

DANILO AUGUSTO LOPES DA SILVA

**CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA EM AÇOUGUES E CARACTERIZAÇÃO DE
Listeria monocytogenes QUANTO A POTENCIAL PATOGÊNICO, ADESÃO E
SENSIBILIDADE A SANITIZANTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586c
2015

Silva, Danilo Augusto Lopes da, 1986-
Contaminação microbiológica em açougues e
caracterização de *Listeria monocytogenes* quanto a potencial
patogênico, adesão e sensibilidade a sanitizantes / Danilo
Augusto Lopes da Silva. – Viçosa, MG, 2015.
xii, 83f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Luis Augusto Nero.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Microbiologia veterinária. 2. Açougue. 3. Contaminação
microbiana. 4. *Listeria monocytogenes*. 5. Carne - Controle de
qualidade. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Veterinária. Programa de Pós-graduação em Medicina
Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.0896041

DANILO AUGUSTO LOPES DA SILVA

**CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA EM AÇOUGUES E CARACTERIZAÇÃO DE
Listeria monocytogenes QUANTO A POTENCIAL PATOGÊNICO, ADESÃO E
SENSIBILIDADE A SANITIZANTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADA EM 21 DE JULHO DE 2015

Paulo Sérgio de Arruda Pinto

Maria Emilene Martino Campos-Galvão

Luís Augusto Nero
(Orientador)

“Não é preciso ter olhos abertos para ver o sol, nem é preciso ter ouvidos afiados para ouvir o trovão. Para ser vitorioso você precisa ver o que não está visível.” ShunTzu

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me permitiu reconhecer que para ele nada é impossível e que nenhum dos seus planos pode ser impedido.

Agradeço aos meus pais Dejair e Elizeth, bem como aos meus irmãos Luana, Rafael e Lara, pela base forte que me proporcionam e o carinho e cuidado que a mim dedicam.

Agradeço a minha namorada Monique, pelo companheirismo e amor sem medidas.

Agradeço ao Professor Luís Augusto Nero, pelo braço amigo em todos os momentos deste trabalho.

Agradeço aos companheiros de laboratório, sobre tudo amigos, Marcus Vinícius, Frederico, Fábio, Petrônio, Rodrigo, Svestoslav, Dagoberto, Luís, Valéria, Monique, Natália, Luana e Raquel por estarem presentes em momentos distintos e me fazerem avançar pela ajuda que me dispensaram. Em especial, ao amigo Anderson peça fundamental na realização deste trabalho.

Agradeço à universidade Federal de Viçosa, bem como todos os professores, técnicos e funcionários que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Agradeço finalmente aos órgãos de fomento que subsidiaram a minha bolsa de Mestrado e o desenvolvimento dessa pesquisa: FAPEMIG, CNPq e CAPES.

CONTEÚDO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
Introdução	1
Revisão Bibliográfica.....	3
1. Ambiente de processamento e inocuidade (monitoramento microbiológico).....	3
2. Características de <i>Listeria monocytogenes</i>	5
3. Fatores de patogenicidade de <i>Listeria monocytogenes</i>	8
4. Relevância de <i>Listeria monocytogenes</i> em alimentos.....	15
5. Distribuição de <i>Listeria monocytogenes</i> em ambiente de processamento de produtos cárneos.....	17
Referências Bibliográficas	19
Objetivos	28
Objetivo geral.....	28
Objetivos específicos	28
Capítulo 1. Contaminação por micro-organismos indicadores de higiene e <i>Listeria monocytogenes</i> em açougues	29
Resumo.....	30
Abstract	31
Introdução	32
Material e Métodos	33
Amostragem	33
Análises microbiológicas	34
Enumeração de micro-organismos indicadores de higiene.....	34
Isolamento de <i>Listeria</i> spp. e <i>Listeria monocytogenes</i>	35
Análises moleculares.....	35
Caracterização dos sorogrupos de <i>Listeria monocytogenes</i>	35
Potencial de virulência de <i>Listeria monocytogenes</i>	36
Resultados e Discussão	37

Conclusão.....	41
Referências Bibliográficas	42
Capítulo 2. Potencial de adesão in vitro e virulência de <i>Listeria monocytogenes</i> e sensibilidade aos sanitizantes Mister Max-DG1 [®] e B-QUART SEPT [®]	52
Resumo.....	53
Abstract	54
Introdução	55
Material e Métodos	55
Amostragem	55
Isolamento e caracterização de <i>Listeria monocytogenes</i>	56
Análises microbiológicas convencionais	56
Análises moleculares.....	57
Potencial de adesão por <i>Listeria monocytogenes</i>	58
Efeito de sanitizantes sobre a adesão de <i>Listeria monocytogenes</i>	59
Sanitizantes	59
Concentração mínima inibitória dos sanitizantes sobre <i>Listeria monocytogenes</i>	60
Efeito dos sanitizantes na formação e eliminação de biofilmes por <i>Listeria monocytogenes</i>	60
Avaliação in loco do efeito dos sanitizantes sobre <i>Listeria monocytogenes</i>	61
Resultados e Discussão	61
Isolamento e caracterização de <i>Listeria monocytogenes</i>	61
Potencial de adesão por <i>Listeria monocytogenes</i>	63
Efeito de sanitizantes sobre a adesão de <i>Listeria monocytogenes</i>	64
Conclusão.....	68
Referências Bibliográficas	68
Conclusões	82

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1:Características bioquímicas de espécies de <i>Listeria</i> de acordo com Weller et al (2015).	7
--	---

CAPÍTULO 1

Tabela1: Número de amostras e procedimentos de coletas, em diferentes pontos de estabelecimentos comerciais de produtos cárneos, localizados no estado de Minas Gerais, Brasil.....	46
Tabela 2: Genes alvo e sequências de primers utilizados para identificação dos sorogrupos e caracterização potencial de virulência, do isolados obtidos no presente estudo.	47
Tabela 3: Médias ($\pm$ desvio padrão) de micro-organismos indicadores de higiene para cada fonte amostrada, em cada estabelecimento analisado.....	48
Tabela 4. Frequências de amostras com contagens de micro-organismos indicadores de higiene acima de valores referenciais.	49
Tabela 5: Frequências de amostras positivas para <i>Listeria</i> spp. e <i>Listeria monocytogenes</i> em ambiente, equipamentos e utensílios, em três estabelecimentos comerciais analisados.	50
Tabela 6: Frequências de amostras identificadas como positivas para diferentes sorogrupos de <i>Listeria monocytogenes</i> (número de isolados), em ambiente, equipamentos e utensílios, em três estabelecimentos comerciais analisados.	51

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Ocorrência de <i>Listeria</i> spp. e <i>L. monocytogenes</i> (número de isolados) em ambiente de processamento de um açougue localizado em Minas Gerais, Brasil.	74
Tabela 2: Potencial de adesão por isolados obtidos em diferentes amostras.	75
Tabela 3: Mínimas concentrações inibitórias para cada isolado de <i>L. monocytogenes</i> conforme cada sanitizante utilizado.	76
Tabela 4: Médias ($\pm$ desvio padrão) do pontencial de adesão dos isolados obtidos, com a co-inoculação dos sanitizantes A e B nas diluições de 1:64 e 1: 1.024, respectivamente.	77
Tabela 5: Médias ($\pm$ desvio padrão) do pontencial de adesão dos isolados obtidos, com a co-inoculação dos sanitizantes A e B em suas respectivas (MIC).	78

Tabela 6: Médias ($\pm$ desvio padrão) do efeito dos sanitizantes A e B nas diluições de 1:64 e 1: 1.024, na remoção do biofilme formado por cada isolado.....	79
Tabela 7: Médias ($\pm$ desvio padrão) do efeito dos sanitizantes A e B em suas respectivas (MIC), na remoção do biofilme formado por cada isolado.....	80
Tabela 8: Frequências de amostras positivas para <i>Listeria</i> spp. e <i>L. monocytogenes</i> na avaliação in loco do efeito dos sanitizantes.	81

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Esquema representativo da patogenicidade de *Listeria monocytogenes*, adaptado de las Heras et al., 2011). (A) O ciclo de infecção intracelular de *Listeria*. (1) a invasão celular é promovida por duas proteínas de superfície, as internalinas InlA e InlB, que através dos seus domínios (LRR) interagem com ligantes específicos na superfície da célula hospedeira (E-caderina e o fator de crescimento de hepatócitos o receptor tirosina cinase c-Met, respectivamente). (2) Isto resulta na invasão progressiva de bactérias por meio do mecanismo conhecido como "zipper" em um processo remanescente de fagocitose mediada pela claritina. (3) O vacúolo fagocítico é lisado através da ação de três fatores que atuam na membrana celular: formação de poros pela toxina listeriolisina O (LLO), e fosfolipases plcA e plcB (sendo o processamento deste último realizado pela metaloprotease Mpl após secreção). (4) As células bacterianas realizam uma rápida multiplicação no citosol da célula hospedeira sendo mantidas por células derivadas de fosfatos hexoses, obtidas através da Hpt perase. Uma característica fundamental da patogênese de *Listeria* é a capacidade de se disseminar através de tecidos do hospedeiro, permanecendo protegida contra as defesas do hospedeiro extracelulares via propagação direta célula-célula. Este mecanismo é mediado pela proteína de superfície ACTA, que subverte a sinalização do sistema imune do hospedeiro e induz a polimerização de actina, impulsionando a bactéria através do citoplasma. ACTA, também tem sido relacionada em contribuir para a internalização celular. (6) Quando a bactéria alcança a periferia da célula, elas se projetam no interior da célula através de estruturas semelhantes à pseudópodes denominadas 'listeriopods', que determinam a invasão das células vizinhas. Este processo é auxiliado pela menor internalina secreta (inlc), que relaxa tensão das junções celulares através da interação com o TUBA, um regulador do complexo de junções celular. (7) A fagocitose destas estruturas por células adjacentes resulta na formação de um vacúolo de membrana dupla a partir do qual a *Listeria* pode novamente escapar da célula hospedeira, iniciando um novo ciclo de proliferação, motilidade à base de actina e propagação intercelular (Suarez et al., 2001; Chico-Calera et al., 2002; Hamon et al., 2006; Scortti et al., 2007; Rajabian et al., 2009). 12

RESUMO

SILVA, Danilo Augusto Lopes da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2015. **Contaminação microbiológica em açougues e caracterização de *Listeria monocytogenes* quanto a potencial patogênico, adesão e sensibilidade a sanitizantes.** Orientador: Luís Augusto Nero.

Listeria monocytogenes pode contaminar produtos cárneos principalmente através de contaminação cruzada de utensílios expostos a produtos crus. A qualidade destes produtos pode ser ainda estimada através da pesquisa de micro-organismos indicadores de higiene, o que não isenta a pesquisa de patógenos para garantia de inocuidade. A contaminação por *L. monocytogenes* em ambientes de processamento de alimentos é de difícil controle, devido a sua ampla disseminação e adaptação, o que demanda monitoramento constante e adoção de procedimentos eficientes para eliminação desse patógeno. A primeira etapa deste trabalho identificou as principais fontes de contaminação microbiológica no ambiente de processamento de três açougues, quando amostras superficiais foram obtidas de mesas, facas, interior do balcão refrigeração, moedores e amaciadores de carne (20 amostras por área) e submetidas à enumeração de micro-organismos indicadores de higiene, e pesquisa de *L. monocytogenes*, cujos isolados obtidos foram caracterizados quanto aos seus sorogrupos e genes de virulência. Os resultados demonstraram que não houve diferenças nos níveis de contaminação por micro-organismos indicadores de higiene entre os três estabelecimentos analisados; as amostras com contagens acima de valores referenciais indicaram ineficiências nos procedimentos de higienização praticados. 87 amostras apresentaram resultado positivo para *Listeria* spp. (60,4 %), sendo 22 amostras de mesa, 20 de moedor, 16 de faca, 13 de mão, 9 de amaciador e 7 do balcão de refrigeração. Um total de 31 amostras (21,5 %) foram positivas para *L. monocytogenes*, indicando a presença do patógeno no ambiente de processamento de produtos cárneos. Na caracterização dos sorotipos, 52 isolados foram caracterizados como pertencentes aos sorogrupos 1/2c ou 3c, e 22 isolados como pertencentes aos sorogrupos 4b, 4d, 4a ou 4c. Na pesquisa dos genes de virulência, todos os 74 isolados apresentaram resultados positivos para os genes *hlyA*, *iap*, *plcA*, *actA* e para o grupo das internalinas (*inlA*, *inlB*, *inlC* e *inlJ*). Na segunda etapa do estudo, foi avaliado a ocorrência de *L. monocytogenes* (ISO 11.290 1/2) em utensílios e ambiente de manipulação em um açougue, e os isolados obtidos foram caracterizados quanto aos seus sorogrupos e genes de virulência e ainda avaliados quanto à capacidade

de adesão in vitro e sensibilidade a dois sanitizantes (Mister Max-DG1[®] e B-QUART SEPT[®]). Do total de 40 amostras de mesas, facas, interior do balcão refrigeração, moedores e amaciadores de carne, 75 % foram positivas para *Listeria* spp. e 22,5 % para *L. monocytogenes*. Todos os isolados obtidos foram caracterizados como sorogrupos 1/2c ou 3c, e apresentaram resultados positivos para todos os genes de virulência analisados. Adicionalmente, todos os isolados apresentaram algum potencial de adesão, em sua maioria apresentando potenciais de adesão variando de fraco a moderado, sendo que somente um isolado apresentou um forte potencial de adesão. Os sanitizantes avaliados apresentaram potencial para inibir a multiplicação dos isolados em diferentes concentrações (1:256 a 1:512 para Mister Max-DG1[®], e 1:4.096 a 1:16.384 para B-QUART SEPT[®]), e interferiram na formação e remoção de biofilmes pelos isolados. Após avaliação, os sanitizantes foram adotados na rotina de higienização do estabelecimento comercial, e após 2 meses, amostras superficiais dos mesmos utensílios e equipamentos foram coletadas e submetidas a análise de *L. monocytogenes*, e nenhum resultado positivo foi identificado. Os resultados obtidos permitiram caracterizar os sorogrupos dos isolados de *L. monocytogenes* obtidos bem como a o seu potencial virulento, foi também demonstrado o potencial de adesão de *L. monocytogenes* e a eficiência dos sanitizantes Mister Max-DG1[®] e B-QUART SEPT[®] para o controle da contaminação por esse patógeno. Os resultados indicam que o estabelecimento de procedimentos adequados para redução das contagens microbianas e controle da disseminação de *L. monocytogenes* nas etapas finais da cadeia produtiva da carne é de extrema importância, com reflexos evidentes na qualidade e inocuidade dos produtos cárneos destinados ao consumo humano. Adicionalmente, verificou-se o potencial de adesão de *L. monocytogenes* e a eficiência dos sanitizantes Mister Max-DG1[®] e B-QUART SEPT[®] para o controle da contaminação superficial por esse patógeno.

ABSTRACT

SILVA, Danilo Augusto Lopes da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015.
Listeria monocytogenes in butcher shops: occurrence in the environment, adhesion potential and sensitivity to sanitizers. Adviser: Luís Augusto Nero.

