



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E  
SOROTIPIFICAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* E  
*Listeria innocua* ISOLADAS EM MATADOURO -  
FRIGORÍFICO DE SUÍNOS DA REGIÃO DAS MISSÕES -  
RS**

**LIZIANE SCHITTLER**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Pelotas, sob a  
orientação do Prof. Dr. Wladimir  
Padilha da Silva, como requisito parcial  
do Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia Agroindustrial, à  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências (M.S.).

PELOTAS  
Rio Grande do Sul - Brasil  
Maio de 2005

Schittler, Liziane

S329c Caracterização molecular e sorotipificação de *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* isoladas em matadouro - frigorífico de suínos da região das Missões – RS / Liziane Schittler. – 2005.  
f.

**Bibliografia**

Orientador: Wladimir Padilha da Silva.

Co-orientador: Eduardo César Tondo.

Dissertação (mestrado) –Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2005.

1. *Listeria monocytogenes*. 2. Sorologia. 3. Suíno. 4. *Listeria innocua*. I. Silva, Wladimir Padilha da. II. Tondo, Eduardo César. III. Título.

CDD 576.163

Catálogo-na-Publicação (CIP) elaborada por Tarcila Peruzzo CRB 14-1027

LIZIANE SCHITTLER

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E  
SOROTIPIFICAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* E  
*Listeria innocua* ISOLADAS EM MATADOURO -  
FRIGORÍFICO DE SUÍNOS DA REGIÃO DAS MISSÕES -  
RS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Pelotas, sob a  
orientação do Prof. Dr. Wladimir  
Padilha da Silva, como requisito parcial  
do Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia Agroindustrial, à  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências (M.S.).

Equipe de orientação:

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva,  
Co - orientador Prof. Dr. Eduardo César Tondo - UFRGS

APROVADA: 15 de maio de 2005

Prof. Dr. Celso Medina Fagundes

Prof. Dr. Pedro Luiz Antunes

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, por tudo.

Aos meus pais pela vida, pelo amor, pelo exemplo de garra e família.

Ao meu esposo e filha, pelo incentivo, paciência e amor, incríveis e indispensáveis para a conclusão desta etapa.

Aos meus irmãos, Daniela, Michele e Guilherme, que estando perto ou longe, sempre estiveram presentes, mesmo que apenas em pensamento.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

À Universidade Regional do Noroeste do Estado do RS pela confiança e apoio.

Ao Instituto Oswaldo Cruz ( FIOCRUZ), em especial ao Dr. Ernesto Holfer, do Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Bacteriologia , pela sorotipificação das linhagens.

Ao Professor Wladimir Padilha da Silva pela valiosa orientação, confiança e amizade durante o curso e execução do trabalho.

Ao Professor Eduardo César Tondo pelo incentivo, Co-orientação, amizade e ensinamentos transmitidos.

Ao estagiário Carlos Henrique Pagno pela dedicação e amizade.

Aos funcionários, estagiários e grandes amigos dos Laboratórios do Núcleo de Alimentos da UNIJUÍ - Campus Santa Rosa, Gislaine, Vanessa Schley, Vanessa Pieniz, Leidi, Fabiane, Franciele , Marga e Graciele pelo apoio.

Aos amigos Andréia Saldanha de Lima e Fernando Zocche, pela ajuda, amizade, incentivo.

As amigas que nunca esquecerei Cristina e Silvana, pelo apoio e carinho.

Aos amigos da MICROBIAL, Ana, Márcia, Elen, Rodrigo, Cátia, incentivo e auxílio em todos os momentos.

As minhas amigas Vera e Ângela, pelo incentivo e apoio.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, pelo apoio, em especial aos professores Germano, Ferri, Celso, Álvaro e Manoel, pela amizade e incentivo.

Ao colega Márcio, do Laboratório de Biologia Molecular, pelo apoio técnico e amizade.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

# ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	iii
ÍNDICE .....	v
LISTA DE TABELAS .....	vii
LISTAS DE FIGURAS .....	ix
SUMÁRIO.....	x
SUMMARY .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	3
2.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	4
2.3 Listeriose .....	5
2.4 <i>L. monocytogenes</i> e sua relação com a indústria de alimentos.....	7
2.5 Ocorrência de infecções alimentares por <i>L. monocytogenes</i> .....	8
2.6 Detecção.....	10
2.7 Utilização de biologia molecular para subtipificação de <i>L. monocytogenes</i> .....	10
2.8 Sorotipificação .....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1 Descrição do estabelecimento estudado .....	15
3.2 Amostragem .....	15
3.2.1 Amostra de água.....	16
3.2.2 Amostras das câmaras frias.....	16
3.2.3 Amostras superficiais das carcaças .....	16
3.2.4 Amostras das facas.....	17
3.2.5 Amostras de conteúdo cecal (fezes) .....	17
3.2.6 Amostras das mãos dos operadores.....	17
3.2.7 Amostras dos ralos.....	18
3.3 Isolamento e identificação de <i>Listeria</i> spp. ....	18
3.3.1 Enriquecimento seletivo .....	18
3.3.2 Enriquecimento secundário.....	18
3.3.3 Isolamento.....	19

3.3.4 Seleção e purificação das colônias suspeitas de <i>Listeria</i> spp .....	19
3.3.5 Identificação bioquímica de <i>Listeria</i> spp.....	19
3.4 Sorotipificação das linhagens de <i>Listeria</i> spp. ....	21
3.5 Análise do polimorfismo do DNA por amplificação aleatória (RAPD) ..	21
3.5.1 Preparo das células.....	21
3.5.2 RAPD .....	22
3.6 Análise dos Resultados .....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 Ocorrência de <i>Listeria</i> spp. ....	23
4.2 Sorotipificação de <i>Listeria</i> spp. ....	27
4.3 Caracterização molecular por RAPD das linhagens de <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> e <i>L. innocua</i> .....	29
5. CONCLUSÕES .....	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Características fenotípicas empregadas para diferenciação de <i>Listeria</i> spp	20
Tabela 2 – Ocorrência de <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Listeria innocua</i> em 105 amostras obtidas de um frigorífico de suínos, localizado na Região das Missões-RS	23
Tabela 3 – – Freqüência de <i>Listeria innocua</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> no ambiente, utensílios, manipuladores e em carcaças de um frigorífico de suínos da região das Missões - RS	24
Tabela 4 - Freqüência, número, percentagem e sorologia de <i>Listeria innocua</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> . coletadas em um frigorífico de suínos na região das Missões-RS	28
Tabela 5 – Perfis genéticos das linhagens de <i>Listeria innocua</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> isoladas em um frigorífico de suínos, localizado na região das Missões -RS	32

Tabela 6 – Distribuição das 20 linhagens de *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* em uma linha de abate de um frigorífico de suíno, localizado na região das Missões – RS, conforme o resultado de sorologia e RAPD 33

Tabela 7 – Distribuição por amostra e por coleta dos perfis gerados por RAPD de linhagens de *L. monocytogenes* e *L. innocua* coletadas em um frigorífico de suínos localizado na região das Missões – RS 34

## LISTAS DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1: Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% : padrões de bandas dos perfis sendo que a 01 de <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Listeria innocua</i> as identificadas como 10, 02, 03, 04 de, obtidos com o <i>primer</i> UBC 155; (M) Marcador de peso molecular Ladder 100pb	30
FIGURA 2: Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% : padrões de bandas dos perfis sendo que I é de <i>Listeria monocytogenes</i> e as B, A, E , F são de <i>Listeria innocua</i> , obtidos com o <i>primer</i> UBC 127; (M) Marcador de peso molecular Ladder 100pb	31

## SUMÁRIO

SCHITTLER, Liziane. M.S. Universidade Federal de Pelotas. Maio de 2005. Ocorrência e caracterização molecular e sorotipificação de *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* isoladas em um frigorífico de suínos da Região das Missões – RS. Orientador: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva. Co-orientador: Prof. Eduardo César Tondo.

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria amplamente distribuída na natureza, apresenta alta capacidade de colonizar superfícies e de formar biofilmes em plantas de processamentos de alimentos. Destaca-se dentre os mais importantes microrganismos causadores de infecções alimentares, por ser agente da listeriose, doença grave que pode levar a aborto, problemas neurológicos e distúrbios gastrintestinais, sendo a carne importante veículo de transmissão dessa doença à humanos. O objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência e caracterizar *L. monocytogenes* e *Listeria innocua* em uma linha de abate de um matadouro-frigorífico de suínos situado na Região das Missões, RS. *Listeria* spp. foi avaliada na água, câmaras frias, carcaças, facas, fezes, mãos de manipuladores e ralos, e as linhagens isoladas foram submetidas a sorotipificação e a tipificação molecular através da análise do polimorfismo do DNA por amplificação aleatória (RAPD) com os primers UBC 155 e UBC 127. A ocorrência de *L. monocytogenes* foi de 0,95%, e de *L. innocua*, 18,1%, em 105 amostras analisadas, sendo as câmaras frias o ponto de maior isolamento. A maior parte das linhagens de *L. innocua* foi não tipificável, e daquelas

sorotificáveis, os sorovares 6a e 6b foram os prevalentes. Somente uma linhagem de *L. monocytogenes* foi isolada, a partir de um ralo, e pertencia ao sorovar 4b. O RAPD gerou 15 perfis genéticos combinados. Há contaminação por *L. monocytogenes* e *L. innocua* no frigorífico avaliado, sendo a contaminação cruzada importante nessa indústria, tendo em vista que algumas linhagens de *L. innocua* são persistentes no local.

## SUMMARY

SCHITTLER, Liziane. MS. *Universidade Federal de Pelotas* (Federal University of Pelotas). Maio, 2005. Occurrence and molecular characterization and sorotipificação of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* isolated in one swine frigorific from the Missions Region - RS. Adviser: Dr. Wladimir Padilha da Silva.

*Listeria monocytogenes* is bacterium widely distributed in nature which presents high capacity to colonize surfaces and form biofilms in food processing plants. It distinguishes itself among the most important and dangerous microorganisms that cause food-borne diseases, such as listeriosis, a serious disease that causes abortion, neurological and gastrointestinal disorders, being the meat its main vehicle for transmission to humans. The aim of the present paper was to investigate the occurrence and molecular characterization and sorotipificação of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* isolated in one swine frigorific from the Missions Region – RS. *Listerias* spp. was evaluated in water, cold chambers, carcasses, knives, faeces, hands and drains and the strains obtained went through serotyping and molecular typing through the analysis by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) with UBC 155 e UBC 127 primers. The occurrence of *L. monocytogenes* was of 0,95% and of *L. innocua*, 18,1%, in 105 samples assayed, being the cold chambers the major point of isolation. Most of the *L. innocua* strains were not serotypable and, from those serotypable, the serovars 6a and 6b were prevalent. Only one *L.*

*monocytogenes* strain was isolated, from a drain, and it belonged to serovar 4b. RAPD produced 15 genetic combined profiles. There is contamination by *L. monocytogenes* e *L. innocu* in the swine frigorific, and this cross contamination in this plant is considered important, since some *L. innocua* strains persist in the local.

# 1. INTRODUÇÃO

*Listeria monocytogenes* é um patógeno transmitido por alimentos, de grande importância para a saúde pública, uma vez que pode causar uma das mais severas infecções alimentares, que é a listeriose.

No Japão, se estima uma incidência anual de 0,65 casos de listeriose por um milhão de habitantes, enquanto na Europa, há uma estimativa de 1 a 15 casos por milhão de habitantes (Okutani *et. al.*, 2004). De acordo com o CDC (Center for Disease Control and Prevention), em Atlanta (EUA), houve a notificação de 696 casos de listeriose no ano de 2003. No Brasil, ainda não há informação exata da incidência de listeriose em humanos, entretanto, diversos trabalhos recentes relatam a presença da *L. monocytogenes* em diferentes alimentos (Lima, 2004; von Laer, 2004; Antoniollo *et al.*, 2003).

