo 1. Para Silva et al. (2001), a obtenção de perfis compostos a partir da combinação dos resultados RAPD, aumentou a capacidade discriminatória entre os sorotipos de *L. monocytogenes*, o que também foi observado por Byun, Jung & Yoo (2001).

Com relação aos demais sorotipos, os *primers* utilizados não foram capazes de aloca-los em perfis exclusivos, capazes de discriminá-los, o que vem ao encontro de Byun, Jung & Yoo (2001), que relatam que as regiões do DNA amplificadas na PCR não são sorotipo-específico.

Observando-se a distribuição dos perfis compostos nos pontos de amostragem na planta de processamento durante a primeira coleta, é possível evidenciar que isolados pertencentes ao perfil 3B estavam presentes nas escovas da depenadeira, bem como na mesa de separação de miúdos. De acordo com Johansson et al. (1999), existem muitos pontos críticos nas linhas de produção, mas os equipamentos que apresentam dificuldade de limpeza, parecem atuar como protagonistas na disseminação de *L. monocytogenes*, fato também observado neste estudo, já que as escovas da depenadeira possuem uma estrutura anatômica que dificulta a higienização do equipamento. Além disso, esse resultado, aliado à distância física entre esses pontos, permite deduzir que houve a disseminação de *L. monocytogenes* nessa planta processadora, o que pode ter ocorrido através dos funcionários, haja vista que estes circulam livremente entre um setor e outro, podendo, dessa forma, ter ocorrido a dispersão do patógeno através do contra-fluxo dos trabalhadores.

Na segunda coleta, o único ponto no qual se isolou *L. monocytogenes* foi a mesa de transpasse, todavia, observou-se uma grande diversidade nos perfis gerados: 6F, 5G, 6G e 7H. De acordo com alguns pesquisadores (LAWRENCE & GILMOUR, 1995; BYUN, JUNG & YOO 2001; SILVA et al., 2003; MARTINEZ et al., 2003), distintos isolados de *L. monocytogenes* podem ser encontrados em um ambiente de processamento de alimentos, incluindo a linha de processamento e o produto final, o que reflete o grau de contaminação presente nestes sítios

(LAWRENCE & GILMOUR,1995). Nesse sentido, Gusmundsdóttir et al. (2004) relatam que os equipamentos e o ambiente da linha processadora, mais do que as matérias-primas, são as principais fontes de *L. monocytogenes* no produto final. No entanto, não se pode excluir a possibilidade da matéria-prima ser uma importante fonte de contaminação inicial da planta de processamento (VOGEL et al., 2001b, MARTINEZ et al., 2003).

Na terceira coleta, verificou-se que o perfil 8I agrupava isolados provenientes do piso da sala de evisceração e também isolados oriundos da água de lavagem da carcaça no pré-resfriador, no início do processamento. Observando-se o fluxograma da indústria avaliada (Fig. 3), a contaminação das carcaças na etapa de pré-resfriamento, pode ter ocorrido durante seu transporte da sala de evisceração para aquele equipamento, ou, até mesmo, pelos funcionários, através de seu deslocamento pela planta. De acordo com Gudmundsdóttir et al. (2004), os procedimentos convencionais de limpeza não eliminam completamente *Listeria* spp. dos pisos e drenos, os quais são importantes fonte de contaminação cruzada.

Ainda na terceira coleta, pôde-se observar que isolados pertencentes ao perfil composto 10L estavam presentes no produto final, quando se avaliou o início do processamento, bem como nas esteiras, na etapa final do processamento. Dessa forma, isolados pertencentes a esse perfil, e que contaminavam o produto acabado na fase inicial do processamento, possivelmente, disseminaram *L. monocytogenes* para as esteiras de transporte.