Listeria monocytogenes can contaminate meat products primarily through cross-contamination of utensils exposed to raw products. The quality of these products can still be estimated through the research of hygiene indicator microorganisms, which does not exclude the research of pathogens to assure the food safety. Contamination by *L. monocytogenes* in food processing environments is difficult to control due to its wide dissemination and adaptation, which requires constant monitoring and adoption of efficient procedures to eliminate this pathogen. In the first step of this study, we identified the main sources of microbiological contamination in three butchers processing environment by collecting surface samples from the hands of employees, tables, knives, inner of butcher display, grinders and meat tenderizers (24 samples per area). Samples were subjected to enumeration of hygiene indicator microorganisms and detection of *L. monocytogenes*, being the isolates characterized for their virulence genes and serogroups. The results demonstrated absence of differences in the levels of contamination by hygiene indicators microorganisms analyzed between the three butcher shops; samples with counts higher than reference values indicated inefficiency in practiced hygiene procedures. 87 samples were positive for *Listeria* spp. (60.4 %), being 22 samples from table, 20 from grinders, 16 from knives, 13 from hands, 9 from meat tenderizers and 7 from the inner of butcher display. 31 samples (21.5 %) were positive for *L. monocytogenes*, indicating the presence of the pathogen in meat processing environment. 52 isolates were characterized as belonging to serogroup 1/2c or 3c, and 22 isolates belonged to serogroups 4b, 4d, 4a or 4c. All 74 isolates showed positive results for *hlyA* genes, *iap*, *plcA*, *actA* and the group of internalins (*InlA*, *InlB*, *InlC* and *InlJ*). In the second step of the study, we evaluated the occurrence of *L. monocytogenes* in the processing environment of a butcher shop, and the obtained isolates were characterized as to their serogroups and virulence genes and further evaluated for in vitro adhesion capacity sensitivity to two sanitizers (Mister Max-DG1[®] and B-QUART SEPT[®]). Of the total of 40 samples hands of manipulators, tables, knives, inner of butcher display, grinders and meat tenderizers, 75 % were positive for *Listeria* spp. and 22,5 % for *L. monocytogenes*. All isolates were

characterized as belonging to serogroup 1/2c or 3c, and showed positive results for all virulence genes analyzed. In addition, all isolates showed some potential of adhesion, mostly presenting potential of adhesion ranging from weak to moderate, and only one isolate showed a strong potential. The evaluated sanitizers had potential to inhibit the multiplication of isolates in different concentrations (1: 256-1: 512 for Mister Max-DG1[®], and 1: 4096-1: 16,384 for B-QUART SEPT[®]), and interfered in the formation and removal of the biofilms. After evaluation, the sanitizers were adopted by the butcher shop cleaning routine, and after two months surface samples from the same utensils and equipment were collected and subjected to *L. monocytogenes* analysis, and no positive result was identified. The results allowed to characterize the sorugrupos of *L. monocytogenes* isolates obtained as well as their virulent potential, it has also demonstrated the potential of adhesion of *L. monocytogenes* and the effectiveness of sanitizers Mister Max-DG1[®] and B-QUART SEPT[®] to control contamination by this pathogen. Results indicate that the establishment of appropriate procedures to reduce microbial counts and controlling the spread of *L. monocytogenes* in the final stages of meat production chain is of utmost importance, with obvious effects on the quality and safety of meat products for human consumption. Additionally, it was found *L. monocytogenes* adhesion potential and the efficiency of the sanitizing Mister Max- DG1[®] and B -quart SEPT[®] for the control of surface contamination by these pathogens.

INTRODUÇÃO

Devido a sua natureza ubíqua, cepas de *Listeria monocytogenes* têm sido encontradas amplamente distribuídas na natureza, sendo isoladas de diversas fontes ambientais e podendo contaminar uma grande variedade de alimentos, principalmente produtos cárneos (Vázquez-Boland et al., 2001). *L. monocytogenes* é motivo de grande preocupação em saúde pública, por ser responsável pela listeriose, uma doença infecciosa, causada principalmente pelo consumo de alimentos contaminados (Ghandi et al., 2007) e que pode provocar entre outras sintomatologias: abortos, meningites, septicemias e encefalites (Dussurget et al., 2004; Cossart et al., 2004; Pizarro-Cerda et al., 2006). Listeriose é uma doença com alta taxa de casos fatais e que ocorre em grupos de risco bem definidos, incluindo indivíduos idosos, mulheres grávidas, recém-nascidos e imunocomprometidos (Farber & Peterkin, 1991).

As mudanças nos hábitos e características alimentares, o modo de produção dos alimentos, a habilidade de sobreviver em condições adversas, à capacidade de se multiplicar em temperatura de refrigeração, aliado à resistência ao congelamento, ao calor e a diversos antibióticos, tornaram *L. monocytogenes* um micro-organismo emergente e de grande importância entre os patógenos veiculados por alimentos, e atualmente representa um grande problema para as indústrias de alimentos e órgãos oficiais de regulamentação (Donnelly et al., 1992).

O monitoramento de parâmetros de qualidade e higiene nas linhas de processamento de produtos cárneos é uma ferramenta importante para garantir a qualidade dos produtos finais aos consumidores. Estudos epidemiológicos que busquem identificar a origem da contaminação de cepas patogênicas são de fundamental importância para garantia da qualidade e segurança microbiológica de produtos cárneos. As metodologias moleculares podem ser aplicadas para uma identificação precisa da origem da contaminação, fornecendo informações importantes sobre a ecologia, epidemiologia e variabilidade genética das cepas identificadas. Para garantia da segurança microbiológica dos produtos cárneos a pesquisa de patógenos é imprescindível. Desta maneira, patógenos frequentemente associados à carne bovina, como *L. monocytogenes*, devem ser pesquisados e controlados em linhas de processamento (Borch & Arinder, 2002).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de *L. monocytogenes* em ambientes de processamento de produtos cárneos em açougues, pelo isolamento e caracterização desses patógenos em utensílios e equipamentos. Adicionalmente, o estudo teve como objetivo avaliar o potencial de adesão de isolados obtidos, assim como a

sensibilidade a dois sanitizantes comumente utilizados durante a higienização nesses estabelecimentos comerciais.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Ambiente de processamento e inocuidade (monitoramento microbiológico).

As carnes e seus derivados têm sido frequentemente associados a importantes surtos de doenças veiculadas por alimentos (Mena et al., 2004). Os processos envolvidos na produção, elaboração e armazenamento destes produtos os expõe à contaminação por bactérias patogênicas entre outros organismos e substâncias (Catão et al., 2001). A contaminação pós-processamento é uma frequente causa da contaminação das carnes e seus derivados, tanto por contaminação cruzada, que pode ocorrer dentro da própria indústria, quanto por contaminação no ponto de distribuição ou venda do produto (Carpentier et al., 2011). Desta maneira as instalações, os equipamentos e utensílios utilizados no ambiente de processamento destes produtos tem sido alvo de estudos, que visam identificar os principais focos de contaminação deste ambiente bem como estabelecer sua relação com a contaminação dos produtos finais (Gill et al., 2006).

Para que as carnes e seus derivados atinjam os padrões internacionais de qualidade e inocuidade na etapa final da cadeia, o monitoramento constante de parâmetros de qualidade e higiene nos diferentes ambientes de manipulação e processamento de produtos cárneos é crucial. Este monitoramento utiliza sistemas que frequentemente são utilizados pelas indústrias de alimentos, e são também aplicados na pesquisa sistemática de indicadores biológicos (micro-organismos indicadores de higiene) em pontos específicos da linha de processamento e manipulação de produtos cárneos (Johnston et al., 2000). A eficiência destes sistemas é comprovada, e a partir desses indicadores é possível a tomada de medidas corretivas a fim de minimizar ou evitar possíveis contaminações (Gill et al., 2006).

A inocuidade e a qualidade de produtos cárneos, bem como as condições higiênico-sanitárias das instalações onde são processados, podem ser estimadas através da pesquisa de diversos micro-organismos indicadores de qualidade, como por exemplo, os aeróbios mesófilos e coliformes (Jay et al., 2005). A enumeração de aeróbios mesófilos é realizada a fim de se obter uma estimativa da população geral de micro-organismos que estão presentes no ambiente e itens utilizados no processamento de produtos cárneos, onde altos níveis de contaminação estão associados à higienedeficiente (Gill et al., 1998; Jay et al., 2005). Os coliformes são considerados indicadores de condições higiênico sanitarias inadequadas nas etapas de processamento, produção e armazenamento de alimentos, sendo que sua presença não indica

necessariamente contaminação fecal recente ou presença de enteropatógenos. *Escherichia coli* é outro indicador clássico da provável presença de micro-organismos patogênicos entéricos, sendo que sua presença em níveis elevados pode estar associada à presença de outros patógenos como *Salmonella* spp.; adicionalmente, cepas de *E. coli* são bons indicadores de avaliação das condições da qualidade sanitária de alimentos processados (Eisel et al., 1997; Jay et al., 2005).

As superfícies de corte, bem como equipamentos e utensílios com higienização deficiente, têm sido responsáveis, isoladamente ou associados a outros fatores, por surtos de doenças associadas a consumo de alimentos ou por alterações de alimentos processados (Andrade & Macêdo, 1996). Existem relatos de que equipamentos e utensílios contaminados participam do aparecimento de aproximadamente 16 % dos surtos de origem alimentar (Freitas, 1995). Equipamentos como cortadores de frios, bem como amaciadores de carne, entre outros, devem passar constantemente por uma avaliação microbiológica a fim de se obter o controle da eficiência do procedimento de higienização, evitando-se a contaminação dos alimentos processados e eventualmente produzidos (Andrade & Macêdo, 1996).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os manipuladores são considerados responsáveis direta ou indiretamente por até 26 % dos surtos de doenças bacterianas veiculadas por alimentos (Freitas, 1995). Esse envolvimento é ampliado em situações em que os manipuladores estejam doentes, sejam portadores assintomáticos, apresentem hábitos de higiene pessoal inadequados, ou ainda utilizem métodos não higiênicos na preparação de alimentos (Cardoso et al., 1996).

Apesar da legislação brasileira não estabelecer limites para a contagem de micro-organismos em superfícies de processamento de alimentos, a simples presença de patógenos, nos ambientes de manipulação e processamento dos produtos cárneos reforça a necessidade de procedimentos de higienização adequados, especialmente em produtos prontos para consumo, de forma a prevenir a ocorrência de doenças associadas ao consumo de alimentos (Maluf et al., 1996; Mendes et al., 2004). De acordo com os padrões do *Foods and Drug Administration* (FDA) e da *American Public Health Association* (APHA), um utensílio pode ser considerado limpo quando possuir contagem de aeróbios mesófilos inferior a 100 UFC/utensílio; para equipamentos, o valor referencial é 2 UFC/cm². A Organização Panamericana da Saúde (OPAS) considera a condição higiênica de utensílios conforme a contagem superficial de aeróbios mesófilos, como excelente aqueles utensílios que apresentem contagens entre 0 e 10 UFC, bom entre 10 e 29 UFC, regular entre 30 e 49 UFC, ruim entre 50 e 99 UFC,

e péssimo maior que 100 UFC (Moreno, 1982). Para alguns autores estes padrões são rigorosos para o Brasil, devido as condições climáticas aqui existentes, e adotam 50 UFC/cm² para bactérias mesófilas, e ausência de coliformes a 45 °C, na área amostrada dos utensílios (Silva et al., 1997). Harrigan & Maccance (1976) estabeleceram que equipamentos e utensílios apresentando contagens entre 5 e 25 UFC/cm² deverão ser lavados novamente e contagens acima de 25 UFC/cm² indicam situação não satisfatória de higiene.

Além desses indicadores de higiene, a pesquisa direta de micro-organismos patogênicos no ambiente de processamento de produtos cárneos é de extrema importante para garantia da segurança de produtos cárneos. Desta maneira, patógenos frequentemente associados às carnes e seus derivados, como *L. monocytogenes* são rotineiramente pesquisados e controlados no ambiente e superfícies.

2. Características de *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* pertence a um grupo de bactérias com baixo conteúdo de G+C em seu DNA, variando em torno de 36 % (G) a 42 % (C), é relacionada aos patógenos *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. (Monteville et al., 2005).

O gênero *Listeria* foi recentemente caracterizado em 17 espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimer*, *L. marthii*, *L. grayi*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensis*, *L. fleischmannii*, *L. aquática*, *L. floridensis*, *L. newyorkensis* e *L. booriae* (Weller et al., 2015) (Tabela 1). Somente duas espécies, *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*, são patogênicas. *L. ivanovii* é considerada patogênica apenas para animais e embora *L. monocytogenes* seja a única espécie frequentemente associada com a listeriose humana (Lindsted et al., 2008), há relatos de *L. ivanovii* e *L. seeligeri* relacionadas a casos de doenças em humanos (Gasarov et al., 2005; Zhang et al., 2007).

Como as demais espécies de *Listeria*, *L. monocytogenes* apresenta-se como bacilos curtos, possuindo aproximadamente 0,4-0,5µm de diâmetro e 1-2µm de comprimento. São bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos e com ausência de cápsula celular (Gray et al. 1966; Low et al. 1997). Em meios de cultura semi-sólidos, *Listeria* spp., apresenta motilidade devido à presença de flagelos peritríquios quando incubada a 25 °C (Farber & Peterkin, 1991). Essa motilidade típica é característica de *Listeria* spp. ocorrendo em forma de “guarda-chuva”, devido à sua

natureza de microaerofilia (Ryser et al., 1999). As espécies do gênero *Listeria* são bactérias anaeróbias facultativas com metabolismo fermentativo, e multiplicam-se bem em ambientes com baixa quantidade de oxigênio e aumento na tensão de gás carbônico, como no caso de alimentos embalados a vácuo ou em atmosfera modificada (Nilsson et al., 2000).

L. monocytogenes possui uma ampla capacidade de sobrevivência e adaptação a situações ambientais adversas, tolerando altas concentrações de sal (10 %), grandes variações de pH (entre 4,3 e 9,4), e atividade de água de até 0,92 (Hain et al., 2007). Ainda é capaz de multiplicar-se em uma ampla faixa de temperatura, entre -0,4 °C a 50 °C, sendo a temperatura ótima 37 °C, suportando ainda repetidos congelamentos e descongelamentos (Swaminathan et al., 2007). Essa característica psicrófila depende da integridade celular e do sistema de transporte energético resistente ao frio, que estimula o metabolismo sob baixas temperaturas, propiciando altas concentrações de substratos intracelulares e uma fase lag prolongada em temperaturas de refrigeração (Oliveira et al., 1993).

As cepas de *L. monocytogenes* possuem diferentes determinantes antigênicos expressos em sua superfície, os quais incluem ácidos lipoprotéicos, proteínas de membrana e organelas extracelulares (Ryser et al., 1999), que são identificadas e determinadas com base nos antígenos somáticos (O) e flagelares (H).

A classificação sorológica de *L. monocytogenes* exige tipagem dos antígenos O e H, efetuada em laboratórios especializados, e é utilizada basicamente para estudos epidemiológicos. Os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b constituem mais de 90 % das cepas isoladas de seres humanos (Swaminathan et al., 2007). As cepas de *L. monocytogenes* têm sido classificadas em três principais linhagens evolucionárias (Piffaretti et al. 1989; Wiedmann et al. 1997): (i) a linhagem I, consiste nos sorotipos 4b, 1/2b, 3c e 3b, (ii) linhagem II, os sorotipos 1/2a, 1/2c e 3a e (iii) linhagem III, recentemente descrita contendo os sorotipos 4a e 4c. A grande heterogeneidade antigênica de *L. monocytogenes* pode estar relacionada com o grande número de hospedeiros animais nos quais é capaz de multiplicar-se (Jay et al., 2005).

Tabela 1:Características bioquímicas de espécies de *Listeria* de acordo com Weller et al.(2015).

Característica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-
Redução de nitrato	-	-	-	-	-	-	V	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Motilidade	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vermelho de metila	+	+	+	+	+	+	+	V	V	V	+	V	+	+	+	+	+
Hemólise	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arylamidase	-	+	+	V	V	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
a-Mannosidase	+	+	-	-	+	+	V	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
PI-PLC	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acidificação de:																	
D-Arabitól	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	V	+	-	-	-	+
D-Xylose	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Rhamnose	+	V	-	-	V	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	V	+
a-Methyl D-glucoside	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
D-Ribose	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	V	+	+	+	-	+	V
Glucose 1-phosphate	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
D-Mannitol	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	V	-	V	-	-	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-
Turanose	-	V	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-
Glycerol	V	+	+	+	+	-	V	+	+	V	-	-	+	V	-	+	+
D-Galactose	V	-	-	V	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	+	-	-	+	+	+	+
L-Sorbose	V!	V!	-	V!	-	V!	V!	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	V	V	-	-	-
Methyl a-D-mannose	-	-	ND	-	ND	-	+	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	V!	(+)	+	-	+	-	+	+	+
Melibiose	V!	V	-	-	-	V	-	+	-	-	V	-	V	-	-	-	+
Inulina	V!	V!	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Melezitose	V	V	V	V	V	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-
D-Lyxose	V	V	-	-	V	-	V	-	-	-	-	-	-	V	+	-	-
D-glucose	V!	V!	+	V!	+	V!	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Cepas: 1, *L. monocytogenes*; 2, *L. innocua*; 3, *L. seeligeri*; 4, *L. ivanovii*; 5, *L. welshimeri*; 6, *L. marthii*; 7, *L. grayi*; 8, *L. rocourtiae*; 9, *L. weihenstephanensis*; 10, *L. cornellensis*; 11, *L. riparia*; 12, *L. grandensis*; 13, *L. fleischmannii*; 14, *L. aquatica*; 15, *L. floridensis*; 16, *L. newyorkensis*; 17, *L. booriae*. Todas as espécies são catalase-positiva e positivas para a produção de ácido a partir da esculina citrato férrico, N-acetilglucosamina, amigdalina, arbutina, salicina, celobiose, D-frutose e D-manose. Todos são negativos para a redução de nitrito e produção de ácido a partir de D-arabinose, D-adonitol, metilo β-D-xilopiranosido, rafinose, glicogênio, L-fucose, gluconato de potássio, 2-ketogluconato e de potássio a 5-ketogluconato. +, Positiva; (+) Fracamente positivo; -, Negativo; V, variável (entre replicados e / ou entre estirpes); V! variável entre os estudos (possivelmente devido a diferenças nos tempos e temperaturas de incubação entre os estudos); ND, não determinado ou não registrados. PI-PLC, phosphoinositide fosfolipase C.