Dentre os alimentos cuja presença de *L. monocytogenes* tem sido relatada, destacam-se a carne e derivados, em parte devido a associação entre esse microrganismo e infecções em animais, os quais, muitas vezes, apresentam-se assintomáticos. Outro aspecto a ser considerado é que outras espécies de *Listeria* também têm sido observadas em animais e, conseqüentemente, em alimentos, e que tais microrganismos têm sido considerados como indicadores da presença de *L. monocytogenes*. Em vista disso, os animais podem disseminar essa bactéria através das fezes ou secreções, contaminando o ambiente ou os alimentos, tanto na propriedade produtora como na indústria de

processamento. Se animais infectados com esse microrganismo são abatidos em matadouro-frigorífico, por exemplo, pode-se esperar que a contaminação se propague durante as operações de processamento, principalmente se o estabelecimento operar sem condições higiênicas adequadas.

Dentro de matadouros-frigoríficos ou de indústrias de processamento, *L. monocytogenes* pode colonizar superfícies de equipamentos e utensílios e formar biofilmes, tornando-se endêmica no ambiente e aumentando, dessa forma, a probabilidade de contaminar a linha de produção e os alimentos ali produzidos. Além disso, esse microrganismo apresenta a capacidade de multiplicação sob temperaturas de refrigeração, sendo possível, portanto, o seu desenvolvimento em câmaras frias ou ao longo da cadeia de frio, na qual a carne é comumente armazenada. (Jay, 2005)

Ainda que a legislação brasileira vigente (RDC nº 12, da ANVISA) não estipule a pesquisa de *L. monocytogenes* em carnes comercializadas no Brasil, na Circular Nº354/2004, o Departamento de Inspeção de Produtos de origem Animal (DIPOA) estabelece diretrizes para prevenção da contaminação com *L. monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo, as quais devem ser consideradas pelos estabelecimentos envolvidos na produção dos alimentos em questão.

Em vista disso, objetivou-se avaliar a ocorrência e caracterizar molecularmente e sorologicamente *L. monocytogenes* e *L. innocua* isoladas em matadouro-frigorífico de suínos localizado na região das Missões-RS.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Listeria* spp.

O gênero *Listeria* foi considerado, durante muitos anos, como monoespecífico, contendo apenas a espécie *Listeria monocytogenes* (Ryser & Marth, 1999).

Atualmente, esse gênero é composto por seis espécies: *Listeria monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivannovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. grayi* (ICMSF, 1998). Com exceção de *L. grayi*, todas as demais são contaminantes de alimentos. As espécies *L. innocua*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri* são consideradas avirulentas. *L. ivannovii* é patogênica para ovinos e caprinos e *L. monocytogenes* prima-se em importância como patógeno para o homem e animais (Trabulsi et al., 1999).

Segundo o Manual de Bergey (Hensyl, 1994), *Listeria* é um bacilo pequeno (0,5 µm de diâmetro e 1-2 µm de comprimento), microaerófilo, anaeróbio facultativo, regular, Gram-positivo, que pode se apresentar em unidades ou em cadeias pequenas. Não forma esporos, produz catalase, mas não oxidase. É móvel a 25°C, com movimento característico de tombamento, e é imóvel a 35°C. A multiplicação ocorre rapidamente na maioria dos meios bacteriológicos utilizados na rotina laboratorial (Ryser & Donnelly, 2001).

As bactérias desse gênero são ubíquas, encontrando-se amplamente distribuídas na natureza, fato que explica a facilidade com que são encontradas em toda a cadeia dos alimentos, desde a produção até alimentos prontos para o consumo (Beuchat, 1996). São comumente encontradas em águas residuárias, rios (Farber & Perterkin, 1991), solo, plantas, particularmente em vegetais em decomposição (Ryser & Marth, 1999) e ambientes úmidos ou secos (Comi et al., 1992). Também podem ser encontradas em várias espécies de mamíferos, tanto domésticos como selvagens, em aves e em algumas espécies de peixes e crustáceos (Uhitil et al., 2004), já tendo sido isoladas em fezes de homens e em insetos (Lim, 1998). É provável que de 1 a 10% da população humana sejam portadores de *L. monocytogenes* no intestino (Forsythe, 2002).

## **2.2 *Listeria monocytogenes***

A descrição dessa espécie ocorreu há mais de 60 anos, quando Murray e seus colaboradores, em 1926, classificaram uma bactéria Gram-positiva, não esporulada, causadora de enfermidades em carneiros e cobaias. Os autores denominaram *Bacterium monocytogenes*, uma vez que esse microrganismo infectava os monócitos (leucócitos) do sangue (Gombas et al., 2003).

As primeiras descrições de infecções em animais e seres humanos por *Listeria monocytogenes* remontam ao final do século XIX (Gray & Killinger, 1966). Desde então, diversas infecções por esse microrganismo têm sido descritas em uma grande variedade de animais, incluindo bovinos, ovinos, aves, roedores, suínos e, também, seres humanos (Farber & Peterkin, 1991).

*L. monocytogenes* é considerada a única espécie de *Listeria* que é patogênica para humanos, enquanto *L. ivanovii* é descrita como causadora ocasional de aborto em animais (Murray et al., 1999).

É uma bactéria ubíqua, que embora não seja esporulada, tem capacidade de se desenvolver em condições nas quais os microrganismos patogênicos, tem dificuldade para se multiplicar. Os limites de temperatura para o crescimento são -0,4°C até 45°C, o pH entre 4,4 e 9,6, com um crescimento ótimo em pH 7,0 (Jay, 2005). Um importante fator coadjuvante é sua

capacidade para multiplicar-se em temperaturas de refrigeração, evidenciando a necessidade de controle mais intenso em alimentos refrigerados (ICMSF, 1998).

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria intracelular facultativa, apresentando como importante fator de patogenicidade sua habilidade em sobreviver e multiplicar-se dentro de células do hospedeiro, bem como em células fagocitárias desse hospedeiro. Em resumo, a bactéria liga-se às células da mucosa intestinal e é, então, absorvida por meio de fagocitose induzida, na qual o microrganismo é engolfado através da formação de pseudópodos, internalizando-se em uma vesícula no interior da célula do hospedeiro. Antes da formação do fagolisossoma, que destruiria o microrganismo, a membrana dessa vesícula é rompida pela listeriolisina O, secretada pela bactéria, liberando-a no citoplasma da célula. No citoplasma celular, *L. monocytogenes* produz enzimas que polimerizam a actina do citoesqueleto celular, facilitando seu deslocamento intracelular, bem como enzimas que destroem a membrana da célula do hospedeiro, promovendo sua disseminação para células adjacentes. Uma vez dentro da nova célula, repete-se o ciclo. Além disso, se a bactéria entrar nos monócitos, macrófagos ou leucócitos polimorfonucleares, pode disseminar-se pela corrente sanguínea, levando à septicemia, podendo chegar ao cérebro e, provavelmente, migrar da placenta para o feto em mulheres grávidas (Forsythe, 2002).

Dados coletados nos Estados Unidos indicam que nos últimos anos está ocorrendo um declínio na incidência de infecções causadas por alguns patógenos como, por exemplo, *Campylobacter* spp. e por alguns sorovares de *Salmonella*. Entretanto, o mesmo estudo mostra que o número de infecções causadas por *Listeria* não tem diminuído significativamente (CDC, 2004).

### **2.3 Listeriose**

A doença listeriose é uma infecção que pode ser transmitida à humanos através de várias vias, entretanto, a via alimentar parece ser a mais preocupante. Ressalta-se que o risco de desenvolver uma infecção por *L. monocytogenes* após a ingestão de um alimento contaminado é baixo para a

população em geral (CDC, 1999), embora possa ocasionalmente ocorrer em indivíduos considerados fora do grupo de risco para a doença (Ryser & Donnelly, 2001). No entanto, é particularmente importante para gestantes, indivíduos com síndrome de imunodeficiência adquirida ou portadores de HIV, com cirrose, carcinoma ou outras doenças que provoquem comprometimento do sistema imunológico (Dhanashree et. al., 2003). Idosos e recém-nascidos também são suscetíveis à listeriose, e enquadrados como indivíduos de alto risco (FDA, 2003).

A listeriose humana pode se manifestar de duas formas: a forma mais grave compromete principalmente o sistema nervoso central, provocando meningite, encefalite, septicemia e abscessos, ou o sistema reprodutivo, provocando aborto no 2º ou 3º trimestre de gestação ou nascimento de feto prematuro; a forma mais branda ocorre em nível gastrointestinal, é autolimitante e não invasiva, caracterizando-se por febre, diarreia, náusea, vômito, dor de cabeça e mialgia, após 12 a 24 horas de ingestão do alimento contaminado (Salamina et al., 1996).

Apesar de *L. monocytogenes* causar uma doença de baixa morbidade (0,3 – 1 caso / 100.000 pessoas / ano) nos Estados Unidos, sua importância está na elevada mortalidade associada a ela (FDA, 2003).

A dose infectante ainda não foi estabelecida, entretanto, informações obtidas a partir de alimentos contaminados com *L. monocytogenes* e envolvidos em surtos, indicam que populações entre  $10^3$ - $10^4$  Unidades Formadoras de Colônia por grama (UFC g<sup>-1</sup>) de alimento foram suficientes para causar a doença (Duffy et al., 1999). Entretanto, estudo realizado na Finlândia indica que a exposição da população de risco a doses baixas (0,3 NMP g<sup>-1</sup>) de *L. monocytogenes*, por períodos prolongados, pode também levar ao desenvolvimento da doença (Maijala et al., 2001).

Dentre os alimentos já envolvidos nos surtos de listeriose, têm-se leite cru e pasteurizado, queijos, carnes bovina, suína, de aves e seus derivados, frutos do mar, além de produtos de origem vegetal, crus ou processados, e refeições preparadas (Franco & Landgraf, 1996; Ryser & Donnelly, 2001).

Embora se saiba que a maioria dos casos de listeriose é devido à infecção por meio de alimentos, observou-se que pessoas que trabalham com animais infectados podem apresentar lesões cutâneas localizadas, e que alguns

laboratoristas têm contraído, acidentalmente, infecções oculares através da manipulação com cultivos de *Listeria* (ICMSF, 1998).

#### **2.4 *L. monocytogenes* e sua relação com a indústria de alimentos**

*L. monocytogenes* não tem causado prejuízos tão somente para a saúde pública. Nos Estados Unidos, vários produtos alimentícios têm sido recolhidos em nível de varejo por apresentarem contaminação por esse patógeno, o que traz grandes impactos econômicos para a indústria responsável. Wong *et al.* (2000) relatam os *recalls*, ou recolhimentos de alimentos, coordenados pela FDA (Food and Drug Administration – U.S.A) resultantes de contaminação biológica, efetuados entre os anos de 1994 e 1998. De um total de 1.328 alimentos recolhidos no período, *L. monocytogenes* foi responsável por 61,2% dos casos, seguido por *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*, representando 10,8% e 5,2% dos recolhimentos, respectivamente.

Os prejuízos desses *recalls* não se restringem apenas aos custos envolvidos no recolhimento e destruição do produto, afetando, também, a credibilidade da marca comercial, podendo comprometer a comercialização futura.

A entrada de *L. monocytogenes* em plantas de processamento de alimentos pode ter origem no solo ou poeira, presentes nas roupas e sapatos dos funcionários, dos equipamentos transportados; de animais que excretam a bactéria ou têm sua pele ou superfície contaminados; e podem ser carreados por humanos saudáveis (Rocourt & Cossart, 1997).

A contaminação de produtos ocorre mais comumente durante o processamento e é freqüente resultar da persistência de linhagens na microbiota da planta processadora de alimentos (Autio *et al.*, 2002; Von Laer, 2004). Plantas de processamento de carnes, aves, peixe e leite podem ser contaminadas com *L. monocytogenes*, e análises dessa contaminação têm mostrado que a bactéria pode sobreviver nestes locais por um longo período. Alguns equipamentos desempenham papel importante na persistência dessa contaminação, especialmente aqueles que apresentam estrutura complexa, o qual não permite uma higiene eficiente (Lundén *et al.*, 2003 a; Lima, 2004).