Através dos resultados obtidos com o RAPD, pôde-se observar que as esteiras representam um importante sítio de disseminação de *L. monocytogenes* na indústria estudada. No final do processamento, durante a amostragem da quarta coleta, além do perfil 10L, já evidenciado na coleta anterior nesse mesmo ponto, foram encontrados isolados pertencentes ao perfil 12N, o qual foi exclusivo desse ponto de amostragem. Além desses perfis compostos, outros isolados cujo DNA amplificou apenas com um dos *primers* utilizados gerando, portanto, apenas perfil RAPD individual (Tab. 5), também foram encontrados neste local. Esses resultados são preocupantes, tendo em vista que por esse equipamento escoa a produção diária dessa indústria e, a constatação de diversidade de isolados de *L. monocytogenes* nesse equipamento, demonstra a recontaminação deste sítio.

O perfil composto 18P foi encontrado apenas em duas amostras procedentes do comércio local, contudo, cabe destacar que as amostras foram obtidas em

coletas diferentes (terceira e quarta coleta), e que uma delas foi proveniente de um abatedouro de outra região do Rio Grande do Sul. Como as amostras foram de frango resfriado e, em alguns casos, comercializadas a granel, existe a possibilidade de contaminação cruzada no ponto de vendas, ou que estes isolados apresentem distribuição geográfica mais ampla. Miettinen et al. (2001), também encontraram isolados de *L. monocytogenes* com mesmo perfil genético em cortes de frangos provenientes de diferentes indústrias, e atribuem esse resultado à possibilidade de contaminação cruzada em nível de comércio, ou ainda, que ambos os abatedouros possuam o mesmo perfil bacteriano em suas linhas de processamento. Nesse mesmo sentido, Silva et al. (2001), investigando o polimorfismo genético de isolados de *L. monocytogenes* oriundos de queijos, relatam que, apesar desses serem provenientes de distintas plantas de processamento, a presença de isolados com o mesmo perfil genético, pode indicar sua difusão nos estabelecimentos, ou então, a contaminação pós-processo.

A avaliação do índice discriminatório obtido pela subtipificação dos isolados de *L. monocytogenes* através da técnica RAPD foi  $D=0,97$ . Entretanto, a utilização dos *primers* isoladamente também apresentou bom poder discriminatório, haja vista que com o *primer* UBC 155 obteve-se  $D=0,94$ , e com o *primer* UBC 127,  $D=0,91$  e, de acordo com Hunter & Gaston (1988), um índice superior a  $D=0,90$  é necessário para que haja boa diferenciação entre isolados. Além disso, a utilização conjunta das técnicas sorológica e molecular aumentou a capacidade de discriminação entre os isolados, obtendo-se  $D=0,99$ .

Cabrita et al. (2004), analisando o perfil genético de *L. monocytogenes* isoladas de alimentos, com os *primers* UBC 127, 155 e 156, encontraram poder discriminatório de 0,86, 0,74 e 0,89, respectivamente. Entretanto, quando esses iniciadores foram avaliados em conjunto, este índice subiu para 0,91. Como se pode perceber, os índices discriminatórios alcançados neste estudo são superiores aos encontrados por aqueles autores, os quais relatam que a técnica RAPD provou ser muito discriminatória, pois permitiu a diferenciação entre sorotipos.

Já Byun, Jung & Yoo (2001), utilizando RAPD com os iniciadores PB1, PB4 e HLWL74, obtiveram índices de discriminação de 0,79, 0,74 e 0,72, respectivamente, os quais, passaram para 0,98, quando foram avaliados em conjunto. Mesmo índice foi obtido por Yoshida et al. (1999), ao trabalhar com quatro iniciadores (UBC 127, D87, MMT1 e CTM4).

Tabela 5 – Perfis RAPD de 81 isolados de *L. monocytogenes* provenientes da cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul

Origem do isolado	Número do isolado	Sorotipo	Perfis RAPD		
			UBC 155	UBC 127	Composto
Escovas depenagem (1C*)	1-3	4b	1	A	1A
	4	4b	2	A	2A
	5,6	4b	3	B	3B
	7	4b	3	B	3B
Mesa separação de miúdos – antes do processamento (1C)	8	4b	2	B	2B
	9	4b	4	C	4C
	10	4b	2	D	2D
	11	4b	5	D	5D
	12	4b	6	E	6E
Mesa de transpasse (2C)	13	1/2b	6	F	6F
	14	1/2b	5	G	5G
	15	1/2b	6	G	6G
	16	1/2b	5	-**	-
	17, 18	1/2b	7	H	7H
Piso da sala de evisceração (3C)	19, 20	1/2b	8	I	8I
Água de lavagem pré-resfriamento – início do processamento (3C)	21,23	1/2b	8	I	8I
	22	1/2b	5	-	-
	25	1/2b	2	-	-
Água de lavagem resfriamento- final do processamento (3C)	26	1/2b	2	-	-
	27	1/2b	5	-	-
	28	1/2b	9	J	9J
	29	-	-	-	-
	30	1/2b	10	A	10A
	31	1/2b	-	K	-
Esteira –antes processamento (3C)	32	1/2b	-	J	-
Esteira – final processamento (3C)	33, 34	1/2b	10	J	10J
	35	1/2b	-	J	-
	36	1/2b	10	-	-
	37	1/2b	-	J	-
	38	1/2b	10	L	10L
Produto Final - Início processamento (3C)	39	1/2b	10	L	10L
	40	1/2b	10	J	10J
	41	1/2b	-	J	-
	42	1/2b	11	L	11L
	44	1/2b	12	-	-
Água de lavagem evisceração – final processamento (4C)	45	1/2b	12	M	12M

\*número da coleta

\*\*não amplificação

Continuação da Tabela 5 – Perfis RAPD dos 81 isolados de *L. monocytogenes* provenientes da cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul

Origem do isolado	Número do isolado	Sorotipo	Perfis RAPD		
			UBC 155	UBC 127	Composto
Piso da sala de evisceração (4C*)	46, 47, 48	1/2b	13	J	13J
	49, 50	1/2b	13	-**	-
Esteira – antes processamento (4C)	52	1/2b	14	-	-
Esteira – final processamento (4C)	53	1/2b	14	-	-
	54	1/2b	12	N	12N
Produto final – final do processamento	55	1/2b	15	O	15O
	56	1/2b	5	O	5O
Swabs cloacais	57	4e	5	-	-
	58, 59	4e	15	-	-
Frangos do comércio (2C)	60	1/2a	5	-	-
Frangos do comércio (3C)	61	1/2a	16	P	16P
	62, 63	1/2a	17	P	17P
		64	1/2b	17	P
	65	1/2b	18	P	18P
	66	1/2a	19	-	-
Frangos do comércio (4C)	67	1/2c	19	P	19P
	68	1/2c	19	-	-
	69	1/2c	19	P	19P
	70	1/2a	19	P	19P
	71	1/2a	20	-	-
	72, 73	1/2b	18	P	18P
	74	1/2a	18	Q	18Q
75	-	-	-	-	
Frangos do comércio (5C)	76	1/2b	18	-	-
	77	1/2a	5	R	5R
	78, 79	1/2b	5	R	5R
	80	-	-	-	-
	81	1/2b	21	-	-

\*número da coleta

\*\*não amplificação

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam que há dispersão de *Listeria* spp. e de *L. monocytogenes* desde os estabelecimentos avícolas até os pontos de venda do produto final, uma vez que isolados com o mesmo perfil RAPD foram identificados em todos os pontos da cadeia produtiva. Não obstante, ao longo dos

seis meses de coleta, verificou-se a persistência de alguns isolados e recontaminação de determinados pontos da linha processadora.

É importante destacar que a indústria avaliada é fiscalizada pelo Serviço de Inspeção Federal, entretanto, em função de ser uma planta de processamento adaptada, seu *layout*, favorece a introdução e persistência de determinados microrganismos. Assim sendo, *Listeria monocytogenes* por suas características peculiares e sua natureza ubíqua pode contaminar os equipamentos e o ambiente de processamento. E desta forma, se estabelecer, podendo contaminar o produto final, a menos que medidas efetivas de controle e prevenção desse microrganismo sejam efetuadas a fim de evitar a sua instalação e multiplicação nesses nichos.