Em geral, cepas do sorotipo 4b são mais frequentemente associadas com surtos de listeriose, enquanto cepas incluídas nas linhagens que agrupam os sorotipos 1/2 são mais relacionadas com produtos alimentícios. Embora os sorotipos 1/2a e 1/2b sejam os mais isolados de alimentos, são as cepas do sorotipo 4b que causam mais de 50% dos casos da doença em todo o mundo (Borucki et al., 2003), o que sugere que o sorotipo 4b é mais bem adaptado aos tecidos de células de hospedeiros mamíferos do que osorogrupo 1/2 (Vazquez-Boland et al., 2001). Duas hipóteses que podem explicar a aparente predominância das cepas sorotipos 4b, 1/2a e 1/2b em casos de listeriose humana: 1) os humanos são comumente mais expostos a estes sorotipos de *L. monocytogenes*; 2) esses subtipos apresentam potencial patogênico para humanos (Wiedmann et al., 2002).

3. Fatores de patogenicidade de *Listeria monocytogenes*

A sobrevivência a condições ambientais estressantes envolve uma resposta adaptativa mediada por um grupo de proteínas conservadas, quando a bactéria é exposta a condições que prejudicam sua multiplicação, como baixos níveis de pH, agentes oxidantes, choque térmico, restrição de nutrientes e ação de compostos químicos tóxicos. A tolerância a níveis de pH ácidos, como o encontrado determinados alimentos, no estômago, ou no interior dos fagossomos, apresenta-se relevante na patogênese de *L. monocytogenes*. Nestas condições *L. monocytogenes* sintetizam proteínas que funcionam como chaperonas, auxiliando na montagem ou na re-conformação adequada das proteínas danificadas pelo estresse; ou ainda atuam como proteases, que degradam as proteínas danificadas, garantindo um funcionamento correto das vias fisiológicas nas células estressadas (Trabulsi et al., 2005).

Na estrutura genética de *L. monocytogenes*, existe uma região central onde são encontrados os seis principais genes de virulência deste patógeno. Esta região é denominada de LIPI-1 (Ilha de patogenicidade de *Listeria* 1) e dela fazem parte os genes *prfA*, *plcA*, *hly*, *actA*, *22* *plcBe* *Mpl*. O gene *prfA* atua na regulação global dos genes de virulência em *L. monocytogenes*. Seu produto, a proteína PrfA (positive regulatory factor A), é principal regulador identificado até o momento em *Listeria* spp., diretamente envolvido no controle da expressão de grande parte dos genes de virulência da bactéria (Vazquez & Boland et al., 2001; de las Heras et al., 2011).

A listeriolisina O (LLO) é uma hemolisina (Hly) que pertence à família das toxinas formadoras de poros, colesterol dependentes, sendo necessária para a sobrevivência e proliferação de *L. monocytogenes* dentro de macrófagos e fagócitos, e é considerada o principal fator de virulência do patógeno. Com um pH ótimo entre 4,5 e 6,5 (como no ambiente acidificado dos vacúolos), esta hemolisina é capaz de causar a lise da membrana do fagossomo, e o rompimento do vacúolo de dupla membrana formado durante o espalhamento de célula a célula (Vazquez-Boland et al., 1989). Também permite a multiplicação intracelular e a sobrevivência da bactéria dentro dos macrófagos e das células não fagocitárias, bem como a resposta imune do hospedeiro. A ação dessa proteína pode ser visualizada ao redor de colônias em ágar sangue (Cossart et al. 2002).

L. monocytogenes produz duas fosfolipases C, denominadas PlcA e PlcB, que são capazes de promover a degradação dos fosfolipídios presentes na membrana dos fagossomas. A PlcB desempenha um papel primordial na patogênese das infecções por *L. monocytogenes*, por ser capaz de degradar a maioria dos fosfolipídios de membrana, enquanto a PlcA parece potencializar a atividade da primeira (Niebuhr et al., 1993). Na etapa onde a bactéria fica confinada no vacúolo, a listeriolisina provoca a formação de poros e lesões na membrana, o que facilita o acesso das fosfolipases, que por sua vez irão lisar e dissolver a barreira que delimita o compartimento do fagossoma (Goldefine et al., 2002).

As internalinas são proteínas que induzem a internalização de *L. monocytogenes* por células epiteliais não fagocíticas *in vitro*. Essas proteínas são codificadas por uma família de múltiplos genes, e dois deles (InlA e InlB) codificam duas internalinas particularmente importantes para a patogenicidade de *L. monocytogenes*: InlA e InlB. Estas internalinas apresentam, em comum, um domínio repetido rico em leucina (leucine-rich repeats-LRR), envolvido nas interações proteína-proteína. A proteína InlA tem como receptor a E-caderina, uma glicoproteína encontrada nas gap junctions e na região basolateral de células epiteliais intestinais (Pizzarro -Cerdeira et al., 2006). A E-caderina também está presente nas células dendríticas e endoteliais da microvasculatura cerebral, na superfície dos hepatócitos, nas vilosidades coriônicas da placenta e nas células epiteliais que cobrem o plexo coróide. (Trabulsi et al., 2005).

InlA é restrita às células que expressam E-caderina, enquanto InlB é capaz de induzir a entrada da bactéria em uma variedade de tipos celulares, incluindo linhagens epiteliais e de fibroblastos, tais como células Vero, HEP-2, HeLa, CHO, L2 e S180,

bem como hepatócitos e células endoteliais (Trabulsi et al., 2005). Existe também a InlC, que não está envolvida no processo de entrada na célula epitelial, mas pode estar envolvida na virulência, expressada quando a infecção está na fase de espalhamento intercelular ativo, participando da disseminação da infecção (Vazquez-Boland et al., 2001). Estudos demonstram a existência de outras internalinas presentes no mecanismo de infecção, que são identificadas como: InlC2, InlD, InlE, InlF, InlG e InlH. Porém, estas proteínas estariam envolvidas na colonização dos tecidos e ainda podem não estar relacionadas com a virulência (Vazquez-Boland et al., 2001).

A proteína ActA (Actin Nucleating Factor) é uma proteína baseada em actina secretada pela célula bacteriana tendo um papel essencial na motilidade. *L. monocytogenes* é capaz de se mover através do citoplasma da célula hospedeira impulsionada por uma longa cauda de actina polimerizada. As bactérias intracitoplasmáticas, após escaparem do fagossomo, são envolvidas por uma camada de monômeros de actina, que posteriormente são reorganizados em um dos pólos do micro-organismo, formando caudas que atingem até 40µm de comprimento. Esta reorganização é codificada por um único gene, *actA*. A proteína ActA madura possui três domínios distintos e importantes para o movimento da célula bacteriana: N-terminal rico em resíduos catiônicos; região central rica em unidades repetidas de prolina e domínio C-terminal, hidrofóbico, que ancora a proteína em uma das extremidades da célula bacteriana. (Kockset al., 1992). Alguns dos fatores envolvidos na polimerização da actina e que auxiliam na montagem e regulação dos filamentos são: a VASP (Vasodilatador Stimulated Phosphoprotein) e as proteínas Arp2 e Arp3. (Cossart et al., 2002).

A p60 é outra proteína que é codificada pelo gene *iap* (invasor-associated protein) e está associada com o fenótipo rugoso que ocorre espontaneamente quando *L. monocytogenes* é semeada em placas de ágar. As bactérias com esse fenótipo são caracterizadas pela formação de estruturas filamentosas longas, compostas por cadeias de células individuais (Hess et al., 1995).

Codificada pelo gene *mpl* a metaloprotease contribui indiretamente para a virulência da *L. monocytogenes*, estando possivelmente envolvida no processamento da fosfolipase PlcB; está relacionada com a maturação de PlcB, já que esta é secretada pela bactéria na forma de proenzima inativa (Vazquez-Boland et al., 2001). O ferro é um elemento importante para a multiplicação de *L. monocytogenes* nos tecidos do hospedeiro, servindo como cofator para uma grande variedade de enzimas e proteínas

essenciais envolvidas nos processos de transporte de elétrons. Ele também é importante na regulação da expressão de genes de virulência (Trabulsi et al., 2005).

A pesquisa do grupo de genes conhecidos como internalinas (inlA, inlB e inlC), que estão associados com o ciclo de virulência de *L. monocytogenes*, ou ainda a investigação da presença de diferentes fatores de virulência utilizando primers que ligam regiões altamente conservadas como as regiões dos genes hlyA (listeriolisina O, uma toxina formadora de poros; β -hemolisina), iap (gene associado a invasão), inl (grupo de internalinas), actA (proteína associada a mobilidade célula-célula) e prfA (proteína reguladora para ativação de cluster de virulência) é importante para indicar o potencial patogênico de cepas isoladas (Liu et al. 2007; Zubanovic et al. 2011).

A figura 1 representa as etapas envolvidas na patogênese de *L. monocytogenes* ilustrando os principais processos e genes envolvidos.

A utilização de técnicas moleculares tem sido empregada na pesquisa dos genes relacionados à virulência em *L. monocytogenes*, de maneira a caracterizar as cepas que abrigam este potencial virulento bem como esclarecer a verdadeira contribuição desses genes na patogênese deste micro-organismo. A reação em cadeia da polimerase (PCR) possui a capacidade de amplificar seletivamente alvos específicos, que poderão estar ou não associados à virulência, sendo bastante empregada na caracterização de *L. monocytogenes*. Oferece ainda excelente sensibilidade, especificidade e facilidade de automação na detecção laboratorial de *L. monocytogenes*. Esta técnica possibilita detectar diferentes espécies de *Listeria* em uma única corrida, ou ainda a investigar a presença de diferentes fatores de virulência. Trabalhos descrevem a detecção simultânea de vários desses fatores de virulência, por meio da utilização de primers que ligam regiões altamente conservadas como as regiões dos genes hlyA (listeriolisina O, uma toxina formadora de poros; β -hemolisina), iap (gene associado a invasão), inl (grupo de internalinas), actA (proteína associada a mobilidade célula-célula) e prfA (proteína reguladora para ativação de cluster de virulência) (Vazquez-Boland et al., 2001; Liu et al., 2006). A PCR contribui para uma rápida caracterização de isolados obtidos de diferentes ambientes. A PCR multiplex para identificação dos genes inlA, inlC e inlJ descrito por Liu et al. (2007) mostrou-se eficiente na caracterização da virulência de *L. monocytogenes* isolados de vegetais prontos para consumo comercializados na cidade de São Paulo, Brasil.

Além dos mecanismos relacionados à virulência, a capacidade de *L. monocytogenes* de se estabelecer em diferentes superfícies mesmo sob condições ambientais adversas tem tornado o potencial de adesão destas cepas outro importante

foco de estudo. Estudos mostram que *L. monocytogenes* é capaz de aderir e formar biofilme em superfícies que frequentemente entram em contato com alimentos (Blackman et al., 1996), tais como poliestireno, vidro e aço inoxidável.

A formação de biofilmes determina risco no ambiente de processamento de produtos cárneos, pois pode representar uma importante fonte de contaminação de materiais ou alimentos que entram em contato com eles, bem como a capacidade de resistir à dessecação, a tratamentos com raios UV e agentes sanitizantes (Borucki et al., 2003; Folsom et al., 2006).

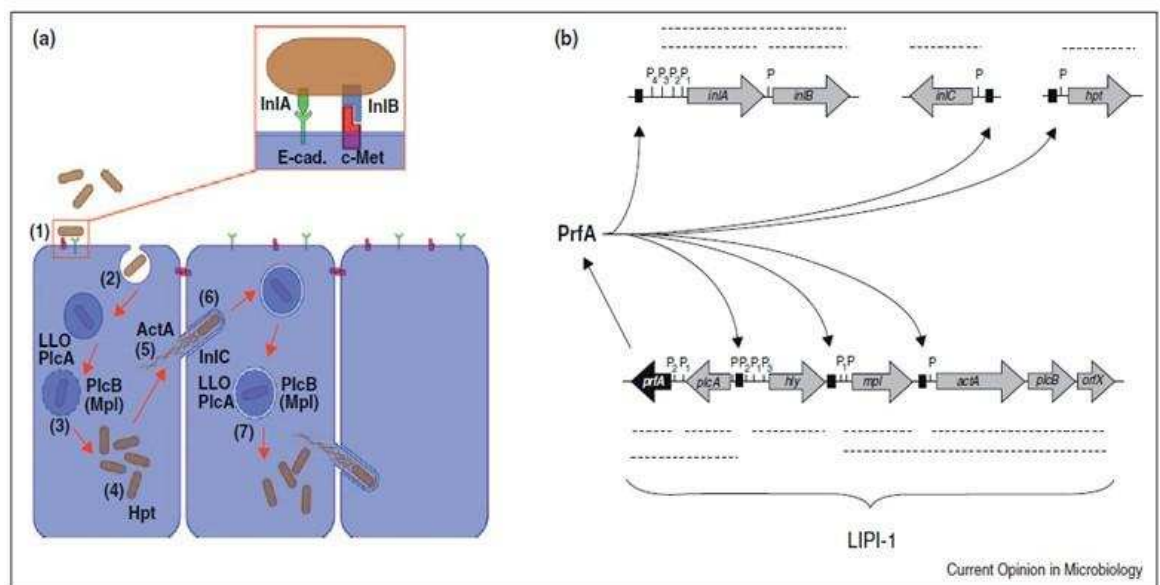


Figura 1. Esquema representativo da patogenicidade de *Listeria monocytogenes*, adaptado de las Heras et al., 2011). (A) O ciclo de infecção intracelular de *Listeria*. (1) a invasão celular é promovida por duas proteínas de superfície, as internalinas InlA e InlB, que através dos seus domínios (LRR) interagem com ligantes específicos na superfície da célula hospedeira (E-caderina e o fator de crescimento de hepatócitos o receptor tirosina cinase c-Met, respectivamente). (2) Isto resulta na invasão progressiva de bactérias por meio do mecanismo conhecido como "zipper" em um processo reminiscente de fagocitose mediada pela claritina. (3) O vacúolo fagocítico é lisado através da ação de três fatores que atuam na membrana celular: formação de poros pela toxina listeriolisina O (LLO), e fosfolipases plcA e plcB (sendo o processamento deste último realizado pela metaloprotease Mpl após secreção). (4) As células bacterianas realizam uma rápida multiplicação no citosol da célula hospedeira sendo mantidas por células derivadas de fosfatos hexoses, obtidas através da Hpt permase. Uma característica fundamental da patogênese de *Listeria* é a capacidade de se disseminar através de tecidos do hospedeiro, permanecendo protegida contra as defesas do hospedeiro extracelulares via propagação direta célula-célula. Este mecanismo é mediado pela proteína de superfície ACTA, que subverte a sinalização do sistema imune do hospedeiro e induz a polimerização de actina, impulsionando a bactéria através do citoplasma. ACTA, também tem sido relacionada em contribuir para a internalização celular. (6) Quando a bactéria alcança a periferia da célula, elas se projetam no interior da célula através de estruturas semelhantes à pseudópodes denominadas 'listeripods', que determinam a invasão das células vizinhas. Este processo é auxiliado pela menor internalina secreta (InlC), que relaxa tensão das junções celulares através da interação com o TUBA, um regulador do complexo de junções celular. (7) A fagocitose destas estruturas por células adjacentes resulta na formação de um vacúolo de membrana dupla a partir do qual a *Listeria* pode novamente escapar da célula hospedeira, iniciando um novo ciclo de proliferação, motilidade à base de actina e propagação intercelular (Suarez et al., 2001; Chico-Calera et al., 2002; Hamon et al., 2006; Scotti et al., 2007; Rajabian et al., 2009).

A fixação bacteriana à superfícies é influenciada por propriedades físico-químicas, por características de superfície (hidrofobicidade) e do próprio micro-organismo (hidrofobia, capacidade de formação de flagelo e de motilidade), bem como por propriedades ambientais como condições de pH e temperatura (Moltz et al., 2005). A temperatura regula uma variedade de genes relacionados à patogenicidade, bem como genes relacionados a adaptações às condições ambientais em *L. monocytogenes*, o que pode resultar em alterações de superfície na célula bacteriana afetando desta maneira a adesão (Folsom et al., 2006).

A colonização microbiana das superfícies é um processo que envolve fenômenos físico-químicos e biológicos (Monds et al., 2009), tendo início com o contato entre a célula bacteriana e a superfície, desencadeando uma adesão irreversível entre os dois corpos através das interações eletrostáticas e ácido-base, bem como interações de Van der Waals (Bellon-Fontaine et al., 1990). Quando um patógeno chega até determinada superfície no ambiente de processamento de alimentos, é provável que esta já tenha uma bio-película residente ao invés de uma superfície estéril. Uma vez integradas na comunidade residente da superfície, as bactérias podem encontrar uma ampla diversidade de micro-ambientes locais que geram populações heterogêneas de células com diferentes padrões de resistência ao estresse, sendo que micro-ambientes locais específicos podem ser favoráveis à aptidão de patógenos em multiplicarem-se em condições adversas (Stewart & Franklin, 2008).