Assim como outras bactérias patogênicas de importância em alimentos, *L. monocytogenes* pode fixar-se e formar biofilme em diferentes tipos de superfícies, inclusive aço inoxidável, vidro e borrachas. Essa formação de biofilme foi observada em plantas processadoras de carnes e de leite (Jacquet et al., 1994). Uma vez formado o biofilme, a remoção do microrganismo é muito difícil através das práticas normais de limpeza, haja vista que o microrganismo fica protegido de agentes sanitizantes e de antimicrobianos (Ryser & Marth, 1999), favorecendo inclusive, o desenvolvimento de resistência aos desinfetantes, pela exposição a concentrações subletais. Para prevenir o aparecimento de linhagens resistentes tem sido proposta a rotatividade de desinfetantes usados na indústria de alimentos (Lundén et al., 2003 b).

Autio et al. (2000), avaliaram 5 plantas de processamento de suínos e relataram que *L. monocytogenes* pode ser facilmente detectado dentro de abatedouro, vindo a contaminar o produto final. Nas plantas de abate de suínos estudadas, os autores isolaram o microrganismo em 10% dos drenos, mesas e portas e de 20% das serras. Em dois dos 10 estabelecimentos estudados, *Listeria monocytogenes* também foi isolada de carcaças. As amostras provenientes do ambiente foram coletadas antes do início do abate, justificando a necessidade de procedimentos eficazes que promovam uma correta limpeza e desinfecção das instalações antes do início das atividades.

Garantir a inocuidade de alimentos depende de minimizar a contaminação inicial por microrganismos patogênicos e o seu desenvolvimento durante o processamento (manipulação) e estocagem (Stekelenburg, 2003). O APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) é um programa preventivo, estruturado, sistemático e documentado, que tem sido proposto para garantir alimentos seguros. A inclusão de *L. monocytogenes* na lista de organismos a serem avaliados em um plano APPCC sofreu, recentemente, um impulso na busca por um método de detecção apropriado para seu monitoramento na planta, assegurando, desta forma, a produção de alimentos inócuos (Silva et al., 2003).

## **2.5 Ocorrência de infecções alimentares por *L. monocytogenes***

Um dos primeiros surtos relatados ocorreu nas províncias marítimas do Canadá, em 1981. Foram contaminadas 34 crianças e sete adultos, havendo mortalidade superior a 28%. A fonte de contaminação, de acordo com estudos epidemiológicos e avaliação microbiológica, foi uma salada de repolho (Schlech et al., 1983). Em 1983, um surto em ocorrido em Massachusetts (EUA), envolvendo 42 pessoas adultas e sete crianças, causou 14 mortes, sendo a infecção atribuída ao leite pasteurizado procedente de um rebanho apresentando listeriose (Fleming et al., 1985). Entretanto, alguns casos de listeriose são esporádicos, não estão relacionados com outros casos ou com um alimento específico.

Os alimentos mais comumente envolvidos são o queijo branco (Schuchat et al., 1992), patê (Mc Laurghlin et al., 1991), salsichas de Frankfurt consumidas sem aquecimento, e molhos insuficientemente cozidos (Schuchat et al., 1992).

Um dos maiores surtos de listeriose humana ocorreu em Los Angeles, Califórnia (EUA), em 1985, onde houve 86 casos, dos quais 67% envolviam mulheres gestantes e seus bebês. Foi isolado *L. monocytogenes* dos pacientes e de quatro pacotes de um queijo tipo frescal, estilo Mexicano (Jay, 1996). Outro surto envolvendo queijo ocorreu em “Canton of Vaud”, na Suíça, envolvendo queijo “vacherin”, que também é um tipo de queijo mole (Nascimento, 1994). Em 2000, nos Estados Unidos, registraram-se 29 casos de listeriose associados ao consumo de carne de peru, dos quais houve 4 mortes e 3 abortos.

Os dados reais referentes ao número de casos e surtos de listeriose não são conhecidos, principalmente no Brasil, entretanto, diversos estudos reportam a ocorrência da doença. GELLIN et al. (1991), calcularam que o número de mortes por listeriose em 1986, nos EUA, foi de 450, de um total de 1.700 casos, perfazendo 26% de mortalidade. Dados apresentados pelo ICMSF (1998) citam que de março a dezembro de 1992, 279 casos da doença foram registrados na França, proporcionando 63 mortes e 22 abortos. Dados do CDC (Center for Diseases Control) revelam que no ano de 2000, aproximadamente 2500 casos de listeriose foram registrados nos Estados Unidos, estimando que 500 desses casos foram fatais.

## 2.6 Detecção

Os métodos de detecção de *L. monocytogenes* em alimentos utilizam, como agentes de seletividade, principalmente sua capacidade de crescer em baixas temperaturas e sua resistência a vários antibióticos. A técnica de enriquecimento a frio em meios não seletivos ainda é considerada a mais segura para o sucesso das análises, porém em função do longo tempo de análise requerido, tem sido substituída pelo enriquecimento em meios seletivos. Esses meios geralmente são caldos nutritivos suplementados com vários agentes antimicrobianos, sendo mais utilizados o ácido nalidíxico, a acriflavina e a cicloeximida (Silva et al., 1997).

Os protocolos de dois métodos, o do FDA (Food and Drug Administration) (Hitchins, 1998) e o do USDA – FSIS (Johnson, 1998), são os mais comumente usados nos Estados Unidos para pesquisa de *L. monocytogenes*. Muitos relatos encontrados comparam estes métodos, demonstrando que cada um possui vantagens e desvantagens quando utilizados para isolamento desse microrganismo em um determinado tipo de alimento (Donnelly, 1999).

Segundo Norton (2002), o método do FDA é mais eficiente para isolamento do patógeno quando baixas populações de *Listeria* spp. estão presentes, como ocorre quando células do microrganismo foram submetidas a diferentes injúrias. Já o método USDA-FSIS, que usa duas etapas de enriquecimento, possui alta sensibilidade para as amostras com elevada microbiota acompanhante.

Em geral, o método do FDA tem sido adotado para produtos lácteos e o método USA para produtos cárneos (Warburton et al., 1992)

## 2.7 Utilização de biologia molecular para subtipificação de *L. monocytogenes*

Avanços nos estudos de biologia molecular propiciaram o desenvolvimento e emprego de vários métodos de tipificação molecular, seguros para rastrear a origem da contaminação microbiana em plantas de

processamento de alimentos. Dentre estes métodos, análises de DNA genômico baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR – “Polymerase Chain Reaction”) têm demonstrado ser rápidas, sensíveis e seguras para determinar relações entre organismos patogênicos.

PCR é uma técnica que permite amplificação *in vitro* de segmentos de DNA, usando dois *primers* que hibridizam com as fitas opostas, em regiões que flanqueiam o segmento a ser amplificado (Zaha, 2001). A reação de PCR baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA fita simples) utilizando iniciadores (*primers*) que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. Estes *primers* são sintetizados artificialmente, de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares a seqüências específicas que flanqueiam a região alvo (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Um ciclo de PCR envolve três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA alvo é desnaturada através da elevação da temperatura para 92/95°C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida a temperaturas entre 35°C e 60°C, dependendo essencialmente do tamanho e seqüência do *primer* utilizado, permitindo a hibridização DNA-DNA de cada *primer* com as seqüências complementares. Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima TaqDNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3' dos *primers*. Essa extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a seqüência alvo, de maneira que uma cópia dessa seqüência é feita no processo. Esse ciclo é repetido por algumas dezenas de vezes. Uma vez que a quantidade de DNA da seqüência alvo dobra a cada ciclo, a ampliação segue uma progressão geométrica de maneira que, depois de apenas 20 ciclos, é produzido mais de um milhão de vezes a quantidade inicial da seqüência alvo. Essa escala de amplificação permite, portanto, iniciar com quantidades mínimas de DNA (da ordem de alguns picogramas ou nanogramas) e terminar a reação com grandes quantidades de DNA de uma seqüência específica de interesse (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é uma variação do protocolo de PCR tradicional, onde se utiliza um único *primer*, com aproximadamente dez pares de bases, apresentando seqüência de

nucleotídeos arbitrária (Williams *et al.*, 1990). Quando submetidos a PCR, estes iniciadores arbitrários irão resultar na ampliação de uma ou mais seqüências de DNA, gerando conjuntos de fragmentos que funcionam como marcadores genéticos. O número e o tamanho destes fragmentos são à base da tipificação de uma linhagem bacteriana.

A natureza molecular do polimorfismo RAPD não é inteiramente conhecida. Sabe-se, porém, que a reação RAPD favorece a ampliação de segmentos onde a complementariedade entre o *primer* e o sítio de iniciação no DNA–molde é mais alta. A possibilidade de detectar polimorfismo do DNA sem necessidade do conhecimento prévio da seqüência alvo é a principal vantagem dessa técnica em relação a técnica original de PCR (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

RAPD tem sido utilizado para avaliação dos pontos críticos de contaminação por *Listeria* em plantas de processamento de alimentos (Lawrence & Gilmour, 1994; Destro, 1996; Wagner *et al.*, 1996; Angrigheto, 2000; Aguado *et al.*, 2001; Vogel *et al.*, 2001; Aguado *et al.*, 2004), e para a tipificação de linhagens de várias espécies bacterianas, entre elas *L. monocytogenes* (Farber & Addison, 1994; Kerr *et al.*, 1995, Byun *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2002; Lima, 2004), mostrando ser uma técnica de excelente reprodutibilidade e poder discriminatório.

Os primeiros trabalhos utilizando RAPD para tipificação de *L. monocytogenes* começaram a ser publicados em 1992, quando Mazurier & Wernars (1992) utilizaram RAPD na tipificação de 60 linhagens de *Listeria* de diversos biotipos e sorotipos. O emprego desta técnica possibilitou a diferenciação entre linhagens de espécies diferentes e também entre linhagens de uma mesma espécie ou sorotipo.

Lawrence & Gilmour (1994) utilizaram RAPD e Eletroforese de Enzima Multilocus (MEE) para determinar as fontes de contaminação por *L. monocytogenes* em uma planta de processamento de aves e derivados, na Irlanda do Norte. Esses autores verificaram a presença de um genótipo endêmico aquela planta de processamento, o qual estava presente desde o ambiente onde as aves vivas eram recebidas, até o ambiente do produto cozido, indicando uma contaminação contínua do ambiente e dos

equipamentos. Linhagens desse genótipo foram também isoladas da matéria-prima, mas não do produto final logo após a cocção.

O uso de técnicas moleculares tem aumentando, em especial o RAPD, por ser simples, rápida e de baixo custo, permitindo a investigação da origem da contaminação de um alimento, enquanto técnicas tradicionais de cultivo permitem, no máximo, condenar um alimento contaminado com *L. monocytogenes*. Somente entendendo como essa contaminação ocorre, é possível estabelecer estratégias para diminuir ou eliminar os pontos ou rotas de contaminação e fornecer um alimento seguro ao consumidor.

Lima (2004), por exemplo, utilizaram RAPD para avaliar a disseminação de *L. monocytogenes* em uma planta de processamento de Lingüiça mista frescal, descrevendo que a técnica apresentou reprodutibilidade e poder discriminatório elevado, tendo sido capaz de identificar linhagens persistentes na linha de processamento.

## 2.8 Sorotipificação

A sorotipificação tem sido uma ferramenta clássica para estudos epidemiológicos e de casos esporádicos de listeriose (Ryser & Marth, 1999). Apesar de não ser necessária para confirmação de *L. monocytogenes*, é muito empregada para determinar a prevalência de sorotipos específicos em estudos epidemiológicos, bem como para avaliar a rota de contaminação ambiental (Bennett & Weaver, 2001).