## 5 CONCLUSÕES

- I. Há presença de *L. innocua* e de *L. monocytogenes* em estabelecimentos avícolas da região sul do Rio Grande do Sul;
- II. A ocorrência de *Listeria* spp. na planta de abate e processamento de frangos avaliada, bem como nas amostras provenientes do comércio da cidade de Pelotas, é elevada, havendo presença de *L. monocytogenes*;
- III. Há diversidade de sorotipos de *L. monocytogenes* no universo amostrado, entretanto, a ocorrência de isolados dos sorotipos 4b e 1/2b, denotam preocupação do ponto de vista de saúde pública;
- IV. Há dispersão de *L. monocytogenes* e *Listeria* spp. na cadeia produtiva de aves avaliada.

## 6 REFERENCIAS

ALLERBERGER, F. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v.35, p. 183 -189, 2003.

ANTONIOLO, Paulo César. ***Listeria* spp. em ovinos e carcaças ovinas em nível de abatedouro**. 2001. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

ANTONIOLO, P. C., BANDEIRA, F. S., JANTZEN, M. M., DUVAL, E. H., SILVA, W. P. Prevalence of *Listeria* spp. in feces and carcasses at a lamb packing plant in Brazil. **Journal of Food Protection**. v. 66, n. 2, p. 328-330, 2003.

APHA. **Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods**. 4<sup>rd</sup> ed. Washington D.C.: American Public Health Association, 2001.

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

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

AUTIO, T.; LUDÉN, J.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; BJÖRKROTH, J.; SJÖBERG, A.; KORKEALA, H. Similar *Listeria monocytogenes* pulsed-field detected in several foods originating from different sources. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 83 - 93, 2002.

AUTIO, T. **Tracing the sources of *listeria monocytogenes* contamination and listeriosis using molecular tools**. Dissertation. Department of Food and Environmental Hygiene Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland, 2003.

AZEVEDO, I., REGALO, M. MENA, C., ALMEIDA, G., CARNEIRO, L., TEIXEIRA, P., HOGG, T., GIBBS, P. A. Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal. **Food Control**. v.16, p. 121-124, 2005.

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

BAZACO, M. **Quantitative Recovery of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* from Environmental Sampling Media**. Thesis of Master of Science. Food Science and Technology. Virginia, 2004.

BELL, C., KYRIAKIDES, A. ***Listeria* – Una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos**. Zaragoza (España): Acribia S.A. 1998. 173p.

BOERLIN, P., BANNERMAN, E., ISCHER, F., ROCOURT, J., BILLE, J. Typing *Listeria monocytogenes*: a comparison of amplification of polymorphic DNA with 5 other methods. **Res. Microbiol**. v.146, p.35-49, 1995.

BRASIL. Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), Portaria Ministerial nº 193 de 19 de setembro de 1994. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta>> Acesso em: 11 out. 2006.

BRASIL. Portaria nº 126, de 03 de novembro de 1995. Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico das Salmoneloses Aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium*). Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta>> Acesso em: 11 out. 2006.

BRUHN, J. B., VOGEL, B. F., GRAM, L. Bias in the *Listeria monocytogenes* enrichment procedure: lineage 2 strains in University of Vermont selective enrichments. **Applied Environmental Microbiology**. v. 71, p. 961-967, 2005.

BYUN, S-K., JUNG, S. C., YOO, H. S. Random amplification of polymorphic DNA typing of *Listeria monocytogenes* isolated from meat. **International Journal of Food Microbiology**. n.69, p. 227-235, 2001.

CABRITA, P., CORREIA, S., FERREIRA-DIAS, S., BRITO, L. Genetic characterization of *Listeria monocytogenes* food isolates and pathogenic potential within serovars 1/2a and 1/2b. **System. Applied Microbiol**. n. 27, p. 454-461, 2004.

CDC. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Listeriosis. Division of bacterial and mycotic disease. October, 2005. Disponível em: <[http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/listeriosis\\_g.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/listeriosis_g.htm)> Acesso em: 21 jan. 2006.

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

CURIALE, M. S., LEWUS, C. M. Detection of *Listeria monocytogenes* in samples containing *Listeria innocua*. **Journal of Food Protection**. v. 57, p. 1048-1051, 1994.