Os biofilmes permitem que as bactérias sejam capazes de aderir às superfícies e ancorar em ambientes aquosos, de modo que as células adquirem vantagens específicas ao invadir os tecidos, tais como a resistência ao stress causado por antimicrobianos e forças de cisalhamento. Cada etapa na formação do biofilme requer a reprogramação da expressão gênica, e esta reprogramação ocorre em resposta às mudanças ambientais (Pruss et al., 2006). O metabolismo, os fatores envolvidos na modulação, os genes responsáveis pelo desenvolvimento, bem como o mecanismo responsável pela comunicação (quorum sensing) entre células organizadas nos biofilmes, são o alvo de estudos que procuram elucidar os mecanismos de desenvolvimento dessas estruturas (Dyer et al., 2007; Fuquay, 2011). Sabe-se que a produção de biofilmes está relacionada a inúmeros genes que, em resposta a estímulos externos, codificam diversas estruturas, como proteínas e substâncias poliméricas extracelulares (como os exopolissacarídeos, EPS), envolvidas no desenvolvimento e estabelecimento dos biofilmes (Domka et al., 2007; Dyer et al., 2007; Flemming et al., 2007).

A maioria dos agentes patogênicos envolvidos em doenças de origem alimentar é capaz de aderir e formar biofilmes em uma ampla variedade de materiais e em quase todas as condições ambientais encontradas em unidades de produção produtos cárneos. *L. monocytogenes* 10403S foi capaz de aderir a 17 tipos de materiais aprovados para uso no processamento de alimentos, incluindo metais, borrachas e polímeros (Beresford et al., 2001). No caso de *L. monocytogenes*, a carga eletrostática da parede celular bacteriana conferido pelos ácidos teicóico aniônicos peptidoglicano e hidrofobicidade de superfície celular, aumentada pela presença de ácido lático, são relacionadas à regulação de sua fixação em superfícies (Briandet et al., 1999). A presença de proteínas ancoradas a parede celular pode afetar drasticamente o comportamento microbiano nas interfaces, sendo que para *L. monocytogenes*, a inativação da via de exportação da proteína SecA2 impossibilita a formação de biofilme (Renier et al., 2013).

A eliminação e a persistência de patógenos de origem alimentar no ambiente de processamento de produtos alimentícios está intimamente relacionada à capacidade do patógeno em responder a intervenção de fatores bióticos e abióticos (Davey e O'Toole , 2000; Winkelstroter et al., 2013). *L. monocytogenes* é sensível uma variedade de desinfetantes, tais como ácido per-acético, compostos de amônio quarternários (Qacs), hipoclorito, dicloisoanurato (SDC), e outros agentes como como iodofores (Sallaw et al. 1992; Aarniselo et al. 2000; Belessi et al. 2011). Segundo Buffet et al. (2012) a utilização de compostos a base de amônios quaternários, em procedimentos de sanitização e re-sanitização mostrou-se eficaz na eliminação de *Listeria* spp. Além disso, o uso de Qacs (600ppm) em duas apresentações foram mais efetivas para reduzir *L. innqua* do que o uso de compostos clorados (Clorine 200ppm) em superfícies de fatiadores sem procedimentos prévios de higienização (Yater et al., 2015).

Normalmente o uso de boas práticas de sanitização é capaz de eliminar *L. monocytogenes* do ambiente. No entanto, em casos de altos níveis de contaminação ou procedimentos de sanitização inapropriados algumas cepas transientes podem resistir no ambiente, se multiplicar e tornarem-se persistentes (Gram et al., 2007; Campdepadrós et al., 2012). A resistência a produtos sanitizantes também é reforçada por genes associados ao stress, que são expressados durante a formação biofilme (Abee et al. , 2011; Wood et al., 2011). Estudos mostraram também que as formações de biofilmes são capazes de se espalhar pelo ambiente, sendo esta dispersão desencadeada por mudanças ambientais ou nutricionais em sua comunidade (Wood et al., 2011); estas formações são capazes ainda de desenvolver características adaptativas em resposta à exposição repetida aos biocidas (Bridier et al., 2011). Estes e outros fatores

mencionados acima tornam o controle e erradicação de biofilmes um desafio no ambiente de processamento e manipulação de produtos cárneos. Mnyandu et al. (2014) investigaram o efeito de diferentes agentes (SódioDodecylSulfato, Ácido Levulínico e Hipoclorito de Sódio) sobre a inativação de biofilme formado pela cepa *L. monocytogenes* ATCC 644 e verificaram que os biofilmes ainda estavam viáveis após o tratamento com estes sanitizantes; no mesmo estudo foi verificado que a aplicação de sanitizantes utilizando-se diferentes tempos de contato, ou a combinação de agentes podem ser eficazes na redução dos biofilmes em ambientes de processamento de alimentos.

4. Relevância de *Listeria monocytogenes* em alimentos

Dentre os patógenos de origem alimentar, *L. monocytogenes* é um desafio para a indústria de alimentos, sendo o agente causador de listeriose, uma doença infecciosa, com altas taxas de mortalidade (Zhang et al., 2004). Nos EUA, onde há uma eficiente rede de monitoramento de enfermidades associadas a consumo de alimentos contaminados, estima-se que a listeriose é responsável por pelo menos 500 mortes anualmente (Williamset al., 2011). Na última década, o ano de 2009 destacou-se apresentando um aumento na incidência desta doença (0,32/100,000 habitantes) (MMWR, 2010). Na Europa, o número de casos de listeriose também aumentou durante os últimos anos, com 1.645 casos confirmados, registrados também em 2009, e a taxa de letalidade foi de 16,6 % (EFSA, 2011).

A listeriose humana é uma doença esporádica que pode ocorrer durante todas as estações do ano, sendo que os picos de ocorrência são observados nos meses mais quentes. Em adultos, a doença caracteriza-se por duas principais síndromes: uma forma invasiva da doença e uma forma não invasiva. As manifestações clínicas da listeriose invasiva são usualmente severas e incluem septicemia, meningoencefalite e meningite (Ilsi et al., 2005; Ramaswamy et al., 2007).

Tal enfermidade ocorre principalmente em países industrializados: não se sabe se as diferenças nas taxas de prevalência entre os países desenvolvidos e em desenvolvimento ocorrem devido às diferenças geográficas, hábitos alimentares ou ainda falhas no diagnóstico de casos. A dificuldade em se recuperar o micro-organismo envolvido no surto, a subnotificação e a demora na realização de análises convencionais são alguns dos principais fatores que retardam o diagnóstico, principalmente em países em desenvolvimento (Arruda et al., 2006). Até o momento, a notificação dos casos em

que *L. monocytogenes* determinou doença em humanos não é compulsória no Brasil, o que determina a falta de dados que ilustrem a magnitude da listeriose nesse país. Apesar da deficiência na descrição de surtos de listeriose de origem alimentar no Brasil, trabalhos recentes indicam a presença de *L. monocytogenes* nas carnes e seus subprodutos (Arruda et al., 2006).

L. monocytogenes pode estar presente em diversos alimentos, dentre eles vegetais prontos para consumo e crus, leite cru, leite com pasteurização ineficiente, sorvetes, queijos, frango cru ou cozido, embutidos de carne de origem variada, carne crua de origem variada, e até peixes crus ou defumados (Williams, et al., 2011). Este patógeno é responsável por altas taxas de mortalidade, em torno de 20 % a 30 %, e a mais elevada taxa de internação hospitalar (90 %) entre todos os agentes patógenos de origem alimentar (Zhang et al., 2004).

Araújo et al. (2002) descrevem que mesmo havendo probabilidade de risco para todos os consumidores, *L. monocytogenes* é uma bactéria potencialmente perigosa para neonatos, prematuros, idosos, gestantes e indivíduos com a imunidade comprometida. A susceptibilidade do hospedeiro desempenha um papel importante na apresentação da doença clínica, de maneira que muitos pacientes com listeriose têm um comprometimento fisiológico ou patológico que afetam a sua imunidade celular (Farber & Peterkin, 1991). *L. monocytogenes* é considerada então uma bactéria oportunista (Cossart et al., 2008), uma vez que produz principalmente doença em indivíduos com o sistema imune comprometido (Thévenot et al., 2006).

A ampla distribuição de *Listeria* spp. na natureza e nas fezes dos animais explica que sua presença em carnes cruas é quase inevitável. A presença em carnes cruas pode variar de zero a 68 %. Ristori et. al. (2014) avaliaram a prevalência de *L. monocytogenes* em 552 amostras de produtos cárneos variados, provenientes de supermercados em São Paulo, Brasil: *L. monocytogenes* foi detectada em 48,7 %, sendo a maior prevalência obtida em carne moída (59,4 %), seguido por coxas de frango (58 %), linguiças suínas (38,9 %) e por fim salsicha (37,7 %).

Recentes estudos têm mostrado a presença de *L. monocytogenes* em produtos cárneos ao redor do mundo; Mashak et al. (2015) avaliou a presença de *L. monocytogenes* em 410 amostras, incluindo cortes de peru, frango, cortes bovinos e ovinos, e ainda carne moída e fígado de frango, foi verificado uma frequência de 28 % entre as amostras analisadas sendo que os cortes bovinos apresentaram a maior taxa de contaminação por este patógeno.

Wang et al. (2015) investigaram a prevalência de *L. monocytogenes* de cortes suínos congelados em supermercados e feira-livres na China, obtendo a prevalência de 5,5 % (26) em 476 amostras coletadas. Em outro estudo Yu et al. (2014) avaliaram a presença de *L. monocytogenes* em 954 amostras de carnes cruas e cozidas de origem variadas, compradas em supermercados também na China, encontrando uma taxa de positividade para *L. monocytogenes* de 6,2 % (59 amostras), com a maior positividade em produtos crus 7,4 %, e para produtos cozidos 6,7 %.

Em um estudo realizado por Yucel et al. (2005), 146 amostras de carnes bovina inteira e moída e de frango, cruas e cozidas, foram analisadas em relação à presença de *Listeria* spp. Destas, 79 amostras (54,1 %) apresentaram-se contaminadas por *Listeria* spp., sendo que a maior ocorrência de isolamento (86,4 %) ocorreu na carne bovina moída crua; *L. monocytogenes* foi isolada em nove das 79 amostras (6,16 %), sendo *L. innocua* isolada em 68 amostras (46,57 %). Silva et al. (2004), isolou *Listeria* spp. em 100 % das 41 amostras de linguiças mistas do tipo frescal analisadas. Dentre as diferentes espécies, a maior frequência de isolamento foi para *L. innocua* (97,6 % das amostras).

De um total de 400 amostras de carne moída analisadas, sendo (211) bovinas e (189) suínas, Fanteli et al. (2001) isolaram 43 cepas de *L. monocytogenes* (10,75 %). Destas, 19 cepas pertenciam ao sorotipo 1/2a, duas ao sorotipo 1/2b, 12 ao sorotipo 1/2c e dez ao sorotipo 4b.

Kasnowski et al. (2005) isolou um total de 173 cepas de *Listeria* spp. de amostras de carne bovina (alcatra). Destas, 72 (41,62 %) foram originadas da carne inteira e 101 (58,38 %) da carne moída. A espécie mais isolada foi a *L. innocua* 6a, totalizando 91 cepas, seguida da *L. monocytogenes* 4b com 45 cepas identificadas. Também foram isoladas 11 cepas de *L. innocua* 6b, uma de *L. innocua* rugosa, 18 de *L. innocua* não tipável e sete de *L. monocytogenes* 1/2b. No trabalho realizado por Samadpour et al. (2006) de um total de 512 amostras de carne moída analisadas através da “Polymerase Chain Reaction” (PCR) seguido pela confirmação da cultura, 18 (3,5 %) foram positivas para *L. monocytogenes*.

5. Distribuição de *Listeria monocytogenes* em ambiente de processamento de produtos cárneos

Durante o processo de produção, elaboração, transporte, armazenamento e distribuição, qualquer alimento está sujeito à contaminação por bactérias patogênicas

entre outros organismos e substâncias. Desta maneira, a higienização e segurança na produção de alimentos é questão de saúde pública. Para manutenção da saúde do consumidor o ambiente de processamento de alimentos deve atingir um estágio em que os produtos sejam livres de patógenos e estejam sob um rígido controle de qualidade (Catão et al., 2001) sobretudo no padrão de higiene das instalações, dos equipamentos e utensílios, das operações e pessoal.

L. monocytogenes tem sido isolado de diversas fontes ambientais, consequentemente, diversos alimentos têm sido relatados por estarem associados com casos esporádicos e surtos de listeriose, evidenciando-se as carnes e seus derivados (Autio et al., 2002). A contaminação pós-processamento é a causa mais frequente da contaminação de alimentos, tanto por contaminação cruzada, que pode ocorrer dentro da própria indústria, quanto por contaminação no ponto de distribuição ou venda do produto (Carpentier et al., 2011).

Devido essa natureza ubíqua, *L. monocytogenes* pode se estabelecer em ambientes variados, tendo sido recuperada inclusive de ambiente doméstico, incluindo superfícies de cozinhas e refrigeradores (Azevedo et al., 2005). A presença dessa bactéria no ambiente de processamento de produtos cárneos, mesmo após a higienização, representa risco microbiológico para os produtos. Devido a sua capacidade de formar biofilmes (Medralla et al., 2003; Ilsi et al., 2005), espécies do gênero *Listeria* podem permanecer neste ambiente por meses ou até mesmo anos (Berrang et al., 2002; Autio et al., 2003), ocasionando uma possível contaminação do produto final (Torres et al., 2005).

Uma variedade de estudos mostra que *L. monocytogenes* é capaz de aderir e formar biofilme em superfícies que frequentemente entram em contato com alimentos (Blackman et al., 1996; Chae et al. 2006; Bonaventura et al. 2008; Bonsaglia et al. 2014), tais como poliestireno, vidro e aço inoxidável. As superfícies como aço, vidro, polipropileno, plástico, borracha, fórmica e ferro podem acumular resíduos orgânicos, como resíduos cárneos decorrentes da má higienização, que por sua vez atuam como substrato para a multiplicação e persistência deste micro-organismo no ambiente de processamento e manipulação de produtos cárneos (Lopes et al., 2008).

Simmons et al. (2014), em um estudo que avaliou os padrões de contaminação por *L. monocytogenes* em 121 estabelecimentos que produziam embutidos cárneos variados nos Estados Unidos, obteve positividade para este patógeno em pelo menos 60% dos estabelecimentos analisados; *L. monocytogenes* estava presente em 14,2 % das

superfícies que não entravam em contato com alimentos, e em 4,5 % das superfícies que entravam em contato com alimentos.

Larivière-Gauthier et al. (2014) avaliou a prevalência de *L. monocytogenes* em uma planta de abate e processamento de carne suína, obtendo 41 amostras positivas para este patógeno em equipamentos, e 30 amostras positivas em superfícies do ambiente de sala de desossa.

Barros et al. (2007) também avaliaram a frequência de *Listeria* spp. em instalações e equipamentos de estabelecimentos que processam produtos cárneos, observando um total de 74 amostras positivas para *Listeria* spp. em equipamentos e 23 amostras positivas em instalações, e a frequência obtida para *L. monocytogenes* nos mesmos pontos foi de 7 amostras para equipamentos e 2 amostras para instalações.

Os relatos do isolamento de *L. monocytogenes* em ambiente de processamento de produtos cárneos na Zona da Mata Mineira são escassos. As superfícies de corte bem como equipamentos e utensílios com higienização deficiente têm sido responsáveis, isoladamente ou associados a outros fatores, por surtos de doenças associadas a consumo de alimentos ou por alterações de alimentos processados (Andrade et al., 1996). Adicionalmente, as evidências de que equipamentos e utensílios contaminados participam do aparecimento de aproximadamente 16 % dos surtos de origem alimentar alerta para a necessidade de controle da contaminação microbiológica nesses locais (Freitas et al., 1995). Equipamentos como cortadores de frios, bem como amaciadores de carne, entre outros, devem passar constantemente por uma avaliação microbiológica para controle da eficiência do procedimento de higienização, de modo a prevenir a contaminação dos alimentos processados e eventualmente produzidos (Andrade et al., 1996).