*L. monocytogenes* pode ser dividida em subtipos por vários métodos, sendo o mais comum, aquele baseado no reconhecimento de antígenos de superfície (somático e flagelar) por anticorpos específicos (Franco, Landgraf, 1996.) São conhecidos 13 sorotipos, mas somente três (4b, 1/2a e 1/2b) são responsáveis por 89 a 96% dos casos de listeriose humana (ICMSF, 1996; Swaminathan, 2001; Tompkim, 2002), com predomínio do sorotipo 4b nos casos de doença (Zheng & Kathariou, 1995; Louie et al., 1996). Esse sorotipo (4b) é responsável por 33 a 50% de casos esporádicos em humanos (Swaminathan, 2001).

O antígeno flagelar, assim como o antígeno somático deve ser identificado para linhagens dos sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b e 3c, pois os demais sorotipos têm o mesmo antígeno flagelar (A, B e C). Os sorotipos c,

1/2b, 1/2c, 3a, 3b e 3c podem ser identificados com 2 antisoros O (1 com anticorpos para o fator I e, o outro, com anticorpos para ambos os fatores, I e II) e 3 antisoros H (1 com anticorpo para os fatores A e B, 1 reagindo com C e 1 reagindo com D). O antisoro O para os fatores V e VI, VII e IX, VIII, X, XI e XV, permite que as linhagens dos sorotipos 4a, 4b, 4c, 4d, 5, 6a, e 6b possam ser tipificadas (Ryser & Marth, 1999).

*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 a relatada em outros países (Mc Lauchlin, 1991, Faber & Peterkin, 1991). Entretanto, o número de casos por linhagens do sorogrupo 1/2 tem aumentado nos últimos anos ( Loncarevic et al.,1998).

A sorotipificação é apropriada para separar um grande número de linhagens, porém, apresenta baixo poder discriminatório e, embora as linhagens envolvidas em surtos e casos esporádicos de listeriose normalmente pertençam aos mesmos sorotipos, uma tipificação com técnicas que apresentem maior poder discriminatório ainda se faz necessária. A reprodutibilidade da sorologia é boa para os sorotipos 1/2a e 4b, mas o mesmo não pode ser dito para os demais sorotipos (Unnerstad et al., 1999).

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Descrição do estabelecimento estudado**

O presente trabalho foi realizado em um matadouro-frigorífico de suínos, inspecionado pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), situado na Região das Missões, no Rio Grande do Sul. O estabelecimento abate 21.000 suínos/mês e industrializa cerca de 1.100 T/mês de produtos. A comercialização de seus produtos ocorre no mercado interno e externo, mantendo negócios com os países da Argentina, Uruguai, Albânia, Lituânia, Hong Kong e Rússia, sendo o principal produto de exportação, a carne suína *in natura*.

### **3.2 Amostragem**

As amostragens foram mensais, durante 5 meses consecutivos, entre os meses de novembro de 2003 e março de 2004, seguindo método preconizado pela APHA (2001). Os pontos de amostragem foram: água, câmaras frias, carcaças, facas, fezes, mãos dos operadores e ralos, perfazendo 105 amostras. O material foi coletado durante o processo de abate, acondicionado em caixas isotérmicas contendo gelo, e transportado ao laboratório de

Microbiologia de Alimentos da UNIJUÍ – Universidade Regional do Noroeste do Estado do RS, onde foi imediatamente analisado.

### **3.2.1 Amostras de água**

Foram coletadas diretamente da torneira, na qual se realizou primeiramente a limpeza com álcool 70%, seguida de flambagem do bocal da torneira e, após 3 minutos de escoamento da água, efetuou-se a coleta em saco estéril específico para coleta de água, sem a presença de tiosulfato de sódio. A amostra era imediatamente armazenada em caixa isotérmica contendo gelo e encaminhada ao laboratório para realização das análises microbiológicas.

### **3.2.2 Avaliação das câmaras frias**

As câmaras frias foram amostradas através de *swabs* de algodão estéreis, umedecidos em caldo de Enriquecimento para *Listeria* formulação UVM (Oxoid®), utilizando-se de moldes estéreis de aço inoxidável de 25cm<sup>2</sup>, em 5 pontos diferentes do piso e parede da câmara fria. Após a coleta, os 5 *swabs* foram colocados em um mesmo frasco contendo 25mL de caldo UVM, formando uma amostra composta. As amostras foram identificadas e armazenadas em caixas isotérmicas contendo gelo e transportadas até o laboratório para efetuar análise.

### **3.2.3 Amostras superficiais das carcaças**

Cada carcaça foi amostrada em 5 pontos, através de *swabs* de algodão estéreis, umedecidos em caldo UVM, utilizando-se moldes estéreis de aço inoxidável com área de 25cm<sup>2</sup>, totalizando uma área amostral de 125 cm<sup>2</sup>. Após a coleta, os 5 *swabs* foram colocados em um mesmo frasco contendo 25mL de caldo UVM, formando uma amostra composta. As amostras foram

identificadas, armazenadas em caixas isotérmicas contendo gelo, e transportadas até o laboratório para efetuar análise.

#### **3.2.4 Avaliação das facas**

As facas foram amostradas em conjunto, onde cada amostra constava de três unidades amostrais, através de *swabs* estéreis, que foram umedecidos em caldo UVM e, logo após, aplicados em toda a superfície da lâmina, de uma extremidade a outra, mudando de direção entre um movimento e outro. Logo após a coleta, os três *swabs* foram colocados em um mesmo frasco contendo 9mL de caldo UVM, identificadas, armazenadas em caixas isotérmicas contendo gelo, e transportadas até o laboratório para efetuar análise.

#### **3.2.5 Amostras de conteúdo cecal (fezes)**

Foram coletadas, aproximadamente, 50g de fezes de cada animal. A coleta foi realizada após a evisceração, através de incisão na porção cecal do intestino, utilizando-se bisturi devidamente esterilizado e, em seguida, as fezes foram coletadas em saco estéril, o qual foi mantido em caixa isotérmica contendo gelo até o momento da análise.

#### **3.2.6 Avaliação das mãos dos operadores**

As mãos dos operadores foram amostradas através de *swabs* estéreis, umedecidos em caldo UVM, os quais foram aplicados em toda a superfície da mão, de uma extremidade a outra. A amostragem foi realizada de forma composta, onde cada amostra representava 3 unidades amostrais. Logo após a coleta, os *swabs* foram colocados em frasco contendo 9mL de caldo UVM, identificados, armazenadas em caixas isotérmicas contendo gelo, e transportadas até o laboratório para efetuar análise.

### **3.2.7 Avaliação dos ralos**

Os ralos foram amostrados através de *swabs* estéreis, os quais foram umedecidos em caldo UVM e aplicados nas extremidades e no interior do ralo. Em seguida, os *swabs* foram colocados em frasco contendo 9 mL de caldo UVM, identificadas, armazenadas em caixas isotérmicas contendo gelo, e transportadas até o laboratório para efetuar análise.

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

O isolamento e a identificação em nível de espécie foram realizados segundo método proposto pelo Ministério da Agricultura do Brasil (Portaria nº 26, de 05 de abril de 1999), descrito brevemente a seguir:

#### **3.3.1 Enriquecimento seletivo**

As amostras coletadas com *swabs* foram inoculadas e transportadas em Caldo UVM, sendo incubadas ao chegarem ao laboratório. Com relação às amostras de água, uma alíquota de 10mL foi transferida para 90mL de Caldo de Enriquecimento para *Listeria* UVM. Das amostras de fezes dos animais pesou-se 10g e adicionou-se 90mL de Caldo UVM.

Todas as amostras foram incubadas a 30°C por 24 horas.

#### **3.3.2 Enriquecimento secundário**

Após o período de 24 horas de incubação em caldo UVM, transferiu-se 0,1mL de cada um dos tubos de ensaio contendo caldos de pré-enriquecimento, para tubos contendo 10mL de Caldo Fraser (Oxoid®), acrescentado de suplemento SR 156E (Oxoid®), os quais foram incubados a 35°C por 24-48 horas.

### 3.3.3 Isolamento

Após a incubação por 24-48 horas em Caldo Fraser (Oxoid<sup>®</sup>), as amostras foram semeadas em ágar Oxford (Oxoid<sup>®</sup>) adicionado de suplemento SR140E (Oxoid<sup>®</sup>) e em ágar Palcam (Oxoid<sup>®</sup>) acrescentado de suplemento SR150E (Oxoid<sup>®</sup>), a fim de obter o isolamento de colônias típicas de *Listeria* spp.

### 3.3.4 Seleção e purificação das colônias suspeitas de *Listeria* spp

Foram selecionadas 3 a 5 colônias de cada um dos meios seletivos, com características típicas de *Listeria* spp., ou seja, colônias negras contendo halo negro com centro côncavo.

As colônias escolhidas foram semeadas em tubos de ensaio contendo Ágar Soja Triptona (Merck<sup>®</sup>) enriquecido com 0,6% de extrato de levedura (Merck<sup>®</sup>) (TSA-YE) e incubadas a 35°C por 24 horas. Após o período de incubação, as colônias isoladas foram submetidas a identificação através de testes bioquímicos.

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

Para identificação em nível de espécie, seguiu-se o protocolo preconizado pelo Ministério da Agricultura do Brasil (Portaria nº 26, de 05 de abril de 1999), utilizando-se os testes de catalase, motilidade a 25°C, β-hemólise em Ágar sangue de cavalo e fermentação de carboidratos (dextrose, ramnose, xilose e manitol). As reações típicas das diversas espécies de *Listeria* estão representadas na Tabela 1.

Para o teste da catalase foi preparada uma suspensão bacteriana em uma lâmina de microscopia, previamente desengordurada com etanol comercial, a partir de cultivo recente em TSA-YE e uma alçada de solução

salina 0,85% esterilizada. À suspensão foi adicionada uma gota de água oxigenada a 3%, verificando-se, por até 2 minutos, o surgimento ou não de bolhas de oxigênio, como consequência da presença ou não da enzima.

Os isolados a serem testados foram inoculados em tubos contendo 4mL de Motility Test Medium (Difco<sup>®</sup>), com o auxílio de agulha de inoculação. Após, os tubos foram incubados a 25°C, por um período de até 7 dias, com observações diárias, a fim de constatar a presença da motilidade típica de *Listeria* spp., ou seja, aspecto de guarda-chuva no terço superior do ágar, indicando a característica de microaerofilia.

**TABELA 1-** Características fenotípicas empregadas para diferenciação de *Listeria* spp

	<i>L.</i> <i>monocytogenes</i>	<i>L.</i> <i>seeligeri</i>	<i>L.</i> <i>ivanovii</i>	<i>L.</i> <i>innocua</i>	<i>L.</i> <i>welshimeri</i>	<i>L.</i> <i>grayi</i>
Catalase	+	+	+	+	+	+
Motilidade tipo guarda-chuva	+	+	+	+	+	+
B -hemólise	+	+	+	-	-	-
Fermentação de:						
Dextrose	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-	-	-
Xilose	-	+	+	-	+	-
Ramnose	+	-	-	V	V	-

(Adaptado de Holt et al., 1994)

V = Variável , + = Positivo, - = Negativo

O teste da  $\beta$ -hemólise foi realizado em placas de petri contendo ágar Sangue de Cavalo (TSA-Sangue), demarcadas em sua porção inferior de modo a identificar 20 espaços, onde cada um recebeu uma picada do respectivo isolado a ser testado. Após inoculação, as placas foram invertidas e incubadas a 35°C por até 48 horas, sendo, então, examinadas de forma a identificar zonas de clareamento ao redor do crescimento (hemólise), provocadas pela produção de  $\beta$ -hemolisina.

Para o teste de fermentação de açúcares utilizaram-se placas de petri contendo ágar Púrpura de Bromocresol (Oxoid<sup>®</sup>), acrescido dos respectivos

açúcares dextrose (Reagen<sup>®</sup>), ramnose (Reagen<sup>®</sup>), xilose (Reagen<sup>®</sup>), ou manitol (Reagen<sup>®</sup>), com concentração final de 1%. Essas placas foram demarcadas em sua porção inferior, identificando 12 espaços e, em cada espaço, foram inoculadas, por picada, as culturas a serem testadas. Após inoculação, as placas foram incubadas invertidas por 24 horas a 35°C. O surgimento de halo amarelo ao redor da picada, após a incubação, indicava resultado positivo, ou seja, o microrganismo foi capaz de produzir ácido a partir do substrato (açúcar) fornecido.