CZUPRYNSKI, C. J., FAITH, N. G. STEINBERG, H. Ability of the *Listeria monocytogenes* strain Scott A to cause systematic infection in mice infected by the intragastric route. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, n.6, p. 2893-2900, 2002.

DESTRO, Maria Teresa. ***Listeria monocytogenes* em camarão (*Penaeus brasiliensis*): marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação em uma unidade processadora de pescado**. 1995. 142f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DUSSURGET, O., PIZARRO-CERDA, J., COSSART, P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. **Annual Review of Microbiology**. v. 58, p. 587-610, 2004.

EKLUND, M. W., POYSKY, F. T., PARANJPYE, R. N., LASHBROOK, L. C., PETERSON, M. E., PELROY, G. A., Incidence and sources of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked fishery products and processing plants. **Journal of Food Protection**. v.58, p. 502-508, 1995.

ERTAS, H. B., SEKER, E. Isolation of *Listeria monocytogenes* from fish intestines and RAPD analysis. **Turk. J. Vet. Anim.Sci**. v. 29, p. 1007-1011, 2005.

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

FARBER, J.M.; WARBURTON, D.W.; BABIUK, T. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. **Government of Canada - HPB Method**, Quebec (Canada): Polyscience Publications, Sep. 1994.

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

FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3<sup>a</sup> ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998, 220p.

FOLEY, D. M., TRIMBOLI, S. L., LAMB, J., GOGLEY, J., THOMPSON, J., CAPORASO, F., CALICCHIA, M., PRAKASH, A. Acid-adaptation does not increase the resistance of *Listeria monocytogenes* to irradiation in a seafood salad. **International Journal of Food Microbiology**. v. 99, p. 147-156, 2005.

GAHAN C. G. M. & HILL, C. Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* fection. **Journal of Applied Microbiology**. v. 98, p. 1345-1353, 2005.

GASANOV, U., HUGHES, D., HANSBRO, P. M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Reviews**. In press, 2005.

GOMBAS, D. E., CHEN, Y., CLAVERO, R. S., SCOTT, V. N. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 4, p. 559 – 569, 2003.

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

GUDBJORNSDOTTIR, S., GUDBJORNSDOTTIR, B., LAUZON, H. L., EINARSSON, H., KRISTINSSON, K. G., KRISTJANSSON, M. Tracing *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon and its processing environment in Iceland using pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**. v. 101, p. 41-45, 2005.

GUÐMUNDSDÓTTIR, S., GUÐBJORNSDÓTTIR, B., LAUZON, H. L., EINARSSON, H., KRISTINSSON, K. G., KRISTJANSSON, M. Tracing *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon and its processing environment in Iceland using pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**. In press, 2004.

ICMSF. *Listeria monocytogenes*. In: **Microrganisms in foods 5: microbiological specification of food pathogens**. London: Chapman & Hall. p.141-182, 1996.

ILSI RESEARCH FOUNDATION/RISK SCIENCE INSTITUTE, EXPERT PANEL ON *Listeria monocytogenes* IN FOODS. Achieving Continuous Improvement in Reductions in Foodborne Listeriosis – A Risk-Based Approach. **Journal of Food Protection**. v. 68, n. 9, p. 1932-1994, 2005.

INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. **Bacteria Associated With Foodborne Diseases**. Scientific Status Summary. August, 2004.

IVANEK, R. GROHN, Y. T., WIEDMANN. *Listeria monocytogenes* in multiple habitats and host populations: review of available data for mathematical modeling. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 3, n. 4, p. 319-336, 2006.

JACQUET, C.; GOUIN, E.; JEANNEL, D.; COSSART, P.; ROCOURT, J. Expression of ActA, Ami, InlB, and Listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of Human and Food Origin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 616 – 622, 2002.

JARADAT, Z. W. & BHUNIA, A. K. Adhesion, invasion and translocation characteristics of *Listeria monocytogenes* serotypes in Caco-2 cell and mouse models. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3640-3645, 2003.