Referências Bibliográficas

- Aarnisalo, K., S. Salo, H. Miettinen, M. Suihko, G. Wirtanen, T. Autio, J. Lunden, H. Korkeala, and A. Sjöberg. 2000. Bactericidal efficiencies of commercial disinfectants against *Listeria monocytogenes* on surfaces. *Journal of Food Safety*. 20:237-250.
- Acha, P.N., B., Szyfres. 2001. Bacterioses y Micosis. In: *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 3 ed, parte 1, v.1, Washington: OPS.
- Allerberger, F. 2003. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 35:183-189.
- Andrade, N.J., J. A.B. Macêdo. 1996. *Higienização na indústria de alimentos*. São Paulo: Varela. 189.

Araújo, P. C. C. 2002. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em Produtos de Carne de Peru Comercializados na Cidade de Niterói-RJ-Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*. Porto Alegre: UFRS. 19-24.

Arruda, G.A. 2006. Perfil genotípico de cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de alimentos: análise crítica das técnicas de PCR e PFGE e importância para saúde pública. São Paulo, BVS. 108.

Autio, T., J. Lundén, J., M. Fredriksson-Ahomaa, M.; Björkroth, J.; A.M. Sjöberg, H. Korkeala. 2002. Similar *Listeria monocytogenes* pulsotypes detected in several foods originating from different sources. *International Journal of Food Microbiology*.77:83-90.

Autio, T., R. Keto-Timonen, R.J. Lundén, J. Björkroth, H. Korkeala. 2003. Characterization of Persistent and Sporadic *Listeria monocytogenes* strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). *Systematic Applied Microbiology*. 26:539-545.

Azevedo, I., M. Regalo, C. Mena, G. Almeida, L. Carneiro, P. T Teixeira,P.; T. Hogg, P. Gibbs. 2005. Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal. *Journal of Food Control*. 16: 121-124.

Barros, M.A., L.A. Nero, L.C. Silva, L. d'Ovidio, F.A. Monteiro, R. Tamanini, R. Fagnani, E. Hofer, V. Beloti. 2007. *Listeria monocytogenes*: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. *Meat Science*. 76:591-596.

Belessi, C. A., A. S. Gounadaki, A. N. Psomas, P. N. Skandamis. 2011. Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 145:S46–S52.

Bellon-Fontaine, M.N., N. Mozes, H.C. van der Mei, J. Sjöllema, O. Cerf, O, P.G Rouxhet, H.J. Busscher, 1990. A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrata. *Cell Biophys*. 17: 93-106.

Beresford, M.R., P.W Andrew, G. Shama. 2001. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. *Journal of Applied Microbiology*. 90:1000-1005.

Berrang, M.E., R.J. Meinersmann, J.F. Frank, D.P. Smith, L.L. Genzlinger. 2005. Distribution of *Listeria monocytogenes* subtypes within a poultry further processing plant. *Journal of Food Protection*. 68:980-985.

Blackman, I.C., J.F, Frank. 1996. Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. *Journal of Food Protection* .59:827-831.

Borch, E., P. Arinder. 2002. Bacteriological safety issues in beef and ready-to-eat meat products, as well as control measures. *Meat Science*.62:381-390.

Borucki, M.K., D.R. Call. 2003. *Listeria monocytogenes* Serotype Identification by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 41:5537-5540.

Briandet, R., T. Meylheuc,C. Maher, M.N. Bellon-Fontaine. 1999. *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and

acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Applied Environmental Microbiology*. 65:5328-5333.

Buffet-Bataillon, S., P. Tattevin, M. Bonnaure-Mallet, A. Jolivet-Gougeon. 2012. Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds a critical review. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 39: 381-389.

Cabanes, D., P. Dehoux, O. Dussurget, L. Frangeul, P. Cossart. 2002. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends of Microbiology*. 10:238-245.

Camargo, A.C., A. Lafisca, M.V.C. Cossi, F. Lanna, M. R. Dias, P.S.A Pinto, L.A. Nero. 2014. Low Occurrence of *Listeria monocytogenes* on bovine hides and carcasses in Minas Gerais State, Brazil: Molecular Characterization and Antimicrobial Resistance. *Journal of Food Protection*. 77: 1148-1152

Camargo, A.C., M. R. Dias, M.V.C Cossi, F. Lanna, V. Q. Cavichioli, D. Valilim, E. Hofer, P.S.A. Pinto, L.A. Nero. 2015. Serotypes and pulsotypes diversity of *L. monocytogenes* in beef processing environment. *Foodborn Pathogens and Disease*. in press.

Cardoso, R. C. V., J.P.B. Chaves, N. J. Andrade, M. A. Teixeira. 1996. Avaliação da eficiência de agentes sanificantes para mãos de manipuladores de alimentos em serviços de refeição coletiva. *Higiene Alimentar*. 10: 17-22.

Carpentier, B., O. Cerf. 2011. Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food, industry equipment and Premises. *International Journal of Food Microbiology*. 145:1-8.

Catão, R. M. R., B.S. Ceballos. 2001. O. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E. Coli* no leite cru e pasteurizado de uma Indústria de Laticínios no Estado da Paraíba. Dissertação de Mestrado. Paraíba: UFPB. 281-282.

Chico-Calero I, M. Suarez, B. Gonzalez-Zorn, M. Scortti M, J. Slaghuis, W. Goebel, J.A. Vazquez-Boland. 2002. First identification of a bacterial nutritional virulence determinant. 99:431-436.

Cossart, P., A Toledo-Arana. 2008. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes and Infection*. 10:1041-1050.

Cossart, P. 2002. Molecular and cellular basis of infection by *Listeria monocytogenes* an overview. *International journal of Medical Microbiology*. 291:401-409.

Davey, M.E., G.A. O'Toole. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology* 64: 847-867.

Domka J., J. T. Lee, T. Bansal, T.K. Wood. 2007. Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environmental Microbiology*. 9:332-346.

Donnelly, C.W., C. Vanderzant, D.F. Splittstoesser *Listeria* spp. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 3 ed. Washington: APHA. 38:637-664

- Dussurget, O., J. Pizarro-Cerda, J., P. Cossart, P. 2004. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Revista de Microbiologia*. 58:587-610.
- Dyer J.G., N. Sriranganathan, S.C. F Nickerson. Elvinger. 2007. F. Curli production and genetic relationships among *Escherichia coli* from cases of bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*. 90:193-201.
- Eisel, W.G., R.H.Linton, P.M. Muriana. 1997. A survey of microbial levels for incoming raw beef, environmental sources, and ground beef in a processing plant. *Food Microbiology*.14:273-282.
- Fantelli, K., R.Stephan 2001.Prevalence and characteristics of shigatoxin-producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland. *Int. Journal of Food Microbiology*.70:63-9.
- Farber, J. M., P.I. Peterkin. 1991. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen.*Microbiological Reviews*. 55:476-511.
- Flemming, H.C., T.R. Neu, D.J. Wozniak. 2007. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *Journal of Bacteriology*. 189:7945-7947.
- Folsom, J.P., J.F. Frank. 2006. Chlorine resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms and relationship to subtype, cell density, and planktonic cell chlorine resistance. *Journal of Food Protection*. 69:1292-1296.
- Forsythe, S. J. 2002. *Microbiologia de segurança alimentar*. Porto Alegre: Artmed. 424.
- Franco, B. D. G. M.; M. Landgraf. 2003. *Microbiologiadados alimentos*. 2. ed. São Paulo: Atheneu. 182.
- Fuquay, J.W.2011. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Second ed. Elsevier, Boston, MA. 2011.
- Gandhi, M.; M.L Chikindas. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*. 113:1-15
- Gasnov, U., D. Hughes, P.M. Hansbro. 2005. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMSMicrobiology Reviews*. 29:851-875.
- Gill, C.O., B. Deslandes, K. Rahn, A. Houde, J. Bryant. 1998. Evaluation of the hygienic performances of the processes for beef carcass dressing at 10 packing plants. *Journal of Applied Microbiology*. 84:1050-1058.
- Goldfine, H., S.J. Wadsworth. 2002. Macrophage intracellular signaling induced by *Listeria monocytogenes*. *Microbes and Infection*. 4:1335-1343.
- Gram, L., Bagge-Ravn, D., Ng, Y. Y., Gymoese, P., & Vogel, B. F. 2007. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 18:1165-1171.
- Gray, M. L., A,H. Killinger, A. H. 1966. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriological Reviews*. 30:309-382.

Hain, T., S.S. Chatterjee, R. Ghaia, C.T., Kuenne, A. Billon, C Steinweg, E. Domann, U. Käst, L. Jänsch, J. Wehland, W. Eisenreich, A. Bacher, A.; B, Joseph, J. Harrigan, W. F.; Mc Cance, M. E. 1976 Laboratory methods in food and dairy microbiology. Londres Academic. 456.

Hamon M, H. Bierne, P. Cossart. 2006. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. Comprehensive and insightful digest of the molecular and cellular determinants of *Listeria* pathogenesis Nature Reviews Microbiology. 4:423-434.

Hess, J. 1995. *Listeria monocytogenes* p60 supports host cell invasion by and in vivo survival of attenuated *Salmonella typhimurium*. Infectious Immunology. 63:2047-2053.

Ilsi research Foundation/risk Science Institute. 2005. Expert panel on *Listeria monocytogenes* in foods. Achieving continuous improvement in reductions in foodborne listeriosis a risk-based approach. Journal of Food Protection. 68:1932-1994.

Jawetz, E.; J.L. Melnick, E.A. Adelberg.1998. Microbiologia médica.Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 20:524.

Jay, M.J., D.A. Loessner, D.A. 2005. Modern Food Microbiology. 7 ed., New York: 7: 790.

Johnston, A.M. Animal health and food safety. British Medical Bulletin. 56:51-61.

Kasnowski, M.C. 2004. Isolamento, identificação, estudo sorológico e antimicrobiano em corte de carne bovina (alcatra) inteira e moída. Niterói, RJ. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal). Universidade Federal Fluminense, UFF. Niterói, RJ.

Larivie` Re-Gauthier G., A. Letellier, A. Sadjia. 2014. Analysis of *Listeria monocytogenes* strain distribution in a pork slaughter and cutting plant in the province of Quebec. Journal of Food Protection. 77:2121-2128.

Lindstedt, B. A., W. Tham W.; M.L. Danielsson-, M. L.; vardund, T.; helmersson, S.; kapperud, G. 2008. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Listeria monocytogenes* using multicolour capillary electrophoresis and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing. Journal of MicrobiologicalMethods.72:141-148.

Liu, D. Y., M. L. Lawrence, F. W. Austin, and A. J. Ainsworth. 2007. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. Journal of Microbiology Methods.73:133-140.

Liu, D.; M.L Lawrence, L. Gorski, R.E. Mandrell, A.J. Ainsworth, F.W. Austin, F.W. 2006.*Listeria monocytogenes* serotype 4b strains belonging to lineages I and III possess distinct molecular features. Journal of ClinicalMicrobiology. 44:214-217.

Lópes, V. 2008. Molecular tracking of *L. monocytogenes* in an Iberian pig abattoir and processing plant. Meat Science. 78:130-134.

Low, J. C.; W. Donachie. 1997. A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis.The Veterinarian Journal. 153:9-29.

Maluf, R. S.; F. Menezes, F.L. Valente, F. L. 1996. Contribuição ao tema segurança alimentar no Brasil. Revista Cadernos de Debate. 4:66-88.

- Mashak, I.Z., A.Z. Hamidreza, S.N. Noori, A.A. Basti. 2015. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in different kinds of meat in Tehran province. *British Food Journal*. 117:109-116.
- Mead, P.S.; L. Slutsker, V. Dietz, L.F, McCaig, J.S. Bresee, J.S.; C. Shapiro, C., P.M. Griffin, R.V. Tauxe. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infection Disease*. 5:607-625.
- Medrala, D., W. Dabrowski, W., U. Czekajo-Koodziej, E. Daczowska, A. Koronkiewicz, E. Augustynowicz, M. Manzano. 2003. Persistence of *Listeria monocytogenes* strains isolated from products in a Polish fish processing plant over a 1-year period. *Food Microbiology*. 20:715-724.
- Mendes, R. A. 2004. Contaminação ambiental por *Bacillus cereus* em unidade de alimentação e nutrição. *Revista de Nutrição*. 17: 255-261.
- Milohanic, E. 2003. Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Molecular Microbiology*. 47:1613-1625.
- MMWR, 2010. Preliminary Foodnet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through foods, 10 states, 2009. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 59:418-422.
- Mnyandu E., O. A. Ijabadeniyi, S. Singh. 2014. Inactivation of *Listeria monocytogenes* ATCC7 644 biofilms using sodium dodecyl sulphate, levulinic acid and sodium hypochlorite. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 8:1973-1980
- Moltz A.G., S.E Martin. 2005. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. *Journal of Food Protection*. 68: 92-97.
- Monds, R.D., G.A. O'Toole. 2009. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends of Microbiology*. 17:73-87.
- Monteville, T. J., K. Mathews. 2005. *Food Microbiology: an introduction*. ASM Press, American Society for Microbiology.
- Moreno, L. S. 1982. *Higiene de lá alimentación*. Barcelona: Aedos. 1:250.
- Murray, P.R. 2000. *Listeria, Erysipelothrix e outros bacilos Grampositivos*. *Microbiologia Médica*. 27: 181-184.
- Niebuhr, K.C.T.; P. Koller, J. Welhand. 1993. Production of monoclonal antibodies to the phosphatidyl-choline-specific phospholipase C of *Listeria monocytogenes*, a virulence factor for this species. *Medical Microbiology Letters*. 2:9-16.
- Nilsson, L.; Y. Chen, Y., M.L. Chikindas, H.H. Huss. L. Gram, T.J. Montville. Carbon dioxide and nisin act synergistically on *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:769-774.
- Piffaretti, J.C., H. Kressebuch, M. Aeschbacher, J. Bille, E. Bannerman, J.M. Musser, R.K. Selander, J. Rocourt. 1989. Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 86:3818-3822.

- Pizzarro-Cerda, J., P. Cossart. 2006. Bacterial adhesion and entry into host cells. *24*:715-727.
- Pruss, B.M., C. Besemann, A. Denton, A. J. Wolfe. 2006. A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. *188*:3731-3739.
- Rajabian, T., B. Gavicherla, M. Heisig, S. Muller-Altrock, W. Goebel, S.D. Gray-Owen, K. Ireton. 2009. Identification of the elusive virulence function of the small internalin InlC, a key core PrfA regulon member. *Nature Cell Biology*. *11*:1212-1218.
- Ramaswamy, R., V.M. Cresence, J.S. Rejitha, M.U. Lekshmi, K.S. Dharsana, S.P. Prasad, H.M. Vijila. 2007. *Listeria* review of epidemiology and pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. *40*:4- 13.
- Renier, S., C. Chagnot, J. Deschamps, N. Caccia, J. Szlavik, S.A. Joyce, M. Popowska, C. Hill, S. Knochel, R. Briandet, M. Hebraud, M. Desvaux. 2013. Inactivation of the SecA2 protein export pathway in *Listeria monocytogenes* promotes cell aggregation, impacts biofilm architecture and induces biofilm formation in environmental condition. *Environmental Microbiology*. *16*:1176-1192.
- Ryser, E.T., E.H. Marth. 1999. *Listeria*, listeriosis, and food safety. New York: Marcel Dekker. 738.
- Sallam, S. S., and C. W. Donnelly, 1992. Destruction, injury and repair of *Listeria* species exposed to sanitizing compounds. *Journal Food Protection*. *55*:771-1033.
- Samadpour, M. 2006. Incidence of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in retail fresh ground beef, sprouts, and mushrooms. *Journal of Food Protection*. *69*: 441-443.
- Schär, J. Kreft, J. Klumpp, M.J. Loessner, J. Dorscht, K. Neuhaus, T. M. Fuchs, S. Scherer, M. Doumith, C. Jacquet, C.; P. Martin, P. Cossart, C. Rusniok, P. glaser, C. Buchrieser, C., W. Goebel, T. Chakraborty. 2007. Pathogenomics of *Listeria* spp. *International Journal of Medical Microbiology*. *297*:541-557.
- Scotti M, H.J. Monzo, L. Lacharme-Lora, D.A. Lewis, J.A. Vazquez-Boland. 2007. Reviews in detail the mechanistic aspects of PrfA regulation and discusses the allosteric activation model and its implications in the context of the environmental to intracellular habitat switch. *Microbes Infections*. *9*:1196-1207.
- Silva, N.; V.C Amswalden, V. C. 1997. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela. 317.
- Silva, W.P., A.S. Lima, E.A. Gandra, M.R. Araújo, R.P. Macedo, E.H. Duvall. 2004. *Listeria* spp. no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Br. *Ciência Rural*. *34*:3.
- Simmons, C., M.J. Stasiewicz, J. Wright. 2014. *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. contamination patterns in retail delicatessen establishments in three U.S. states. *Journal of Food Protection*. *77*:1929-1939.
- Stewart, P.S., M.J. Franklin. 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Review Microbiology*. *6*:199-210.