### **3.4 Sorotipificação das linhagens de *Listeria* spp.**

Todas as linhagens identificadas como *Listeria* spp. foram cultivadas em tubos contendo TSA-YE, incubadas a 37°C por 24 horas, e enviadas ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), no RJ, onde foram submetidas a sorotipificação.

### **3.5 Análise do polimorfismo do DNA por amplificação aleatória (RAPD)**

#### **3.5.1 Preparo das células**

As linhagens de *L. monocytogenes* e *L. innocua* spp. foram semeadas em Caldo Triptona de Soja (Merck) com 0,6% de Extrato de Levedura (TSB-YE) e incubadas a 35°C por 18 horas, sob agitação. Após, foram centrifugadas a 4000 g por 15 minutos, e as células foram suspensas em 1mL de solução salina 0,85%, sendo transferidas para tubos tipo *Eppendorf* estéreis. Essa suspensão de células foi centrifugada a 16.250 g por 5 minutos (Centrífuga Jouan<sup>®</sup>), o sobrenadante foi removido, e o precipitado suspenso em 500µL de água destilada estéril. As suspensões foram diluídas com água destilada estéril até densidade ótica 1,8 a 600nm ( $A_{600}$ ) (Espectrofotômetro UV/visível Ultrospec 2000, Pharmacia<sup>®</sup>). Essa suspensão, contendo aproximadamente  $10^7$  células por µL, foi usada na reação de amplificação.

### 3.5.2 RAPD

Para a amplificação do DNA cromossomal foi utilizada a técnica de RAPD, conforme protocolo proposto por Destro (1996) e adaptado por Lima (2004), utilizando-se dois *primers*, separadamente: UBC155 e UBC127 (Invitrogen™).

A amplificação foi realizada em uma solução com volume final de 25µL contendo 20mM Tris HCl (pH 8,4), 50mM KCl, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5mM de dNTPs, 1,5µM do *primer* (UBC155 e UBC127), 3µL da suspensão de células e 1,5U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen™).

A mistura foi termociclada (Termociclador PTC-100, MJ Research®) nas seguintes condições: 1 ciclo de 92°C por 5 min; 35 ciclos de 92°C por 1 min, 35°C por 1 min e 72°C por 2 min. Após, 1 ciclo de 72°C por 10 min. As amostras foram, então, mantidas a 4°C até o momento da eletroforese. O produto de cada reação foi analisado em gel de agarose (Backer Analyzed) 1,5% e comparado com padrão de peso molecular Ladder 100 pb (Gibco BRL®).

Após a corrida, os géis foram fotografados sob transiluminação em luz ultravioleta (TFX 35M, Life Technologies, Gibco BRL®). Os padrões de bandas originados foram comparados e as linhagens agrupadas. A seqüência dos *primers* utilizados foi:

*primer* UBC 155: 5' – CTG GCG GCT G – 3'

*primer* UBC 127: 5' – ATC TGG CAG C – 3'

### 3.6 Análise dos Resultados

Os padrões de bandas gerados com cada *primer* foram comparados visualmente e as linhagens agrupadas conforme seus perfis genéticos.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Ocorrência de *Listeria* spp.

De um total de 105 amostras analisadas, 20 (19,4%) apresentaram contaminação por *Listeria* spp. *L. innocua* foi isolada em 19 (18,1%) das 105 amostras analisadas, enquanto *L. monocytogenes* foi encontrada em apenas uma delas (0,95%), como pode ser visualizado na Tabela 2.

Tabela 2 – Ocorrência de *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* em 105 amostras obtidas de um matadouro-frigorífico de suínos, localizado na Região das Missões-RS

<b>Espécie</b>	<b>Nº de amostras positivas (%)</b>
<i>L. monocytogenes</i>	1 (0,95%)
<i>L. innocua</i>	19 (18,1%)

Através da Tabela 2 observa-se que *L. innocua* foi a espécie prevalente encontrada neste estudo, seguida por *L. monocytogenes*, semelhantemente ao descrito por outros autores, tanto em amostras ambientais quanto em alimentos, que também encontraram ocorrência de *L. innocua* superior a das outras espécies (Barbalho *et al.* 2005.; Aguado *et al.*, 2005; Dhanashree *et al.*, 2003).

Sammarco *et al.* (1997) também pesquisaram a ocorrência de *Listeria* spp. dentro do ambiente de abatedouros de suínos, na Itália, porém encontraram 1,4% de *L. innocua* e 1,4% de *L. monocytogenes* dentre as 219 amostras analisadas. Van Den Elzen & Snijders (1993), na Holanda, avaliaram três abatedouros de suínos, um de bovino e uma unidade de distribuição de carnes, investigando os pontos críticos de controle para *L. monocytogenes*. De um total de 343 amostras provenientes de ambiente, utensílios, equipamentos e de mãos de operadores, 39 (11,4%) amostras foram positivas para *L. monocytogenes*.

Pela Tabela 3 pode-se verificar que *L. innocua* foi isolada das câmaras frias, facas, fezes dos animais, mãos de operadores e ralos, enquanto *L. monocytogenes* só foi isolada a partir de uma amostra de ralo.

**Tabela 3** – Frequência de *Listeria innocua* e *Listeria monocytogenes* no ambiente, utensílios, manipuladores e em carcaças, em um matadouro-frigorífico de suínos da região das Missões-RS

Amostras	Nº de amostras analisadas	Nº (%) de amostras positivas para <i>L. innocua</i>	Nº (%) de amostras positivas para <i>L. monocytogenes</i>
Água	15	0 (-)	0 (-)
Câmara fria	15	8 (53,3%)	0 (-)
Carcaça	15	0 (-)	0 (-)
Faca	15	4 (20%)	0 (-)
Fezes	15	2 (13,3%)	0 (-)
Mãos	15	3 (15%)	0 (-)
Ralos	15	2 (13,3%)	1 (6,6%)
<b>TOTAL</b>	105	19	1

*Listeria innocua* e *Listeria monocytogenes* não foram isoladas da água utilizada para o abastecimento do matadouro-frigorífico, a qual era proveniente de poços artesianos, mas recebia tratamento prévio com cloro livre (1,0ppm) antes de entrar na rede de água de abastecimento da indústria. Resultado semelhante também foi encontrado por Barbalho *et al.* (2005), os quais não isolaram *Listeria* spp. nas amostras de água do pré-*chilling* e do *chilling* em plantas de abates de aves, com concentração de 102 e 156ppm de cloro, respectivamente. Por outro lado, Genigeorgis *et al.* (1989) isolaram *L.*

*monocytogenes* em 12,5% das amostras de água, com uma concentração de 20 a 25ppm de cloro. A utilização de 1,0ppm de cloro livre pode explicar a ausência de *Listeria* spp. nas amostras analisadas neste trabalho, embora não se possa descartar a ausência do microrganismo no poço de origem (CDC, 2005)

Dentre as 15 amostras das facas, 4 (20%) apresentaram *Listeria* spp. A existência de utensílios contaminados por *Listeria* spp. é uma indicação de limpeza e sanificação inadequadas, além de poderem ser responsáveis pela contaminação cruzada, bem como pela manutenção de *Listeria* spp. em plantas de processamento de alimentos (Unnerstad, et al.1996; Miettinen et al., 1999a). No frigorífico investigado, as facas eram sanificadas em água a 85°C durante a operação de abate, temperatura suficiente para inativar células de *Listeria* spp. (Jay, 2005), contudo, foram coletadas de instrumentos em uso, sugerindo uma contaminação das carcaças antes da higienização final com água clorada.

No entanto, *L. innocua* e *L. monocytogenes* não foram isoladas nas 15 amostras de carcaças suínas analisadas (Tabela 3). Já Kanuganti (2002) e Antoniollo (2001) isolaram *L. monocytogenes* em 4% e 4,3% das amostras de carcaças suínas e ovinas, respectivamente. Embora não tenha sido isolada *Listeria* spp. nas carcaças, deve-se considerar que as amostragens foram efetuadas logo após a desinfecção com água clorada (1ppm) e armazenamento em câmara fria, os quais foram realizados sempre em um tempo não superior a 2 horas após o abate. Nesse sentido, Saide-Albornoz et al. (1995) afirmam que produtos nos quais inicialmente havia níveis não detectáveis de *L. monocytogenes*, podem apresentar resultado positivo após serem submetidos a um período de conservação sob refrigeração. Confirmando essa informação, Antoniollo (2001) obteve um aumento da taxa de detecção de *Listeria* spp., da ordem de 6,98%, nas carcaças submetidas a uma temperatura de refrigeração m torno de 0°C por 24 horas.

Os locais que apresentaram maior contaminação por *Listeria* spp. foram as câmaras frias, sendo que das 15 amostras analisadas, oito (53,3%) estavam contaminadas, como pode ser observado através da Tabela 3. Tal fato pode ser explicado pela menor freqüência de higienização desses locais, quando comparados com os demais pontos do abatedouro, bem como pela

temperatura dessas câmaras frias, as quais eram mantidas em temperaturas em torno de 2°C.

Não existem dados disponíveis a cerca do isolamento de *Listeria* em câmaras frias de indústrias de alimentos. Entretanto, por seu caráter psicrótrófico, esse microrganismo, uma vez presente nesse ambiente, poderá ter seu crescimento facilitado, como tem sido relatado em estudos realizados em refrigeradores domésticos. Azevedo *et al.* (2005), em Portugal, avaliaram *Listeria* spp. em refrigeradores domésticos, os quais eram mantidos em temperaturas entre 2 e 12°C. De um total de 86 refrigeradores amostrados, três apresentaram contaminação por *L. monocytogenes*, quatro por *L. grayi*, e um por *L. innocua*. No entanto, Jackson *et al.* (1993), nos EUA, não isolaram *L. monocytogenes* nas 195 amostras de refrigeradores analisadas.

Nesta pesquisa, 13,3% das 15 amostras de fezes dos suínos analisados apresentaram *L. innocua* (Tabela 3). Já Fenlon *et al.* (1996) não detectaram *Listeria* spp. em amostras de fezes de suínos e frangos, e sugeriram que a presença desse microrganismo deve estar relacionada com a dieta, uma vez que os animais alimentados com silagem, excretaram a bactéria, ao passo que animais alimentados com pastagens ou com alimentação industrializada, não excretaram *Listeria* spp. Cabe ressaltar que os suínos avaliados nesse experimento foram alimentados, em todas as fases de seu crescimento, exclusivamente com rações industrializadas. A presença de *Listeria* spp. nas fezes dos animais é indicativa de que essa pode ser a fonte de contaminação da linha de abate.

Quanto as mãos dos manipuladores analisados, três (15%) das 15 amostras coletadas apresentaram *L. innocua*. Os resultados obtidos por Genigeorgis *et al.* (1990), avaliando plantas de processamento de alimentos vistoriadas por inspeção federal, nos EUA, foram superiores aos encontrados na presente pesquisa, tendo em vista que encontraram 10% de contaminação por *L. monocytogenes* nesse tipo de amostra. Da mesma forma, Von Laer (2004) encontrou 20% de *L. monocytogenes* em mãos de manipuladores em planta processamento de lingüiça mista frescal, no Brasil. Assim como com os utensílios, a presença de *Listeria* spp. nas mãos de manipuladores de alimentos demonstra inadequação dos procedimentos de lavagem e sanificação, bem como podem ser fontes de contaminação cruzada.

Quanto aos ralos analisados, seis (40%) de 15 amostras apresentaram *Listeria* spp, sendo que em um deles foi encontrado *L. monocytogenes*. Essas altas porcentagens já eram esperadas, uma vez que toda a água utilizada após higienização passa por esses ralos.