JAY, J. M. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. **Food Control**. v. 7, n. 4/5, p. 209-214, 1996.

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.

JOHANSSON, T., RANTALA, L., PALMU, L., HONKANEN-BUZALSKI, T. Occurrence and typing of *Listeria monocytogenes* strains in retail vacuum-packed fish products and in a production plant. **International Journal of Food Microbiology**. v.47, p. 111-119, 1999.

HARDY, J., FRANCIS, K. P., DE BOER, M. CHU, P., GIBBS, K., CONTAG, C.H. Extracellular replication of *Listeria monocytogenes* in the murine gall bladder. **Science**. v. 303, p. 851-853, 2004.

HEIR, E., LINDSTEDT, B-A., RØTTERUD, O-J, TRAUTE VARDUND, KAPPERUD, G., NESBAKKEN, T. Molecular epidemiology and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* from meat processing plants and human infections. **International Journal of Food Microbiology**. v. 96, p. 85– 96, 2004.

HOF, H. History and epidemiology of listeriosis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v.35, n. 3, p. 199-202, 2003.

HOFER, E., NASCIMENTO, R. S., OLIVEIRA, M. A. Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 31, n. 2, p. 173-177, mar-abr, 1998.

HOFER, E., REIS, C. M. F. Espécies e sorovares de *Listeria* isolados de animais doentes e portadores no Brasil. **Pesq. Vet. Bras**. v.25, n. 2, p. 79-83, abr/jun, 2005.

HOLT, J. G. *et al.* **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

HUME, M. E., BYRD, J. A, STANKER, L. H., ZIPRIN, R. L. Reduction of caecal *Listeria monocytogenes* in Leghorn chicks following treatment with a competitive exclusion culture (PREEMPT™). **Letters in Applied Microbiology**. v. 26, p. 432-436, 1998.

HUNTER, P. R. GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 26, n. 11, p. 2465 – 2466, 1998.

HUSS, H. H., JORGENSEN, L. V., VOGEL, B. F. Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods. **International Journal of Food Microbiology**. v. 62, p. 267-274, 2000.

KWAK W.S., HUH J.W., McCASKEY T.A. Effect of processing time on enteric bacteria survival and on temperature and chemical composition of broiler poultry litter processed by two methods. **Bioresource Technology**. v. 14, n. 96, p.1529-1536, 2005.

- LAER, A. E., LIMA, A. S., TRINDADE, P. S., SILVA, W. P., Monitoramento de *Listeria monocytogenes* em planta de processamento de lingüiça mista frescal localizada em Pelotas (RS). **Revista Brasileira de Vigilância Sanitária**. v. 1, n. 3, 2005.
- LAMMERGING, A. M., GLASS, K. A., GENDRON-FITZPATRICK, A., DOYLE, M. P. Determination of virulence of different strains of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by oral inoculation of pregnant mice. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 3991-4000, 1992.
- LAWRENCE L. M. & GILMOUR, A. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from poultry products and from the poultry-processing environmental by random amplification of polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, n. 6, p. 2139-2144, 1995.
- LAWRENCE L. M. & GILMOUR, A. Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environmental and in a poultry products and their rapid confirmation by multiplex PCR. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 60, p. 4600-4604, 1994.
- LIMA, Andréia Saldanha. **Disseminação de *Listeria monocytogenes* no processamento de lingüiça mista frescal avaliada por sorologia e RAPD**. 2004. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- LIANOU, A., STOPFORTH, J. D., YOON, Y., WIEDMANN, M., SOFOS, J. Growth and stress resistance variation in culture broth among *Listeria monocytogenes* strains of various serotypes and origins. **Journal of Food Protection**. v. 69, n. 11, p. 2640-2647, 2006.
- LOUIE, M., JAYARATNE, P., LUCHSINGER, I., DEVENISH, J., YAO, J., SCHLECH, W., SIMOR, A. Comparison of ribotyping, arbitrarily primed PCR, and Pulsed-field gel electrophoresis for typing of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 15 – 19, 1996.
- LOW, J., C., DONACHIE, W. A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. **The Veterinary Journal**. v. 153, p. 9-29, 1997.
- LUKINMAA, S., MIETTINEN, A., NAKARI, U.-M., KORKEALA, H., SIITONEN, A., *Listeria monocytogenes* isolates from invasive infections: variation of sero and genotypes during 11-year period in Finland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1694 – 1700, 2003.
- LUNDÉN, JANNE. **Persistent *Listeria monocytogenes* contamination in food processing plants**. 2004. 68p. Department of Food and Environmental Hygiene Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki, Finland.
- MARSH, E. J., LUO, H., WANG, H. A three-tiered approach to differentiate *Listeria monocytogenes* biofilm-forming abilities. **FEMS Microbiology Letters**. p. 1 – 8, 2003.