- Suárez M, B. Gonzlález-Zorn, Y. Vega, I. Chico-Calero, J.A. VázquezBoland. 2001. A role for ActA in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiology*. 3:853-864.
- Swaminathan, B., P. Gerner-Smidt. 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*. 9:1236-1243.
- Thévenot, D.; M.L. Delignette-Muller, S. Christieans, S. Leroy, A. Kodjo, C. Vernozzy-Rozand. 2006. Serological and molecular ecology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from 13 French pork meat salting-curing plants and their products. *International Journal of Food Microbiology*. 112:153-161.
- Torres, K; S. Sierra, R. Poutou, A. Carrascal, M. Mercado. Patogenesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonotico emergente. *MVZ-Córdoba*. 10: 511-543.
- Trabulsi, L.Z.R., F. Alterthum, 2005. *Microbiologia*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- Vazquez-Boland, J. A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Dominguez-Bernal, W. Goebel, B. Gonzalez-Zorn, J. Wehland, and J. Kreft. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology*. 14:584-640.
- Vázquez-Boland, J. A., P. Berche. 1989. Preliminary evidence that different domains are involved in cytolytic activity and receptor (cholesterol) binding in listeriolysin O, the *Listeria monocytogenes* thiol-activated toxin. *FEMS Microbiology Letters*. 53:95-99.
- Wang, K., K. Ye, Y. Zhu, Y. Huang, G. Wang, G. Zhou. 2015. Prevalence, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from chilled pork in Nanjing, China. *Food Science and Technology*. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643815004429>
- Weller, D., A. Andrus, M. Wiedmann, C. Henk. 2015. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65:286-292.
- Wiedmann, M.J., L. Bruce, C. Keating, A.E. Johnson, P.L. McDonough, C.A. Batt. 1997. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infectious Immunology*. 65: 2707-2716.
- Williams, S.K, S. Roof, S, E.A. Boyle, D. Burson, H. Thippareddi, I. Geornaras, G.N. Sofos, M. Wiedmann, A. Nightingale. 2011. Molecular ecology of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in small and very small ready-to-eat meat processing plants. *Journal of Food Protection*. 74:63-77.
- Winkelstroter, L.K., F.B. Teixeira, E.P. Silva, V.F. Alves, E.C. de Martinis 2013. Unraveling microbial biofilms of importance for food microbiology. *Food Microbiology*. 1-12.
- Yeater, M.C., R. KATIE, T. Kirsch, M. Taylor, J. Mitchell, W. N. Osburn. 2015. Effectiveness of sanitizing products on controlling selected pathogen surrogates on retail deli slicers. *Journal of Food Protection*. 78:707-715
- Yu, T., X. Jiang .2014. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail food in Henan, China. *Food Control*. 37:228-231.

Yucel, N., S. Citak, M. Onder, M. 2005. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. *International Journal of Food Microbiology*. 22:2-3.

Zhang, W.; B. Jayarao, S.J. Knabel. 2004. Multi-Virulence-Locus Sequence Typing of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*.70:913-920.

Zhang, Y.;E. Yeh, G. Hall, J. Cripe, A.A, Bhagwat, J. Meng. 2014. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods. *International Journal of Food Microbiology*.113:47-53.

Zunabovic, M., K.J. Domig, W. Kneifel. 2011. Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments a review. *Food Science and Technology*. 44:351-362.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de *L. monocytogenes* em ambientes de processamento de produtos cárneos em açougues, pelo isolamento desses patógenos em utensílios e equipamentos. Adicionalmente, o estudo teve como objetivo avaliar o potencial de adesão de isolados obtidos, assim como a sensibilidade a dois sanitizantes utilizados durante a higienização nesses estabelecimentos comerciais.

Objetivos específicos

- Verificar a ocorrência de *L. monocytogenes* em ambiente de processamento de carnes em açougues
- Caracterizar os sorogrupos e genes relacionados a virulência de *L. monocytogenes*
- Verificar o potencial de adesão de *L. monocytogenes*
- Verificar a sensibilidade de *L. monocytogenes* a duas substâncias sanitizantes: um detergente alcalino clorado em gel (Mister Max 1 - DG1) e um desinfetante para superfícies (B-QUART SEPT).

**CAPÍTULO 1. Contaminação por micro-organismos indicadores de higiene e
Listeria monocytogenes em açougues**

Danilo Augusto Lopes da Silva et al.

Trabalho a ser submetido ao periódico Journal of Food Protection, após correções e sugestões da banca.

Resumo

Listeria monocytogenes pode contaminar produtos cárneos principalmente através de contaminação cruzada de utensílios expostos a produtos crus. A qualidade destes produtos pode ser ainda estimada através da pesquisa de micro-organismos indicadores de higiene, o que não isenta a pesquisa de patógenos para garantia de inocuidade. Para identificar as principais fontes de contaminação microbiológica no ambiente de processamento de três açougues, amostras superficiais foram obtidas a partir de mãos dos manipuladores, mesas, facas, interior do balcão refrigeração, moedores e amaciadores de carne (24 amostras por área) e submetidas à enumeração de micro-organismos indicadores de higiene, e pesquisa de *L. monocytogenes*, cujos isolados obtidos foram caracterizados quanto aos seus sorogrupos e genes de virulência. Os resultados demonstraram que não houve diferença no nível de contaminação por micro-organismos indicadores de higiene entre os três estabelecimentos analisados; as amostras com contagens acima de valores referenciais indicou ineficiências nos procedimentos de higienização praticados. 87 amostras apresentaram resultado positivo para *Listeria* spp. (60,4 %), sendo 22 amostras de mesa, 20 de moedor, 16 de faca, 13 de mão, 9 de amaciador e 7 do balcão de refrigeração. Um total de 31 amostras (21,5 %) foram positivas para *L. monocytogenes*, indicando a presença do patógeno no ambiente de processamento de produtos cárneos. Na caracterização dos sorotipos, 52 isolados foram caracterizados como pertencentes aos sorogrupos 1/2c ou 3c, e 22 isolados como pertencentes aos sorogrupos 4b, 4d, 4a ou 4c. Na pesquisa dos genes de virulência, todos os 74 isolados apresentaram resultados positivos para os genes *hlyA*, *iap*, *plcA*, *actA* e para o grupo das internalinas (*inlA*, *inlB*, *inlC* e *inlJ*). O estabelecimento de procedimentos adequados para redução das contagens microbianas e controle da disseminação de *L. monocytogenes* nas etapas finais da cadeia produtiva da carne é de extrema importância, com reflexos evidentes na qualidade e inocuidade dos produtos cárneos destinados ao consumo humano.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, ambiente, açougue, indicadores de higiene

Abstract

Listeria monocytogenes can contaminate meat products primarily through cross-contamination of utensils exposed to raw products. The quality of these products can still be estimated through the research of hygiene indicator microorganisms, which does not exclude the research pathogens for food safety. To identify the main sources of microbiological contamination in three butchershops processing environment, surface samples were obtained from the hands of employees, tables, knives, inner of butcher display, grinders and meat tenderizers (24 samples per area). All samples were subjected to enumeration of hygiene indicator microorganisms and detection of *L. monocytogenes*, being the obtained isolates characterized for their virulence genes and serogroups. The results demonstrated absence of differences in the levels of contamination by hygiene indicator microorganisms from the three butcher shops; samples with counts higher than reference values indicated inefficiency in adopted hygiene procedures. A total of 87 samples tested were positive for *Listeria* spp. (60.4 %), being 22 from table, 20 from grinders, 16 from knives, 13 from hands, 9 from meat tenderizers and 7 from the inner of butcher display. A total of 31 samples (21.5 %) were positive for *L. monocytogenes*, indicating the presence of the pathogen in meat processing environment. 52 isolates were characterized as belonging to serogroup 1/2c or 3c, and 22 isolates belonged to serogroups 4b, 4d, 4a or 4c. All 74 isolates showed positive results for *hlyA* genes, *iap*, *plcA*, *actA* and the group of internalins (*InlA*, *inlB*, *inlC* and *inlJ*). The establishment of appropriate procedures to reduce microbial counts and controlling the spread of *L. monocytogenes* in the final steps of meat production chain is of utmost importance, with obvious effects on the quality and safety of meat products for human consumption.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, environment, butchershop, hygiene indicator microorganisms

Introdução

Carnes e seus derivados são rotineiramente associados a surtos de toxinfecções alimentares (Mena et al., 2004). Durante os respectivos processos de produção, elaboração e armazenamento, qualquer alimento está sujeito à contaminação por bactérias patogênicas (Catão et al., 2001). A contaminação pós-processamento é a causa mais frequente da contaminação de alimentos, tanto por contaminação cruzada, que pode ocorrer dentro da própria indústria, quanto por contaminação no ponto de distribuição ou venda do produto (Carpentier et al., 2011). Para que os produtos cárneos estejam de acordo com os padrões internacionais de qualidade e inocuidade, o monitoramento constante de parâmetros de qualidade e higiene nos diferentes ambientes de manipulação e processamento de produtos cárneos é crucial (Johnston, 2000).

Esses sistemas de qualidade são utilizados pelas indústrias de alimentos, e são aplicados na pesquisa sistemática de indicadores em pontos específicos da linha de processamento e manipulação de produtos cárneos (Gillet al., 2006). A eficiência destes sistemas é comprovada, e a partir desses indicadores é possível a adoção de medidas corretivas a fim de minimizar ou evitar possíveis contaminações (Rodrigues et al., 2008). A inocuidade e a qualidade de produtos cárneos podem ser estimadas através da pesquisa de diversos micro-organismos indicadores, como os aeróbios mesófilos e coliformes (Ghafir et al., 2008). A enumeração de aeróbios mesófilos fornece uma estimativa da população geral de micro-organismos que estão presentes no ambiente e itens utilizados no processamento de produtos cárneos, onde altos níveis de contaminação estão associados à baixa qualidade de higiene (Gill et al., 1998; Jay et al., 2005). Os coliformes são indicadores de condições higiênico sanitárias inadequadas nas etapas de processamento, produção e armazenamento de alimentos. *Escherichia coli* é um indicador clássico da provável presença de micro-organismos patogênicos entéricos, e bons indicadores da qualidade higiênica de alimentos processados (Eisel et al., 1997; Jay et al., 2005). Além desses indicadores, a pesquisa direta de patógenos é fundamental para garantia da inocuidade de produtos cárneos, assim, patógenos frequentemente associados às carnes e seus derivados, como *L. monocytogenes*, devem ser pesquisados e controlados no ambiente e superfícies (Johnston, 2000).

O controle de *L. monocytogenes* no ambiente de manipulação e processamento de produtos cárneos é desafiador, uma vez que esse patógeno sobrevive e se multiplica a temperaturas de refrigeração, tolera condições ambientais adversas e apresenta grande capacidade para formar biofilmes em superfícies de equipamentos de processamento de

alimentos (Gandhi e Chikindas, 2007). Estudos apontam que a contaminação pós-processamento por *L. monocytogenes* é extremamente importante, e frequentemente a origem da contaminação do produto final pode ser os equipamentos de processamento, particularmente, no corte e na embalagem de produtos cárneos, além de mãos e vestimenta dos manipuladores (Keto-Timonen et al., 2008; Destro et al., 1996). *L. monocytogenes* pode persistir nas unidades de processamento de produtos cárneos por longos períodos, até anos, indicando que a limpeza de rotina pode não ser eficiente na eliminação desse patógeno (Wagner et al., 2006).

Esse estudo teve como objetivo avaliar o nível de higiene e a inocuidade dos utensílios e equipamentos de açougues, através da pesquisa de micro-organismos indicadores de higiene e *L. monocytogenes*, incluindo seu potencial de virulência, buscando a caracterização das principais fontes de contaminação.

Material e Métodos

Amostragem

Três açougues localizados na cidade de Viçosa, MG, Brasil, foram incluídos nesse estudo considerando a concordância dos proprietários e fiscalização oficial da Vigilância Sanitária do município. Nesses estabelecimentos ocorria a manipulação e a comercialização de carne em natureza de diferentes espécies animais e a fabricação de produtos cárneos, principalmente linguças. Os estabelecimentos foram denominados como A, B e C.

Cada estabelecimento foi visitado em 8 oportunidades, quando amostras superficiais do ambiente de manipulação (interior do balcão refrigerado, mão de manipuladores e superfícies de corte das mesas), equipamentos (amaciadores de carne e moedores) e utensílios (faca) foram amostrados superficialmente. A obtenção de todas as amostras foi concomitante ao manuseio e processamento dos produtos cárneos, sem procedimentos prévios de higienização. O número de amostras coletadas para cada fonte analisada, bem como o meio de obtenção das mesmas são apresentados na Tabela 1.

Os pontos selecionados foram amostrados por esfregaço de superfície em duas áreas de 50 cm² (uma área limitada com um molde esterilizado de 5 x 10 cm), utilizando-se duas esponjas estéreis (3M Microbiology, St. Paul, MN, USA) previamente umedecidas em uma solução de 10mL de NaCl (0,85 % m/v) peptonada tamponada (0,1 % m/v) (PBS, Oxoid Ltd., Basingstoke, England), e mantidas sob

refrigeração até a análise. Cada conjunto de duas esponjas por amostra foi transferido para um saco estéril e adicionou-se 80 mL de PBS (volume final de 100 mL por amostra), homogeneizados por 60 segundos (Stomacher 400 circulator, Seward Ltd., Leste Close, Sussex, Reino Unido), e submetidos a análise microbiológica, sendo que 1 mL do homogeneizado correspondeu a 1 cm² de cada amostra (Cossi et al., 2013).

Análises microbiológicas

Enumeração de micro-organismos indicadores de higiene

Uma alíquota de cada amostra superficial coletada foi submetida à diluição seriada em escala decimal, utilizando-se NaCl 0,85 % (m/v). Duas diluições de cada amostra foram selecionadas, considerando o seu provável nível de contaminação microbiológica, e semeadas em PetrifilmTM Aerobic Count (3M Microbiology, St Paul, MN, EUA) para a enumeração de aeróbios mesófilos (AM), PetrifilmTM Enterobacteriaceae (3M) para enumeração de enterobactérias (EB), e PetrifilmTM Escherichia coli (3M) para enumeração de coliformes totais (CT) e E. coli (EC). Todas as placas foram incubadas a 35 °C, por 24 a 48 horas, quando as colônias formadas foram enumeradas considerando as características fenotípicas de cada grupo: AM: colônias vermelhas formadas após 24 h; EB: colônias amarelas associadas ou não a gás, e colônias associadas a gás, formadas após 24 h; CT: colônias vermelhas e azuis associadas a gás, formadas após 24 h; EC: colônias azuis associadas a gás, formadas após 48 h. Todos os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por cm².

As contagens de AM, EB, CT e EC foram convertidas em log₁₀, avaliadas quanto à distribuição normal e homogeneidade, e submetidas análise de variância (ANOVA) e Tukey para identificação de diferenças significativas entre as amostras obtidas dos diferentes estabelecimentos analisados ($p < 0,05$). Adicionalmente, as amostras foram categorizadas conforme o nível de contaminação por indicadores, utilizando-se valores referenciais para uma boa condição de higiene: 50 UFC/cm² para AM e EB, e 10 UFC/cm² (limite de detecção da técnica) para CT e EC (Silva et al., 1997); essas frequências foram comparadas pelo teste Chi-quadrado e pelo procedimento de Marascuilo, para verificação de diferenças significativas entre os estabelecimentos avaliados ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas utilizando-se

os softwares Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA) e XLSat 2010.2.03 (AddinSoft, New York, NY, EUA).

Isolamento de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes*

As amostras superficiais foram submetidas à pesquisa de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes*, conforme metodologia ISO 11.290-1(ISO, 1996; 2004). Uma alíquota de 40 mL da suspensão obtida, conforme descrito anteriormente, foi centrifugada e o sedimento ressuspensão em caldo half fraser (Oxoid), incubado a 30 °C por 24 h. Logo após, realizou-se semeadura em placas de chromogenic listeria agar[®] (ALOA, Oxoid) e listeria selective agar base[®] (Oxford, Oxoid) incubadas a 37 °C por 48h. Simultaneamente, uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para tubo contendo 10 mL de caldo fraser (Oxoid) e incubados a 35 °C por 24h. Posteriormente foi realizada semeadura em placas ágar ALOA e ágar Oxford, incubadas 37 °C por 48h.

As colônias características obtidas foram submetidas às provas bioquímicas de acordo com Pagotto et al. (2011), para produção de catalase, motilidade a 25 °C, fermentação de carboidratos (dextrose, xilose, ramnose e manitol), produção de β -hemólise em ágar sangue de equino, e em seguida classificadas. A presença ou ausência de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* foi expressa em 40 cm², valor correspondente a alíquota analisada.