A contaminação em plantas de processamentos de alimentos por outras espécies de *Listeria* que não *L. monocytogenes* indica que, mesmo que a amostra não apresente o patógeno, possui características que propiciam o seu desenvolvimento, uma vez que todas as espécies de *Listeria* apresentam alta homologia entre os genomas (o que as torna muito semelhantes fenotipicamente), além de apresentarem a mesma ecologia (Ryser & Marth, 1999). Dessa forma, a presença de *L. innocua* em um ambiente é indicativa de maior probabilidade da ocorrência de *L. monocytogenes* (Antoniollo, 2001), portanto, o resultado observado no presente estudo, permite inferir que não se pode descartar a presença das outras espécies de *Listeria* na indústria avaliada.

O isolamento de *L. monocytogenes* na amostra proveniente dos ralos, demonstra a presença desse microrganismo no ambiente do frigorífico abatedouro e que, provavelmente, foi carregado para o ralo através das operações de limpeza. Dessa forma, mesmo que não tenha sido isolada nos outros pontos amostrados, a bactéria pode estar presente em demais locais do abatedouro. Resultado semelhante foi encontrado por Autio et. al. (2000), ao analisarem plantas de abate de suínos, os quais isolaram *L. monocytogenes* em 10% dos drenos amostrados. Já Lima (2004) e Von Laer (2004), não isolaram esse microrganismo em amostras provenientes de drenos e ralos.

#### **4.2 Sorotipificação de *Listeria* spp.**

Após o isolamento, as 19 linhagens de *L. innocua* e uma linhagem de *L. monocytogenes* obtidas foram submetidas a sorotipificação, das quais, 52,63% (10) das linhagens de *L. innocua* não puderam ser identificadas sorologicamente (NT), 31,58% (6) pertenciam ao sorotipo 6a, 15,79% (3) pertenciam ao sorotipo 6b e a linhagem de *L. monocytogenes* pertencia ao

sorotipo 4b. A distribuição dos resultados obtidos na sorotipificação das amostras analisadas, pode ser observada na Tabela 4.

**Tabela 4** – Frequência, número, percentagem e sorologia de *Listeria innocua* e *Listeria monocytogenes*. coletadas em um matadouro-frigorífico de suínos na região das Missões-RS

<b>Amostras (n<sup>o</sup>)</b>	<b><i>L. innocua</i> número/percentagem (sorotipo)</b>	<b><i>L. monocytogenes</i> número/percentagem (sorotipo)</b>
Água (15)	0/0,0	0/0,0
Câmara fria (15)	3/20 (6a) 3/20 (NT) 2/13,3 (6b)	0/0,0
Carcaça	0/0,0	0/0,0
Facas (15)	4/26,6 (NT)	0/0,0
Fezes (15)	2/13,3 (6a)	0/0,0
Mãos (15)	2 /13,3 (NT) 1/6,7 (6b)	0/0,0
Ralos (15)	1/6,7 (NT) 1/6,7 (6a)	1/6,7 (4b)

NT: não tipificadas sorologicamente

Uma única linhagem de *L. monocytogenes* foi isolada neste estudo, sendo esta oriunda de uma amostra de ralo, amostrado na terceira coleta, e pertencente ao sorovar 4b. A presença de *L. monocytogenes* do sorotipo 4b deve ser encarada com preocupação, pois este tem sido envolvido não somente em infecções esporádicas, mas também em diversos surtos (Tran & Kathariou, 2002). Os maiores surtos registrados ocorreram na Escócia (salada de repolho cru), Califórnia (queijo Jalisco), Suíça (Queijo Vacherin Mont d'Or),

França (geléia de língua de porco) e Estados Unidos (cachorro-quente) (Anonymous, 1999) e foram provocados por esse sorotipo. Faber & Perterkin (1991), estudaram 2344 casos de listeriose humana, em 11 países, e relataram que 67,8% destes casos foram causados por *L. monocytogenes* do sorogrupo 4.

Diversos autores, no Brasil e no exterior, têm divulgado resultados sobre os principais sorotipo/sorogrupos de *L. monocytogenes* presentes em alimentos e/ou plantas de processamento de alimentos. No Brasil, merecem destaque os estudos de Hofer, Ribeiro e Feitosa (2000), que investigaram os principais sorotipos de *Listeria* spp. isolados de várias fontes, entre 1971 e 1997, e demonstraram a presença e a prevalência dos sorotipos 4b, 1/2a e 1/2b de *L. monocytogenes* em produtos cárneos. Já Antoniollo (2001), Lima (2004) e Von Laer (2004), avaliaram os principais sorotipos de *L. monocytogenes* presentes em plantas de processamento de alimentos, em Pelotas, RS, encontrando 1c, 4b, 1b, como os prevalentes.

A presença de linhagens de *L. innocua*, pertencentes ao sorotipo 6a em 31,58% das amostras analisadas (Tabela 4), é um resultado preocupante, pois Perrin *et al.* (2003) relatam o caso de uma senhora de 62 anos, internada em um hospital da França com bacteremia bastante avançada, e que veio a falecer 40 horas após a internação. Foi realizada uma cultura a partir de seu sangue onde foi isolado um microrganismo que, a princípio, foi identificado como *L. monocytogenes*. Devido a severidade do caso, a linhagem foi enviada ao Instituto Pasteur (referência para *L. monocytogenes*) para identificação e sorotipificação, sendo identificada, surpreendentemente, como *L. innocua* sorovar 6a.

#### **4.3 Caracterização molecular por RAPD das linhagens de *L. monocytogenes* e *L. innocua***

As 19 linhagens de *L. innocua* e a linhagem de *L. monocytogenes* foram submetidas a tipificação molecular através da análise do polimorfismo do DNA por amplificação aleatória (RAPD), com os *primers* UBC 155 e UBC 127. Esses

mesmos *primers* foram utilizados por Cabrita *et al.* (2004), Lima (2004) e Farber & Addison (1994), para caracterização molecular de *L. monocytogenes*.

O *primer* UBC 155 permitiu a discriminação de *L. innocua* e *L. monocytogenes* em 12 perfis de DNA. Com esse *primer*, o maior número de linhagens pertenceu aos perfis denominados arbitrariamente de 1 e 2, os quais foram compostos por 6 (30%) e 3 (15%) linhagens (Tabela 5), respectivamente. Na Figura 1, podem-se visualizar alguns perfis identificados pelo *primer* UBC 155, para as linhagens de *L. innocua* e *L. monocytogenes*.

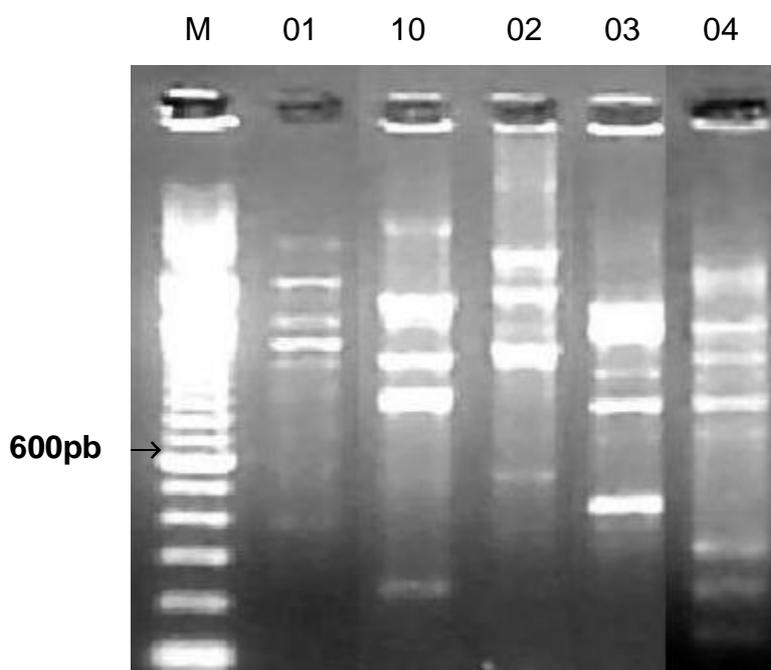


FIGURA 1: Análise eletroforética em gel de agarose 1,5%: padrões de bandas dos perfis RAPD sendo 01 *Listeria monocytogenes* e 10, 02, 03, 04, *Listeria innocua*, obtidos com o *primer* UBC 155; (M) Marcador de peso molecular Ladder 100pb

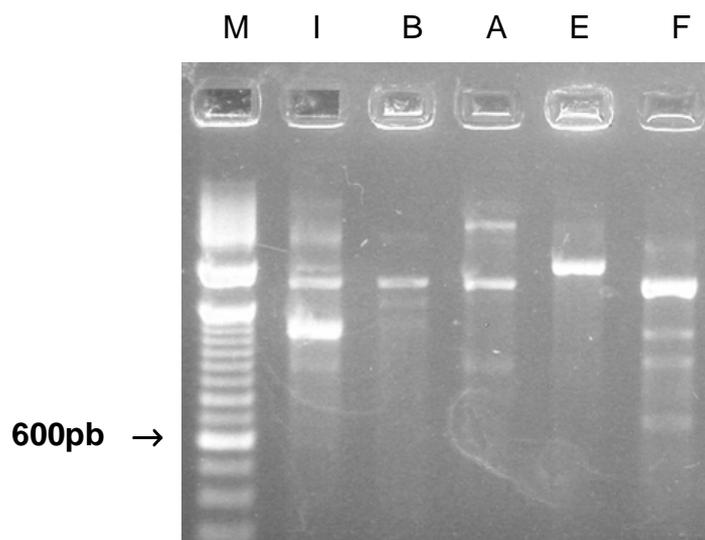


FIGURA 2: Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% : padrões de bandas dos perfis RAPD sendo I *Listeria monocytogenes* e B, A, E , F, *Listeria innocua*, obtidos com o *primer* UBC 127; (M) Marcador de peso molecular Ladder 100pb

Com o *primer* UBC 127 foram identificados 12 perfis de DNA, com 1 a 5 bandas, para as linhagens de *L. innocua* e *L. monocytogenes*. O maior número de linhagens pertenceu aos perfis denominados arbitrariamente de A e B, compostos por 7 (35%) e 3 (15%), respectivamente. Na Figura 2, podem-se visualizar alguns perfis, gerados com o *primer* UBC127.

Convencionou-se chamar de “perfis RAPD combinados” (Tabela 5), aqueles padrões gerados pela combinação dos perfis de RAPD produzidos individualmente com os *primers* UBC 155 e UBC 127. Dessa forma, as linhagens de *L. monocytogenes* e *L. innocua* foram distribuídas em 15 perfis RAPD combinados. Em cada um desses perfis foram alocados de 1 a 5 linhagens de *L. monocytogenes* e *L. innocua*. Os perfis compostos com maiores números de linhagens foram o 1A e 2B, respectivamente (Tabela 6).

É importante frisar que com os *primers* utilizados (UBC 155 e UBC 127) a linhagem de *L. monocytogenes*, apresentou perfil genético exclusivo.

**Tabela 5** – Perfis genéticos das linhagens de *Listeria innocua* e *Listeria monocytogenes* isoladas em um matadouro-frigorífico de suínos, localizado na região das Missões -RS

Origem	Número da linhagem	Perfil simples		Perfil RAPD combinado
		Primer 155	Primer 127	
Mãos	10	1	A	1A
Mãos	11	1	A	1A
Facas	12	1	A	1A
Facas	13	1	A	1A
Ralos	14	1	A	1A
Câmara Fria	15	1	L	1L
Câmara Fria	16	2	B	2B
Câmara Fria	17	2	B	2B
Ralos	18	2	H	2H
Câmara Fria	19	3	D	3D
Mãos	20	3	G	3G
Fezes	21	4	E	4E
Câmara Fria	22	5	C	5C
Câmara Fria	23	6	A	6A
Faca	24	7	A	7A
Fezes	25	8	F	8F
Câmara Fria	26	9	B	9B
Ralo	27	10	I	10I
Câmara Fria	28	11	M	11M
Faca	29	12	J	12J

Na Tabela 6 pode ser observado que o RAPD com o conjunto de *primers* utilizado, permitiu a diferenciação entre as linhagens pertencentes a um mesmo sorotipo.