MARTINEZ, I., RORVIK, L-M., BROX, V., LASSEN, J., SEPPOLA, M., GRAM, L., FONNESBECH, B. Genetic variability among isolates of *Listeria monocytogenes* from food products, clinical samples and processing environments, estimated by RAPD typing. **International Journal of Food Microbiology**. v. 84, p. 285-297, 2003.

McLAUCHLIN, J. Distribution of serovars of *Listeria monocytogenes* isolated from different categories of patients with listeriose. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease**, v. 9, p. 210 – 213, 1990.

McWARD, G.W.; TAYLOR D.R. Acidified clay litter amendment. **Journal Applied Poultry Research**. v. 9, p. 518-529, 2000.

MEAD, P. S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., McCAIG, L. F., BRESEE, J. S., SHAPIRO, C., GRIFFIN, P. M., TAUXE, R. V. Food-Related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**. v. 5, n. 5, p. 607-625, 1999.

MEDEIROS, D., FARBER, J. M. A single-step polymerase chain reaction for combined gene detection and epidemiological typing of *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**. v.18, p. 375-386, 2001.

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

MURPHY, R. Y., DUNCAN, L. K., DRISCOLL, K. H., MARCY, J. A., BEARD, B. L. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat turkey breast meat products during postcook in-package pasteurization with hot water. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 9, p. 1618 – 1622, 2003.

NAIR, M. K. M., VASUDEVAN, P., VENKITANARAYANAN, K. Antibacterial effect of black seed oil on *Listeria monocytogenes*. **Food Control**. v.16, p. 395-398, 2005.

NAKAMA, A., TERAO, M., KOKUBO, Y., ITOH, T., MARUYAMA, T., KANEUCHI, C., McLAUCHLIN, J. A comparison of *Listeria monocytogenes* serovar 4b isolates of clinical and food origin in Japan by pulsed-fields gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, p. 201 – 206, 1998.

OJENIYI, B., WEGENER, H.C., JENSEN, N.E., BISGAARD, M., *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products: especially useful as a screening tool. epidemiological investigations in seven Danish abattoirs. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 80, p. 395–401, 1996.

OLIVEIRA, M.C.; ALMEIDA, C.V.; ANDRADE, D.O.; RODRIGUES S.M.M. Teor de matéria seca, pH e amônia volatilizada da cama de frango tratada ou não com diferentes aditivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 4, n.32, p. 824-829, 2003.

PETERSEN, L., MADSEN, M. *Listeria* spp. in broiler flocks: recovery rates and species distribution investigated by conventional culture and the EiaFoss method. **International Journal of Food Microbiology**. v.58, p.113–116, 2000.

PERRIN, M., BEMER, M., DELAMARE, C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**.v. 41, n. 11, p. 5308-5309, 2003.

QUESSY, S., MESSIER, S. Prevalence of *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *Listeria* spp. in ring-billed gulls (*Larus delawarensis*). **Journal of Wildlife Diseases**. v.28, p. 526-531, 1992.

RYSER, E. T., MARTH, E. H. **Listeria, listeriosis, and food safety**. New York: Marcel Dekker, 1999. 738p.

ROCOURT, J., WEHMEYER, U., STACKEBRANDT, E. Transfer of *Listeria denitrificans* to a new genus, *Jonesia* gen. nov., as *Jonesia denitrificans* comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. n.37, p. 266-270, 1987.