As frequências de amostras positivas para *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* foram comparadas pelo teste Chi-quadrado e pelo procedimento de Marascuilo, para verificação de diferenças significativas entre os estabelecimentos avaliados ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas utilizando-se os softwares Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA) e XLSat 2010.2.03 (AddinSoft, New York, NY, EUA).

Análises moleculares

Caracterização dos sorogrupos de *Listeria monocytogenes*

Os isolados positivos para *L. monocytogenes* na classificação bioquímica foram recuperados em placas de tryptic soya broth[®] (TSB, Oxoid) e submetidos à extração e purificação do DNA através do kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega Corp., Madison, WI, USA). O DNA extraído de cada isolado foi submetido a PCR multiplex descrita por Borucki & Call (2003) para categorização das principais divisões

filogenéticas utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (primer) D1 (divisão I e III, que compreende os sorogrupos 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e 4a, e 4c) e D2 (divisão II, sorotipos 1/2a, 1/2c, 3a, e 3c). A mistura de amplificação foi composta por 12,5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega), 2 µL DNA, 40 µM dos primers D1 e D2 e água ultrapura de PCR (Promega) obtendo-se uma reação final de 25µL. As sequências de cada primer utilizado estão representadas na Tabela 2.

Conforme Borucki & Call (2003) as condições das reações de PCR foram: 25 µL, 95 °C por 3 min, 25 ciclos (primers D1, D2 e GLT) ou 30 ciclos (primer flaA) a 95 °C por 30 s, 45 a 59 °C por 30 s (59 °C para D1 e D2; 45 °C para GLT; 54 °C para flaA), 72 °C por 1 min, 72 °C por 10 min. Alíquotas de 5 µL dos produtos de PCR foram submetidas a eletroforese em géis de agarose a 2,0 % (m/v) e tampão de 0,5 M Tris/borato/EDTA (TBE), coradas com GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA), e visualizado em um transiluminador.

Todos os isolados previamente submetidos ao PCR multiplex foram também submetidos às reações de PCR simplex para detecção dos genes GLT e flaA para a caracterização dos sorogrupos, as condições de PCR foram as mesmas descritas por Borucki & Call (2003) para cada gene pesquisado. Para cada região de DNA alvo, foram observados os seguintes tamanhos de produtos de PCR: 214 pb para D1, 140 pb para D2, 538 pb para flaA e 483 pb para GLT. Em todos os ensaios moleculares, as estirpes de *L. monocytogenes* Scott A, ATCC 7644, foram utilizados como controles positivos .

Os isolados positivos para D1 e negativos para o gene GLT foram classificados como sorogrupos 4b, 4d (divisão I) ou 4a, 4c (divisão III, raramente encontrada). Já os isolados que apresentaram resultado positivo para D1 e GLT, foram classificados como pertencentes aos sorogrupos 1/2b ou 3b. Os isolados positivos para D2 e negativos para o gene flaA foram caracterizados como pertencentes ao sorogrupo 1/2c ou 3c (divisão II), e resultados positivos para flaA caracteriza o sorogrupo 1/2a ou 3a (divisão II) (Borucki & Call, 2003).

Potencial de virulência de *Listeria monocytogenes*

Adicionalmente, os isolados foram submetidos a testes moleculares para verificação da presença de genes de virulência, conforme protocolos descritos por Liu et al.,(2007) e Rawool et al., (2007). Reações de Multiplex e Simplex PCR foram

utilizadas para a detecção dos seguintes genes de virulência *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *hlyA*, *actA*, e *iap*.

Conforme Liu et al. (2007) as condições de reações para o Multiplex PCR (*inlA*, *inlC* e *inlJ*) foram: 25 µL, 94 °C por 2 min, 30 ciclos a 94 °C por 20 s, 55 °C por 20 s, 72 °C por 50 s, 72 °C por 2 min. As condições para o Simplex PCR (*inlB*) foram: 25 µL, 94 °C por 2 min, 30 ciclos a 94 °C por 20 s, 55 °C por 20 s, 72 °C por 50 s, 72 °C por 2 min. As condições para o Multiplex PCR (*hlyA*, *actA*, *iap*), conforme Rawool et al. (2007), foram: 25 µL, 95 °C por 2 min, 35 ciclos a 95 °C por 15 s, 60 °C por 30 s, 72 °C por 1.5 min, 72 °C por 10 min. Para o Simplex PCR (*plcA*): 25 µL, 95 °C por 2 min, 35 ciclos a 95 °C por 15 s, 60 °C por 30 s, 72 °C por 1.5 min, 72 °C por 10 min. As reações foram compostas por 25 µL, sendo 12,5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega), 2,0 µL do DNA extraído, 1,0 µL de cada primer, e água ultrapura de PCR (Promega) para perfazer o volume final. Os produtos de PCR foram separados e visualizados como descrito na caracterização dos sorogrupos. *L. monocytogenes* ATCC 7644 foi testado em paralelo como um controle positivo para os genes de virulência testados.

Resultados e Discussão

Os resultados da enumeração de micro-organismos indicadores de higiene em cada estabelecimento analisado são apresentados na Tabela 3. De maneira geral, os resultados demonstraram que não houve diferenças significativas nos níveis de contaminação pelos micro-organismos indicadores de higiene pesquisados entre os três estabelecimentos ($p < 0,05$).

Todas as fontes amostradas nos três estabelecimentos apresentaram alguma contagem, tanto para a enumeração de AM quanto para EB (Tabela 3). A presença desses micro-organismos é indicativa que a manipulação das variadas superfícies em todos os açougues está sendo feita sem higiene adequada, e que os alimentos produzidos nessas superfícies sofrem algum risco de deterioração (Silva et al., 2007). Particularmente os AM são todos aqueles capazes de se multiplicar em temperaturas de 35-37 °C em condições de aerobiose, e indicam a qualidade sanitária com que o produto foi processado, sendo que elevadas contagens indicam condições de insalubridade, mesmo que não haja micro-organismos patogênicos. A pesquisa de EB tem sido utilizada como importante ferramenta para os sistemas de qualidade, por indicarem, quando presentes, deficiências na higienização; este grupo abriga ainda micro-

organismos patogênicos como *Salmonella* spp. e *E.coli*, que representam perigos ao consumidor final (Forsythe et al., 2002).

O estabelecimento B apresentou um nível de contaminação para CT em moedor significativamente superior aos demais (Tabela 3, $p < 0,05$). Os coliformes são um grupo de enterobactérias presentes nas fezes, no ambiente, no solo e em superfícies variadas, como equipamentos e utensílios. Fazem parte deste grupo micro-organismos dos gêneros como *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, sendo que *E. coli* tem como habitat primário o trato intestinal dos animais, sugerindo uma contaminação de origem fecal quando presente (Rodrigues et al., 2003). Além disso, esse grupo indica condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento, e altas contagens podem significar contaminação pós-processamento, limpeza e sanitificações deficientes.

A Tabela 4 apresenta as frequências de amostras com contagens acima de valores referenciais de micro-organismos indicadores de higiene. Apesar de não ter havido diferença estatística entre os três açougues, o status de contaminação entre eles foi equivalente. Amostras com contagens acima de valores referenciais indicam ineficiência nas técnicas de higienização praticadas nos três estabelecimentos (Tabela 4). Do total de 144 amostras analisadas 54 (37,5 %) apresentaram contagens acima do valor referencial para AM, enquanto para EB foram 24 amostras (16,7 %). Em relação a CT e EC, as frequências de amostras com contagens acima dos valores referenciais foram 7 (4,9 %) e 3 (2,1 %), respectivamente (Tabela 4).

Particularmente as amostras obtidas com contagens acima dos valores referenciais para AM foram mais frequentes em moedores (11 amostras), mesas e balcão de refrigeração (10 amostras), amaciadores e mãos de manipuladores (9 amostras). Conforme preconizado pelos padrões do *Foods and Drugs Administration* - (FDA) e da *American Public Health Association* - (APHA) é considerado limpo, aquele utensílio que possui menos de 100 UFC, sendo que para equipamentos é tolerado a contagem de 2 UFC/cm².

Em relação a EB, os moedores apresentaram a maior frequência de amostras com contagens acima do valor referencial (Tabela 4). Por serem equipamentos de difícil higienização, amaciadores e moedores podem acumular matéria orgânica, favorecer a multiplicação microbiana e reduzir a eficiência dos procedimentos de sanitização. Na identificação dos principais pontos de contaminação microbiológica em uma linha de processamento de carne no Paraná, Barros et al. (2007) consideraram amaciadores e

moedores como os principais pontos de contaminação por micro-organismos indicadores de higiene.

Em relação as contagens de CT e EC, amaciadores e moedores apresentaram maiores frequências de amostras com contagens acima dos valores referenciais; assim como mãos de manipuladores e facas (Tabela 4). Germano et al. (2000) salientam a importância da manipulação inadequada como principal fonte de contaminação entre alimentos crus e processados, ressaltando a importância da contaminação cruzada para a transmissão dos micro-organismos patogênicos e deteriorantes. Conforme Silva et al. (1996) o padrão satisfatório para EC e CT é a ausência de micro-organismos (nenhuma contagem), de modo que as contagens acima do valor referencial evidenciam as práticas inadequadas de higiene adotadas nos estabelecimentos bem como o potencial de abrigar possíveis enteropatógenos.

Na avaliação da ocorrência de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*, entre as 144 amostras analisadas foram obtidas 87 (60,4 %) amostras positivas para *Listeria* spp. e 31 (21,5 %) para *L. monocytogenes* (Tabela 5). Todas as fontes amostradas apresentaram resultados positivos para *Listeria* spp. em todos os estabelecimentos analisados. A frequência de 60,4 % de amostras positivas para *Listeria* spp. indica a disseminação deste gênero no ambiente de processamento de produtos cárneos, enfatizando a importância dos pontos analisados como possíveis fontes de contaminação dos produtos finais.

De acordo com a Tabela 5, a frequência de amostras positivas para *L. monocytogenes* (21,5 %) demonstrou a presença do patógeno nas superfícies que mantêm um contato direto e constante com os produtos cárneos, determinando a possibilidade de contaminação dos produtos finais. Todas as superfícies ambientais foram positivas para *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* quando analisadas em conjunto. As amostras com maior frequência de *Listeria* spp. foram mesas (91,6 %) e moedores (83,3 %), sendo que as frequências de *L. monocytogenes* nos mesmos pontos foram de 20,8 % em mesas e 29,1 % em moedores, que junto aos amaciadores apresentaram a maior frequência de resultados positivos para o patógeno. Barros et al. (2007) também avaliou a frequência de *Listeria* spp. em instalações e equipamentos de estabelecimentos que processam produtos cárneos, observando uma frequência para *Listeria* spp. de 51,4 % (74 amostras) em equipamentos e 35,4 % (23 amostras) em instalações, e a frequência obtida para *L. monocytogenes* nos mesmos pontos foi de 9,2 % (7 amostras) e 10,5 % (2 amostras), respectivamente.

A Tabela 5 indica ainda que o estabelecimento A apresentou um nível de contaminação por *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* no amaciador superior ao estabelecimento B, e inferior ao C ($p < 0,05$). A presença desse patógeno no ambiente de processamento de produtos cárneos, mesmo após a higienização, representa perigo microbiológico para os produtos finais. Devido a sua capacidade de formar biofilmes, *Listeria* spp. podem permanecer neste ambiente por meses ou até mesmo anos, ocasionando uma possível contaminação do produto final e uma possível exposição a espécie patogênica (Heir et al., 2004; Torres et al., 2005; Medrala et al., 2003; Ilsi, 2005; Autio et al., 2003; Berrang et al., 2005).

Do total de 31 amostras positivas para *L. monocytogenes*, foi obtida uma coleção de 74 isolados. Na caracterização dos sorogrupos, 52 isolados foram caracterizados como pertencentes aos sorogrupos 1/2c ou 3c, e 22 isolados como pertencentes aos sorogrupos 4b, 4d, 4a ou 4c. Os sorogrupos 4a e 4c pertencentes a divisão III podem ser diferenciados por um PCR com o primer MAMA-C (Jinneman & Hill, 2001), no entanto os isolados não foram submetidos a este PCR pois estes sorogrupos são raramente relacionados a contaminação de produtos alimentícios e casos clínicos (Borucki & Call 2003; Orsi et al., 2011).

As frequências de resultados positivos para cada sorogrupo de acordo com os pontos amostrados são apresentadas na Tabela 6. A maioria dos isolados obtidos (70,3 %) pertence ao sorogrupos 1/2c ou 3c, que juntamente aos sorogrupos 1/2a ou 3a, 1/2b ou 3b, tem sido identificados no ambiente de processamento de alimentos em diferentes estudos (Doumith et al., 2004; de las Heras et al., 2011; Orsi et al., 2011).

A frequência de 29,3 % foi obtida para isolados pertencentes aos sorogrupos 4b, 4d, 4a ou 4c, de maneira semelhante Camargo et al. (2015) avaliou isolados provenientes de ambiente de processamento de produtos cárneos, em que todos foram classificados como pertencentes aos sorogrupos 4b, 4d, 4a ou 4c, 1/2a ou 3a, e 1/2b ou 3b, relacionados a maioria dos surtos e casos esporádicos de listeriose.

Na caracterização de virulência, todos os 74 isolados foram positivos para os genes *hlyA*, *iap*, *plcA*, *actA* e também para o grupo das internalinas (*inlA*, *inlB*, *inlC* e *inlJ*), assim como observado por Camargo et al. (2014) em isolados obtidos de couro e carcaça bovina no estado de Minas Gerais, Brasil. Estes genes desempenham um importante papel nos mecanismos de virulência deste patógeno, e estão envolvidos em diferentes estágios da sua patogênese (Cabanés et al., 2002). Após a invasão da célula hospedeira, alguns genes de virulência adicionais são expressos, incluindo o *hlyA*, que está envolvido com a produção de listeriolisina-O. O gene *plcA* está associado a

produção de fosfolipase-C; já o gene *actA* está relacionado à expressão da proteína *actA*; o gene *iap* por sua vez, atua na expressão da proteína p60, relacionada a invasão e sobrevivência em células intestinais (Vazquez-Boland et al., 2001). Em outro estudo que avaliou isolados obtidos do ambiente de processamento de alimentos, produtos cárneos e casos clínicos oriundos de 11 estados brasileiros entre os anos de 1978 e 2013, Camargo et al. (2015) verificou que todas as cepas de *L. monocytogenes* dos sorotipos 4b, 1/2a, 1/2b e 1/2c foram positivas para os genes *inlA*, *inlC* e *inlJ*.

Liu et al. (2007), detectou os mesmos genes do grupo das internalinas (*inlA*, *inlB*, *inlC* e *inlJ*) em isolados das divisões I e II pertencentes aos sorotipos reconhecidos como mais patogênicos (4b, 1/2a, 1/2b e 1/2c). Em outro trabalho, Shen et al. (2013) detectaram a presença dos genes *inlC* e *inlJ* em todos isolados (97) das divisões I e II (sorogrupos 4b, 4d, 4e; 1/2b, 3b, 7; 1/2a, 3a; 1/2c, 3c) obtidos de produtos cárneos. O grupo das internalinas, que por sua vez são proteínas que induzem a internalização de *L. monocytogenes* por células epiteliais, são codificadas por uma família de múltiplos genes, sendo que dois deles (*inlA* e *inlB*) codificam duas internalinas particularmente importantes para a patogenicidade de *L. monocytogenes*. O gene *inlC*, que não está envolvido no processo de entrada na célula epitelial, parece estar envolvido na virulência, participando da disseminação da infecção. O gene *inlJ* é diretamente relacionado à passagem de *L. monocytogenes* através da barreira intestinal (Vázquez - Boland et al., 2001; Liu et al., 2007).

Conclusão

Conforme os resultados obtidos na enumeração de micro-organismos indicadores de higiene, as condições higiênico-sanitárias do ambiente de processamento de produtos cárneos dos açougues analisados encontravam-se inadequadas, representando risco de contaminação microbiológica ao produto final. Os resultados demonstraram que não foram verificadas diferenças significativas nos níveis de contaminação entre os três estabelecimentos analisados na pesquisa de indicadores de higiene, e as frequências de amostras com contagens acima de valores referenciais para cada indicador evidenciaram práticas inadequadas de higiene adotadas pelos estabelecimentos.

Adicionalmente, a detecção de *Listeria* spp. indica a disseminação deste gênero no ambiente de açougues, sendo que o isolamento de *L. monocytogenes* no ambiente de processamento de produtos cárneos é indicativo de possível contaminação dos produtos

finais destinados aos consumidores, que por sua vez podem determinar contaminação cruzada para outros alimentos. O presente estudo identificou a presença de sorogrupos de *L. monocytogenes* reconhecidos como patogênicos, bem como a presença dos genes de virulência, indicativos da potencial exposição dos consumidores a cepas patogênicas. As mesas juntamente aos moedores e amaciadores foram identificados como as fontes de maior contaminação para a espécie patogênica em questão, evidenciando uma maior atenção aos cuidados de limpeza dedicados a estes pontos específicos.