**Tabela 6** – Distribuição das 20 linhagens de *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* isoladas em uma linha de abate de um matadouro-frigorífico de suínos, localizado na região das Missões – RS, avaliada por sorologia e RAPD

Perfil combinado	Sorotipo	Nº das linhagens	Total de linhagens
1 <sup>a</sup>	NT	10;11;12;13;14	5
1L	NT	15	1
2B	6a	16;17	2
2H	6a	18	1
3D	6b	19	1
3G	6b	20	1
4E	6a	21	1
5C	NT	22	1
6A	NT	23	1
7A	NT	24	1
8F	6a	25	1
9B	6a	26	1
10I	4b	27	1
11M	6b	28	1
12J	NT	29	1

NT: não tipificadas sorologicamente

Como exemplo, pode-se citar a linhagem de *L. monocytogenes*, sorotipo 4b, que apresentou um perfil único com cada um dos dois *primers* utilizados e perfil combinado único, o qual foi identificado como 10I (Tabela 6). Com relação a *L. innocua*, duas linhagens (14 e 18) que foram isoladas no mesmo local de amostragem (ralo) e que foram classificadas, através da sorotipificação, como não tipificável (NT) e 6a (Tabela 4), apresentaram dois perfis compostos diferentes: 1A e 2H, respectivamente.

As linhagens de *L. innocua* isoladas das câmaras frias foram aquelas que demonstraram a maior diversidade de sorotipos (Tabela 4), apresentando 3 (20%) do sorotipo 6a, 2 (13,3%) do 6b e 3 (20%) não tipificáveis (NT). Na primeira coleta foram isoladas duas linhagens, as quais apresentaram perfis combinados distintos (5C e 6A), como pode ser visualizado na Tabela 7. Essas duas linhagens não foram tipificáveis (NT) através da sorologia. Na segunda coleta foi isolada uma linhagem de *L. innocua*, pertencente ao sorotipo 6b, a qual apresentou perfil composto único (3D). Na terceira coleta foi isolada uma linhagem de *L. innocua* pertencente ao sorotipo 6a, a qual apresentou perfil composto único: 9B. Na quarta coleta foram isoladas duas linhagens de *L.*

*innocua*, pertencentes ao sorotipo 6a, que apresentaram o mesmo perfil (2B). Já na quinta coleta foram isoladas 2 linhagens, das quais uma não foi tipificável (NT) através da sorologia e, a outra, classificada como 6b, as quais apresentaram perfis compostos únicos e distintos (1L e 11M).

Somente na terceira e quarta coletas foram isoladas linhagens de *L. innocua* nas facas amostradas. Na terceira coleta, as 2 linhagens isoladas não foram passíveis de sorotipificação (NT), porém, apresentaram perfis genéticos compostos distintos entre si (1A e 7A), conforme observado na Tabela 7. É interessante frisar que linhagens pertencentes a esse mesmo perfil 1A, também foram isoladas nas coletas 1 e 2 (Tabela 7) a partir de mãos de operadores, e de ralos, sugerindo que essa linhagem persistiu no frigorífico estudado, o que também foi observado por Lima (2004) e von Laer (2004), que avaliando a disseminação de *L. monocytogenes* em linhas de processamento de alimentos, verificaram que determinadas linhagens eram recorrentes ao longo do tempo de amostragem, contribuindo para a contaminação cruzada do produto final.

**Tabela 7** – Distribuição por amostra e por coleta dos perfis gerados por RAPD de linhagens de *L. monocytogenes* e *L. innocua* coletadas em um matadouro-frigorífico de suínos localizado na região das Missões – RS

Tipo de amostra	1 <sup>a</sup> Coleta	2 <sup>a</sup> Coleta	3 <sup>a</sup> Coleta	4 <sup>a</sup> Coleta	5 <sup>a</sup> Coleta
Água	-	-	-	-	-
Câmara fria	5C; 6A	3D	9B	2B	1L;11M
Carcça	-	-	-	-	-
Mãos	1A <sup>a</sup>	3G	-	-	-
Facas	-	-	1A <sup>a</sup> ; 7A	12J	-
Fezes	4E	8F	-	-	-
Ralos	-	1A <sup>a</sup>	2H; 10I	-	-

- *Listeria spp* não detectada

<sup>a</sup> indica que o grupo foi encontrado em outras coletas e/ou tipo de amostra

*L. innocua* do sorotipo 6a foi isolada nas amostras de fezes (Tabela 4). Já nas amostras das mãos de manipuladores verificou-se a presença de três linhagens desse microrganismo, sendo uma do sorotipo 6b e 2 não tipificáveis (NT), semelhantemente ao reportado por Barbalho et al. (2004) os quais observaram que *L. innocua* isoladas a partir de mãos e luvas de operadores em

plantas de processamento de frangos pertenciam aos sorotipos 6a, 6b, enquanto algumas não foram tipificáveis (NT).

Através dos resultados encontrados nesta pesquisa, observa-se que o matadouro-frigorífico avaliado, mesmo sendo fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Federal, tendo implantado Boas Práticas de Fabricação (BPF) e o sistema de Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle (APPCC), apresenta contaminação por *L. monocytogenes* e *L. innocua*, demonstrando a persistência desses microrganismos no ambiente do frigorífico e a dificuldade para sua eliminação.

## 5. CONCLUSÕES

⇒ Há *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* no matadouro-frigorífico de suínos avaliado.

⇒ A linhagem de *L. monocytogenes* pertence ao sorotipo 4b, denotando preocupação com relação à saúde pública.

⇒ As amostras provenientes das câmaras frias apresentaram maior número de linhagens de *Listeria innocua* e diversidade de sorotipos;

⇒ Os *primers* utilizados foram eficientes para caracterização molecular, uma vez que *L. monocytogenes* apresentou perfil único, o qual foi diferente das linhagens de *L. innocua*, que apresentou 12 perfis diferentes.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUADO, V.; VITAS, A. I.; GARCÍA-JALON, I. Randomo Amplified Polymorphic DNA typing applied to study of cross-contamination by *Listeria monocytogenes* in processed food products. **Journal of Food Protection**, v.64, n.5, p.716-720, 2001.
- AGUADO, V., VITAS, A. I.; GARCÍA-JALON, I. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from vegetable plant by RAPD and REA. **International Journal of Food Microbiology**, v.90, p.341-347, 2005.
- ANGRIGHETO, C. **Disseminação de *Listeria monocytogenes* em uma linha de produção de “nuggets” congelados de frango**. São Paulo, 2000, 51f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade de São Paulo, 2000.
- ANTONIOLLO, P. C. ***Listeria* spp. em ovinos e carcaças ovinas em nível de abatedouro**. Pelotas, 2001. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, 2001.
- ANONYMOUS. **Update: multistate outbreak of listeriosis** – United States, 1998-1999. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*47: 1117-1118. 1999.
- APHA. **Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods**. 4<sup>rd</sup> ed. Washington D.C.: American Public Health Association, 2001.
- AUTIO, T., SÄTERI, T., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., RAHKIO, M., LUNDÉN, J., KORKEALA, H. *Listeria monocytogenes* contamination pattern in pig slaughterhouses. **Journal Food Protection**, v.63, n.10, p.1438-1442, 2000.

- AUTIO, T., LUNDÉN, 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.
- AZEVEDO, I., REGALO, M., MENA, C., ALMEIDA, G., CARNEIRO, L., TEXEIRA, 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. et a poultry processing plant in Brasil and a phage test for rapid confirmation of suspect. **Food Control**, n.16, p.211-216, 2005.
- BENNETT, R. W.; WEAVER, R. E. Serodiagnosis of *Listeria monocytogenes*. In: **Bacteriological Analytical Manual (BAM)**. Cap.11, 8ª ed., 2001.
- BEUCHAT, L.R. *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. **Food Control**, Letchworth, v.7, n.4/5, p.223-228, 1996.
- BRASIL. **Portaria nº 26 do Ministério da Agricultura**, de 05 de abril de 1999. Estabelece as metodologias para Pesquisa de *Listeria monocytogenes* Diário Oficial da União nº 89,12 de maio de 1999. Seção 1, p.71-74.
- BRASIL. **RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, de 02 de janeiro de 2001. Oficializa Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. <http://www.anvisa.gov.br/legis/idex.htm>. Acesso: 03/05/2002.
- BRASIL. **Circular nº 354 do Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento, DIPOA**. de 25 de julho de 2004. Assunto: Prevenção da contaminação com *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para consumo.
- 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**, v.69, p.227-235, 2001.
- CABRITA, P., CORREIA, S., DIAS, S. F., BRITO, L. Genetic characterization of *Listeria monocytogenes* food Isolates and pathogenic potential within serovars 1/2a and 1/2b. **Sistem. Applied Microbiology**, v.27, p.454-461, 2004.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Multistate outbreak of listeriosis – United States**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/od/oc/media/pressrel/r990114.htm>. Acesso em: 17 mar. 1999.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Preliminary**

**FoodNet Data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – selected sites – United States.** Disponível em: <http://www.cdc.gov/epo/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5316a2.htm>. Acesso em: 30/04/2004.

CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Division of bacterial and mycotic diseases. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/listeriosisg.htm>. Acesso em 29/03/2004.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Safe water system (sws) - effect of chlorination on inactivating selected microorganisms.** [http://www.cdc.gov/safewater/about\\_pages/chlorinationtable.htm#chlorvirus](http://www.cdc.gov/safewater/about_pages/chlorinationtable.htm#chlorvirus). Acesso 10/08/2005.

COMI, G.; FRIGERIO, R.; CANTONI, C. *Listeria monocytogenes* serotypes in Italy meat products. **Letter Applied Microbiology**, v.15, p.168-171, 1992.

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

DHANASHREE, B., OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I., GOEBEL, W. Incidence of *Listeria* spp. In clinical and food samples in Mangalore, India. **Food Microbiology**, v.20, p.447-453, 2003.

DONNELLY, C.W. Conventional methods to detect and isolate *Listeria monocytogenes*. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis, and food safety**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, p.225-260, 1999.

DUFFY, G.; CLOAK, O.M.; SHERIDAN, J.J.; BLAIR, I.S.; McDOWELL, D.A. The development of a combined surface adhesion and polymerase chain reaction technique in the rapid detection of *Listeria monocytogenes* in meat and poultry. **Int. Journal. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.49, p.151-159, 1999.

FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes* a food-borne pathogen. **Microbiology Reviews**, v. 55, p. 511-576, 1991.

FARBER, J. M.; ADDISON, C. J. RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.77, n.3, p.242-250, 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, p641-650, 1996.

- FLEMING, D.W.; COCHI, S.L.; MCDONALD, K.L. *et al.*, Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. **New England Journal of Medicine**, v. 312, n.7, p. 404-407, 1985.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3<sup>a</sup>ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998, 220p.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods**. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/lmr2-2.html#Listeriosis>. Acesso em: 21 set. 2003.
- FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.
- GELLIN, B.G.; BROONE, C.V.; BIBB, W.F. *et al.*. The epidemiology of listeriosis in the United States – 1986. **American Journal of Epidemiology**, v. 133 n. 392, p.392-401, 1991.
- GENIGEORGIS, C.A.; DUTULESCU, D.; GARAYZABAL, J. F. Prevalence of *Listeria* spp. in poultry meat at the supermarket and slaughterhouse. **Journal of Food Protection**, Ames, v.52, p618-624, 1989.
- GENIGEORGIS, C.A., OANCA, P., & DUTULESCU, D. Prevalence of *Listeria* spp. in turkey meat at the supermarket and slaughterhouse level. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.9, p112, 1990.
- GRAY, M.L.; KILLINGER, A.H.) *Listeria monocytogenes* and listeric infections. **Bacteriology Review**, v.30, p.309-382, 1966.
- HENSLEY, W.R., ed. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. [edited by] John G. Holt...[et al.] - Edição 9th.ed. Imprensa Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p.
- HITCHINS, A.D. *Listeria monocytogenes*. In: UNITED STATES. Food and Drug Administration. **Bacteriological Analytical Manual**. Edição 8th.ed. Imprensa Gaithersburg, Md.: AOAC International, 1998. cap.10, p.10.01-10.13.
- HOFER, E., RIBEIRO, R., & FEITOSA, D.P. Species and Serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brasil from 1971 to 1997. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.95, 615-620, 2000.