ROCOURT, J., BOERLIN, P., GRIMONT, F., JACQUET C., PIFFARETTI, JC. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 42, p.171-174, 1992.

ROCOURT, J., COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. In: Doyle, M. P, Beucaht, L. R., Montville, T. J. eds. **Food Microbiology Fundamental and Frontiers**. Washington: ASM Press, p. 337-352, 1997.

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

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

SCHMID, M. W., NG, E. Y. W., LAMPIDIS, R., EMMERTH, M., WALCHER, M., KREFT, J., GOEBEL, W., WAGNER, M. AND SCHLEIFER, K-H. Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 28, p. 1 – 18, 2005.

SEELIGER, H. P. R. & JONES, D. Genus *Listeria*. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E. **Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology**. 9<sup>a</sup> ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1986.

SILVA, M. C. D., DESTRO, M. T., HOFER, E., TIBANA, A. Characterization and evaluation of some virulence markers of *Listeria monocytogenes* strains isolated from Brazilian cheeses using molecular, biochemical and serotyping techniques. **International Journal of Food Microbiology**. v.63, p. 275-280, 2001.

SILVA, Wladimir Padilha. **Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite de vacas com mastite subclínica e de outras fontes em propriedades produtoras de leite**. 1998. 95f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SCIENTIFIC COMMITTEE ON VETERINARY MEASURES RELATING TO PUBLIC HEALTH ON *Listeria monocytogenes*. Brussels, Belgium: **European Commission**. Health and Consumer Protection Directorate-General. 1999.

THÉVENOT, D., DELIGNETTE-MULLER, M., CHRISTIEANS, S., LEROY, S., KODJO, A., VERNZOY-ROZAND, C. Serological and molecular ecology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from 13 french pork meat salting-curing plants and their products. **International Journal of Food Microbiology**. v. 112, p. 153-161, 2006.

TRABULSI, L. R. & ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. Editora Atheneu. 2004.

UHITIL, S., JAKSIC, S., PETRAK, T., MEDIC, H., GUMHALTER-KAROLYI, L. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and the other *Listeria* spp. In cakes in Croatia. **Food Control**, v. 15, n. 3, p.213 – 216, 2004.

UNNERSTAD, H. ***Listeria monocytogenes* – strain diversity demonstrated by genotyping**. 2001. Tese. Universidade de Ciências da Agricultura, Upsala, Suécia. Disponível em: <http://diss-epsilon.slu.se/archive/>

VASQUEZ-BOLAND, J.A., KUHN, M., BERCHE, P., CHAKRABORTY, T., DORNINIQUEZ-BERNAL, G., GOEBEL, W., GONZALEZ-ZORN, B., WEHLAND, J., AND KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology**. Rev. v.14, p. 584-640, 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**. v. 90, p. 349-356, 2004.

VOGEL, B. F., HUSS, H. H., OJENIYI, B., AHRENS, P., GRAM, L. Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, n. 6, p. 2586-2595, 2001a.

VOGEL, B. F., JORGENSEN, L. V., OENIYI, B., HUSS, H. H., GRAM, L. Diversity of *L. monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon produced in different smokehouses as assessed by Random Amplified Polymorphic DNA analyses. **International Journal of Food Microbiology**. v.65, p. 83-92, 2001b.

WALLS, I., BUCHANAN, R. L. Use of food objectives as a tool for reducing foodborne listeriosis. **Food Control**. (article in press), 2005.

WILLIAMS, J. G., KUBERLINK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, L. A., TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**. v.18, p. 6531-6535, 1990.

YOKOYAMA, E., MARUYAMA, S., KATSUBE, Y. Production of bacteriocin-like-substance by *Listeria innocua* against *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 40, p. 133-137, 1998.

YOSHIDA, T., TAKEUCHI, M., SATO, M., HIRAI, K. Typing *Listeria monocytogenes* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. **J. Vet. Med. Sci.** v. 67, n. 7, p. 857-860, 1999.

ZAHA, A., FERREIRA, H. B., PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia molecular básica.** 3<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 424p. 2003.

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