- HOLT, J.G. *et.al.* **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). Microorganisms in foods 5. In: **Microbiological specifications of food pathogens**. Imprenta London: Blakie Academic & Professional, Descr.Fis. 513p, 1996.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganismos de los alimentos – Métodos de muestro para análisis microbiológicas: Principios y aplicaciones específicas**. Traduzido por Juan Antonio Ordóñez Pereda e Marco Antonio Dáz Hernández. Vol.II. Zaragoza: Acribia, 1998, 165p.
- JACKSON, T.C., ACUFF, G. R., LUCIA, L.M, PRASAI, R.K., BENNER, R.A, TERRY, C.T. Survey of residential refrigerators for the presence of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.56, p.874-875, 1993.
- JACQUET, C.; CATIMEL, B.; BROSCHE, R.; BUCHRIESER, C.; DEHAUMONT, P.; JEONG, D.K.; FRANK, J.F. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. **Journal of Food Protection**, v.57, p.576-586, 1994.
- JAY, J. Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**. 5.ed. Chapman & Hall, 1996.
- JAY, J. **Microbiologia dos alimentos**. Editora ArtMed, 2005, 100p.
- JOHNSON, J.L. **USDA-FSIS microbiology laboratory guidebook**. Washington: U.S.Department of Agriculture, 1998. v.1 *apud* NORTON, D.M. Polymerase chain reaction-based methods for detection of *Listeria monocytogenes*: toward real-time screening for food and environmental samples. **Journal. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.85, n.2, p.505-515, 2002.
- KANUGANTI, S. R., WESLEY, I. V., REDDY, P. G., MCKEAN, J., HURD, H.S. Detection of *Listeria monocytogenes* in Pigs and Pork. **Journal of Food Protection**, v.65, n.9, p.1470-1474, 2002.
- KERR, K.G.; KITE, P.; HERITAGE, J.; HAWKERY, P.M. Typing of epidemiologically associated environmental and clinical strains of *Listeria monocytogenes* by random amplification of polymorphic DNA. **Journal of Food Protection**, v.58, p.609-613, 1995.
- LAWRENCE, L. L.; GILMOUR, A. Incidence of *Listeria* spp. And *L.monocytogenes* in a poultry processing environmental and in poultry products and their rapid confirmation by multiplex PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.4600-4604, 1994.
- LIM, D. **Microbiology**. 2ed. McGraw-Hill, 1998. Cap.20: Food and Industrial Microbiology, p.613.

- LIMA, A. S. **Disseminação de *Listeria monocytogenes* no processamento de lingüiça mista frescal avaliando sorologia e RAPD** . Pelotas, 2004. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, 2004.
- LONCAREVIC, S., DANIELSSON-THAM, M. L., MARTENSSON, L., RINGNER, A., RUNEHAGEN, A., THAM, W., A case of foodborne listeriosis in Sweden. **Letters in Applied Microbiology**, v.24, p.65-68,1998.
- 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 molecular typing of *Listeria monocytogenes*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.34, p.15-19, 1996.
- LUDÉN, J. M., AUTIO, T. J., SJÖBERG A.-M, KORKEALA, H.J. Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. **Journal Food Protection**, v.66, n.11, p.2062-2069, 2003a.
- LUNDÉN, J., AUTIO, T.; MARKKULA, A., HELLSTRÖM, S., KORKEALA, H. Adaptative and cross-adaptative responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. **International Journal of Food Microbiology**, v.82, p.265-272, 2003b.
- MAIJALA, R.; LYYTIKAINEN, O.; JOHANSSON, T. Exposure of *Listeria monocytogenes* in an outbreak caused by butter. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PROBLEMS OF LISTERIOSIS (ISOPOL), 14, Mannheim, 2001.**Book of abstracts**. Alemanha, 2001. p.165. S.l.: s.n.
- MARTINEZ, I.; RORVIK, L.M., BROX, V.; LASSEN, J.; SEPPOLA, M.; GRAM, L.;VOGEL, B.F. 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.2634, p.1-13, 2002;
- MAZURIER, S. -I.; WERNARS, K. Typing of *Listeria* strains by random amplification of polymorphic DNA. **Research Microbiology**, Paris, v.143, p.499-505, 1992.
- MC LAUHLIN, J.; HALL, S.M.; VELAMI, S.K.; GILBERT, R.J. Human listeriosis and paté: a possible association. **British Medical Journal** v. 303, p.773-775, 1991.
- MIETTINEN, M. K., SITONEM, A; HEISKANEN, P.; HAAJANEN, H.; BJORKROTH, K.J.; KORKEALA, H. J. Molecular epidemiology of and outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. **Journal Clinical Microbiology**, v.68, n.7, p.2358-2360,1999.

- MURRAY, E.G.D.; WEBB, R.A.; SWARM, M.B.R. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytoses, caused by a undescribed bacillus *Bacterium Monocytogenes* (n.sp). **Journal of Pathological Bacteriology**, v. 29 p.407-439, 1926.
- MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. Whashington DC: ASM Press, 1999, 870p.
- NAKAMA, A., TERAOKA, 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.
- NASCIMENTO, F.G.M.; CULLOR, S.J. Listeriose Humana – Epidemiologia e Fontes de Contaminação. **Higiene Alimentar**, v.8, n.32, p.13-17, 1994.
- NORTON, D.M. Polymerase chain reaction-based methods for detection of *Listeria monocytogenes*: toward real-time screening for food and environmental samples. **Journal. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.85, n.2, p.505-515, 2002.
- OKUTANI, A.; OKADA, Y.; YAMAMOTO, S.; IGIMI, S. Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan. **International Journal of Food Microbiology**, v.93, p.131-140, 2004.
- PERRIN, M., BEMER, M., DELAMARE, C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, 2003.
- ROCOURT, J., COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. IN: DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J. EDS. **Food microbiology: Fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 1997. P.337-352.
- RYSER, E.T., MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis, and food safety**. New York: Marcel Dekker, 1999. 738p.
- RYSER, E.T.; DONNELLY, C.W. *Listeria*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: APHA, 2001. p.343-353.
- SAIDE-ALBORNOZ, J., KNIPE, C.L., MURANO, E.A., BERAN, G.W. Contamination of pork carcasses during slaughter, fabrication, and chilled storage. **Journal of Food Protection**, v.58, n.9, p.993-997, 1995.
- SALAMINA, G.; DONNE, E.D.; NICCOLINI, A.; PODA, G.; CESARONI, D.; BUCCI, M.; FINI, R.; MALDINI, M.; SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BIBB, W.; ROCOURT, J.; BINKIN, N.; SALMOSO, S. A foodborne outbreak

- of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v.117, p.429- 436, 1996.
- SAMMARCO, M.L., RIPABELLI, G., RUBERTO, A., IANNITTO, G., GRASSO, GM. Prevalence of *Salmonelae*, *Listeriase*, and *Yersinia* in the slaughterhouse environment and on work surfaces, equipment, and workers. **Journal of Food Protection**, v.60, n.4, p.367-371, 1997.
- SCHLECH, F.; LAVIGNE, P.M. *et al.*, Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. **New England Journal of Medicine**, v.308, n.4, p. 203-208, 1983.
- SCHUCHAT A.; DEEVER, K., J.D. *et al.*, Role of foods in sporadic listeriosis: I. Case control study of dietary risk factors. **Journal of the American Medical Association**, v. 267, p. 2041-2045, 1992.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, A.C.V.; SILVEIRA, A.F.N. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997.
- SILVA, E.O.T.R., SOUZA, L.P., BALIAN, S.C. Isolamento e Identificação de *Listeria spp*, em quartos dianteiros de bovinos desossados. **Higiene Alimentar**, v.13, n.63, p.38-42, 1999.
- SILVA, I.M.M.; ALMEIDA, R.C.C.; ALVES, M.A.O.; ALMEIDA, P.F. Occurrence of *Listeria spp.* in critical control points and the environmental of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, p.241-248, 2003.
- STEKELENBURG, F. K. Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* in Frankfurter sausage by the addition of potassium lactate and sodium diacetate mixtures. **Food Microbiology**, v.20, p.133-137, 2003.
- SWAMINATHAN, B.; BARRETT , T. J.; HUNTER, S. B.; TAUXE, R. V. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. **Emerging Infectious Disease**, v.7, n.3, p.383-389, 2001.
- SWAMINATHAN, B. *Listeria monocytogenes*. In M. P. Doyle, L.R. Beuchat, and R. T. J. Montville (ed). **Food Microbiology**. ASM Press. Washington, D.C. p.383-410. 2000
- TRABULSI, L.R.; ALTHERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIRAS, J.A.N. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 3.ed., 1999. 586p.
- TRAN, H.T., KATHARIOU, S. Restriction Fragment Length Polymorphisms Detected with Novel DNA Probes Differentiate among Diverse Lineages of Serogroup 4 *Listeria monocytogenes* and Identify Four Distingt Lineages in Serotype 4b. **Appied and Environmental Microbiology**, v.68, p.50-64, 2002.

- TOMPKIM, R. B. Control of *Listeria monocytogenes* in the Food-processing Environment. **Journal of Food Protection**, v.65, p.709-725, 2002.
- 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.; NILSSON, I., ERICSSON, H; DANIELSSON-THAM, M-L., BILLE, J., BANNERMAN, E., TRAM, W. Division of *Listeria monocytogenes* serovar 1/2a strains into two groups by PCR and restriction enzyme analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65,n.5, p.2054-2056, 1999.
- VAN DEN ELZEN, A. M. G.; SNIJDERS, J. M. A. Critical points in meats production lines regarding the introduction of *Listeria monocytogenes*. **Veterinary Quarterly**, The Hage, v.15, n.4, p.143-145, 1993.
- VITAS, A.I., AGUADO, V., GARCIA-JALON, I. Occurrence of *L. monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v.90, p.349-356, 2004.
- VOGEL, B. F.; JORGENSEN, L.V.; OENIYI.; HUSS, H.H.; GRAM, L. Diversity of *L. monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon produced in different smokehouses as assessed by Randomo Amplified Polymorphic DNA analyses. **International Journal of Food Microbiology**, v.65, p.83-92, 2001.
- VON LAER, A., **Mapeamento da contaminação por *Listeria monocytogenes* em uma planta de processamento de lingüiça mista frescal através de sorologia e PFGE**. Pelotas, 2004.79f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPeL, 2004.
- WAGNER, M.; MADERNER, A.; BRANDL, E. Randomo Amplified Polymorphic DNA for tracing and molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* contamination in a cheese plant. **Journal of Food Protection**, v.59, n.4, p.384-389, 1996.
- WILLIAMS, J. G.; KUBELINK, 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**, 18, p.6531-6535, 1990.
- WARBURTON, D.W.; FABER, J.M. *et al.*, Comparison of methods for optimum detection of stressed and low levels of *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v. 9, n.2, p.127-145, 1992.
- WONG, S., STREET, D., DELGADO, S.I., KLONTZ, K.C. Recalls of foods and cosmetic due to microbial contamination reported to the U.S. Food and Drug Administration. **Journal Food Protection**, v.63, n.8, p.1113-1116, Aug.2000.

ZAHA, A. **Biología Molecular Básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 3 ed., 2001. 336p.

ZHENG, W.; KATHARIOU, S. Differentiation of epidemic-associated strains of *Listeria monocytogenes* by restriction fragment length polymorphism in a gene region essential for growth at low temperatures (4 °C). **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.61, p.4310-4314, 1995.