Referências Bibliográficas

Andrade, N. J., J.A. Macêdo.1996. Higienização na indústria de alimentos. São Paulo: Varela. 189.

Autio, T., R. Keto-Timonen, R.J. Lundén, J. Björkroth, H. Korkeala. 2003. Characterization of persistent and sporadic *Listeria monocytogenes* strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). *Systematic Applied Microbiology*. 26: 539–545.

Barros, M.A., L.A. Nero, L.C. Silva, L. d'Ovidio, F.A. Monteiro, R. Tamanini, R. Fagnani, E. Hofer, V. Beloti. 2007. *Listeria monocytogenes*: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. *Meat Science*. 76:591-596.

Berrang, M. E., R.J., Meinersmann, J.F. Frank, D.P. Smith, L.L. Genzlinger. 2005. Distribution of *Listeria monocytogenes* subtypes within poultry further processing plant. *Journal of Food Protection*. 68: 980-985.

Borucki, M.K., D.R. Call. 2003. *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 5537-5540.

Cabanes, D., P. Dehoux, O. Dussurget, L. Frangeul, P. Cossart. 2002. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends of Microbiology*. 10:238-245.

Camargo, A.C, A. Lafisca, M. V. C. Cossi, F. G. P. A. Lanna, M.R. Dias, P. S.A. Pinto, L. A. Nero. 2014. Low occurrence of *Listeria monocytogenes* on bovine hides and carcasses in Minas Gerais State, Brazil: Molecular characterization and antimicrobial Resistance. *Journal of Food Protection*. 77:1148-1152.

Camargo, A.C., M. Dias, M.V.C. Cossi, F. Lanna, V. Q. Cavichioli, D. Vallim, E. Hofer, P.S.A. Pinto, L.A. Nero. 2015. Serotypes and pulsotypes diversity of *L. monocytogenes* in beef processing environment. *Foodborn - Pathogens and Disease*. in press.

Capita, R., M. Prieto, C. Alonso-Calleja. 2004. Sampling methods for microbiological analysis of red meat and poultry carcasses. *Journal of Food Protection*. 67:1303-1308.

Carpentier, B., O. Cerf. 2011. Review-Persistence of *Listeria monocytogenes* in food, industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*. 145:1-8.

Catão, R. M. R., B.S. Ceballos. 2001. O. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios no estado da Paraíba. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 21: 281-287.

Cossi, M. V. C.; Burin, R. C. K. ; Silva, D. A. L.; Dias, M. R.; Castilho, N. P. A.; Soares, P. F.; Pinto, P. S. A.; Nero, L. A. 2013. Pathogenic potential and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. isolates obtained from butcher shop environments. In: *Journal of Food Protection*. 76:1633-1637.

de las Heras, A., R. J. Cain, M. K. Bielecka, J. A. Vázquez- Boland. 2011. Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Current Opinion in Microbiology*. 14:118-127.

Destro, M.T., M.F.F. Leitão, J.M. Farber. 1996. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:705-711.

Doumith, M., C. Buchrieser, P. Glaser, C. Jacquet, and P. Martin. 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 42:3819-3822.

Eisel, W.G., R.H. Linton, P.M. Muriana. 1997. A survey of microbial levels for incoming raw beef, environmental sources, and ground beef in a processing plant. *Food Microbiology*. 14:273-282.

Forsythe, S. J. 2002. *Microbiologia de segurança alimentar*. Porto Alegre: Artmed. 424.

Franco, B. D. G. M.,M. Landgraf. 2003. *Microbiologiadados alimentos*. 2. ed. São Paulo: Atheneu. 182.

Gandhi, M.; Chikindas, M.L. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*. 13:1-15.

Germano, M.I.S., P.M.L. Germano, C.A.K Kamei. 2000. Manipuladores de alimentos: capacitar? É preciso.Regulamentar? Será preciso? *Higiene Alimentar*. 14:18-22.

Ghafir, Y., B. China, K. Dierick, L. De Zutter, G. Daube. 2008. Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork, and poultry meats in Belgium. *Journal of Food Protection*. 71:35-45.

Gill, C.O., B. Deslandes, K. Rahn, A. Houde, J. Bryant. 1998. Evaluation of the hygienic performances of the processes for beef carcass dressing at 10 packing plants. *Journal of Applied Microbiology*. 84:1050-1058.

Gill, C. O., L. F. Moza, A. Badoni, S. Barbut. 2006. The effects on the microbiological condition of product of carcass dressing, cooling, and portioning processes at a poultry packing plant. *International Journal of Food Microbiology*. 110:187-193.

Harrigan, W. F.; Mc Cance, M. E. 1976 *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. Londres:Academic. 456.

Heir, E., B.A. Lindstedt, O.J. Røtterud, T. Vardund, T.; G. Georg Kapperud, T. Nesbakken. 2004. Molecular epidemiology and disinfectant susceptibility of *Listeria*

monocytogenes from meat processing plants and human infections. *International Journal of Food Microbiology*. 96:85-96.

Hood, S. K. E. A Zottola. 1995. Biofilms in food processing. *Food Control*, Reading. 6:9-18.

Ilsi Research Foundation/Risk Science Institute. 2005. Expert panel on *Listeria monocytogenes* in foods. Achieving continuous improvement in reductions in Foodborne Listeriosis - A risk-based approach. *Journal of Food Protection*. 68:1932-1994.

International Organization for Standardization. 1996. ISO 11290-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs - horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* part 1: detection method. International Organization for Standardization, Geneva.

International Organization for Standardization. 2004. ISO 11290-1 Amd 1. Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data. International Organization for Standardization, Geneva.

Jay, J. M., M.J. Loessner, D.A. Golden. 2005. *Modern Food Microbiology*. 7 ed., New York: Springer. 790.

Johnston, A.M. 2000. Animal health and food safety. *British Medical Bulletin*. 56:51-61.

Keto-Timonen, R.O.; Autio, T.; Korkeala, H.J. 2003. An improved amplified fragment length polymorphism (AFLP) protocol for discrimination of *Listeria* Isolates. *Systematic Applied Microbiology*. 26:236-244.

Kwang, J., E.T. Littledike, J.E. Keen. 1996. Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. *Letters in Applied Microbiology*. 22:46-51.

Liu, D. Y., M. L. Lawrence, F. W. Austin, A. J. Ainsworth. 2007. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiology Methods*. 73: 133-140.

Medrala, D., W. Dabrowski, U. Czekajo-Koodziej, E. Daczowskakozon, A. Koronkiewicz, E. Augustynowicz, M. Manzano. 2003. Persistence of *Listeria monocytogenes* strains isolated from products in a Polish fishprocessing plant over a 1-year period. *International Journal of Food Microbiology*. 20:715-724.

Mena, C., G. Almeida, L. Carneiro, P. Teixeira, T. Hogg, P.A. Gibbs. 2004. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *International Journal of Food Microbiology*. 21: 213-216.

Moreno, L. S. 1982. *Higiene de lá alimentación*. Barcelona: Aedos. 250.

Orsi, R. H., H. C. den Bakker, M. Wiedmann. 2011. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*. 301:79-96.

Pagotto, F., K. Hébert, J. Farber. 2011. MFHPB-30: Isolation of *Listeria monocytogenes* and Other *Listeria* spp. from foods and environmental samples.

Methods for the microbiological analysis of foods. Compendium of Analytical Methods, Volume 2. Health Canada, Health Products and Food Branch.

Ragon, M., T. Wirth, F. Hollandt, R. Lavenir, M. Lecuit, A. Le Monnier, and S. Brisse. 2008. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathogen*. 4:100-146.

Rawool, D. B., S. V. S. Malik, S. B. Barbuddhe, I. Shakuntala, R. A. Aurora. 2007. A multiplex PCR for detection of virulence associated genes in *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Safety*. 9:56-62.

Rodrigues, K.L. Condições higiênico-sanitárias no comércio de alimentos em Pelotas-RS. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 23:447-452.

Rodrigues, A. C. A., P. S. A. Pinto, M. C. D. Vanetti, P. D. Bevilacqua, M. S. Pinto, L. A. Nero. 2008. Análise e monitoramento de pontos críticos no abate de frangos utilizando indicadores microbiológicos. *Ciência Rural*. 38:1948-1953.

Sant'Ana A.S., M.S. Barbosa, M.T. Destro, M. Landgraf, B. D.G.M. Franco. 2012. Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*. 157:52-58.

Shen, J., I. Rump, Y. Zhang, Y. Chen, X. Wang, J. Meng. 2013. Molecular subtyping and virulence gene analysis of *L. monocytogenes* isolates from food. *International Journal of Food Microbiology*. 35:58-64.

Silva, N.; Amswalden, V. C. 1997. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela. 317.

Silva JR, E. A. 2007. Manual de controle higiênico sanitário em serviços de alimentação. 6:623.

Siqueira, R.S. 1995. Manual de microbiologia de alimentos. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos (Rio de Janeiro, RJ). Brasília, Embrapa-SPI, Rio de Janeiro, Embrapa-CTAA. 159.

Torres, K., S. Sierra, R. Poutou, A. Carrascal, M. Mercado. 2005. Patogenesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. *MVZ-Córdoba*. 10:511-543.

Vázquez-Boland, J. A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Dominguez-Bernal, W. Goebel, B. Gonzalez-Zorn, J. Wehland, and J. Kreft. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology*. 14:584-640.

Wagner, M.; F. Eliskases-Lechner, P. Rieck, I. Hein, F. Allerberger. 2006. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from 50 small-scale Austrian cheese factories. *Journal of Food Protection*. 69:1297-1303.

Tabela1: Número de amostras e procedimentos de coletas, em diferentes pontos de estabelecimentos comerciais de produtos cárneos, localizados no estado de Minas Gerais, Brasil.

Origem	Amostra	Especificação	Área amostrada	Amostras			Total	Método ¹
				A	B	C		
Ambiente	Balcão refrigerado	interior do balcão refrigerado	100cm ²	8	8	8	24	swab
	Mãos	mãos de manipuladores	100cm ²	8	8	8	24	swab
	Mesas	superfície de corte	100cm ²	8	8	8	24	swab
Equipamento	Moedor	-	100cm ²	8	8	8	24	swab
	Amaciador	-	100cm ²	8	8	8	24	swab
Utensílio	Faca	-	100cm ²	8	8	8	24	swab

¹Conforme descrito por Cossi et al., 2013

Tabela 2: Genes alvo e sequências de primers utilizados para identificação dos sorogrupos e caracterização do potencial de virulência, do isolados obtidos no presente estudo.

Análise	Genes Alvo	Sequência do primer	Referência
Sorogrupos	D1	(F: CGATATTTTATCTACTTTGTCA; R: TTGCTCCAAAGCAGGGCAT)	(Borucki and Call 2003)
	D2	(F: GCGGAGAAAGCTATCGCA; R: TTGTTCAAACATAGGGCTA)	(Borucki and Call 2003)
	FlaA	(F: TTACTAGATCAAAGCTGCTCC; R: AAGAAAAGCCCCTCGTCC)	(Dons et al. 1992)
	GLT	(F: AAAGTGAGTTCTTACGAGATTT; R: AATTAGGAAATCGACCTTCT)	(Lei et al. 2001)
Genes virulência	inlA	(F: ACGAGTAACGGGACAAATGC; R: CCCGACAGTGGTGCTAGATT)	(Liu et al. 2007)
	inlB	(F: TGGGAGAGTAACCCAACCAC; R: GTTGACCTTCGATGGTTGCT)	(Liu et al. 2007)
	inlC	(F: AATTCCCACAGGACACAACC; R: CGGGAATGCAATTTTTTCACTA)	(Liu et al. 2007)
	inlJ	(F: GTAACCCCGCTTACACAGTT; R: AGCGGCTTGGCAGTCTAATA)	(Liu et al. 2007)
	plcA	(F: CTGCTTGAGCGTTCATGTCTCATCCCC; R: ATGGGTTTCACTCTCCTTCTAC)	(Notermans et al. 1991)
	hlyA	(F: GCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA; R: GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG)	(Paziak-Domanska et al. 1999)
	actA	(F: CGCCGCGGAAATTAAAAAAGA; R: ACGAAGGAACCGGGCTGCTAG)	(Suarez and Vazquez-Boland 2001)
	iap	(F: ACAAGCTGCACCTGTTGCAG; R: TGACAGCGTGTGTAGTAGCA)	(Furrer et al. 1991)

Tabela 3: Médias ($\pm$ desvio padrão) de micro-organismos indicadores de higiene para cada fonte amostrada, em cada estabelecimento analisado.

Indicador	Amostra	Açougue			ANOVA ¹
		A	B	C	
AM	Faca	1,59 $\pm$ 0,98	1,16 $\pm$ 0,73	1,40 $\pm$ 0,9	F _(2, 17) = 0,40; p = 0,678
	Mão	1,75 $\pm$ 0,99	1,56 $\pm$ 0,95	1,40 $\pm$ 0,56	F _(2, 17) = 0,26; p = 0,770
	Mesa	1,71 $\pm$ 0,84	1,64 $\pm$ 0,83	1,52 $\pm$ 1,03	F _(2, 16) = 0,70; p = 0,930
	Moedor	1,98 $\pm$ 0,42	1,23 $\pm$ 0,81	1,90 $\pm$ 0,87	F _(2, 15) = 1,91; p = 0,180
	Amaciador	1,80 $\pm$ 0,75	0,93 $\pm$ 0,97	1,73 $\pm$ 0,97	F _(2, 17) = 1,84; p = 0,190
	Balcão ref.	1,43 $\pm$ 1,03	2,04 $\pm$ 0,78	1,58 $\pm$ 1,16	F _(2, 15) = 0,71; p = 0,500
EB	Faca	1,50 $\pm$ 0,42	0,43 $\pm$ 0,4	1,08 $\pm$ 1,17	F _(2, 14) = 3,17; p = 0,072
	Mão	1,08 $\pm$ 0,84	1,48 $\pm$ 0,83	1,56 $\pm$ 1,34	F _(2, 13) = 0,41; p = 0,670
	Mesa	1,17 $\pm$ 0,85	1,07 $\pm$ 0,96	0,84 $\pm$ 0,76	F _(2, 13) = 0,20; p = 0,820
	Moedor	1,78 $\pm$ 0,78	1,65 $\pm$ 0,49	1,57 $\pm$ 0,46	F _(2, 13) = 0,14; p = 0,870
	Amaciador	1,72 $\pm$ 0,51	0,85 $\pm$ 0,61	1,13 $\pm$ 0,62	F _(2, 11) = 3,30; p = 0,080
	Balcão ref.	0,59 $\pm$ 0,83	0,66 $\pm$ 0,88	2,12 $\pm$ 0,83	F _(2, 5) = 2,23; p = 0,200
CT	Faca	0,60 $\pm$ 0,0	-	2,78 $\pm$ 0,0	-
	Mão	1,43 $\pm$ 0,4	0,30 $\pm$ 0,0	1,79 $\pm$ 0,83	F _(2, 2) = 1,76; p = 0,360
	Mesa	0,84 $\pm$ 0,69	-	1,60 $\pm$ 0,52	F _(1, 4) = 2,30; p = 0,200
	Moedor	1,04 $\pm$ 0,08 ^a	1,90 $\pm$ 0,29 ^b	0,60 $\pm$ 0,0 ^a	F _(2, 3) = 21,99; p = 0,016
	Amaciador	1,97 $\pm$ 0,0	-	1,65 $\pm$ 0,0	-
	Balcão ref.	-	-	-	-
EC	Faca	0,0 $\pm$ 0,0	-	2,72 $\pm$ 0,0	-
	Mão	0,99 $\pm$ 0,4	0,0 $\pm$ 0,0	1,33 $\pm$ 0,78	F _(2, 2) = 1,31; p = 0,430
	Mesa	0,20 $\pm$ 0,35 ^a	-	1,31 $\pm$ 0,3 ^a	F _(1, 4) = 17,80; p = 0,01
	Moedor	0,69 $\pm$ 0,08	0,60 $\pm$ 0,42	0,30 $\pm$ 0,0	F _(2, 2) = 0,24; p = 0,820
	Amaciador	1,20 $\pm$ 0,0	-	1,51 $\pm$ 0,0	F _(1, 1) = 0,06; p = 0,840
	Balcão ref.	-	-	-	-

¹ Médias com letras diferentes indicam diferenças significativas por ANOVA (p < 0.05).

Tabela 4: Frequências de amostras com contagens de micro-organismos indicadores de higiene acima de valores referenciais.

Indicador ¹	Amostra	Açougue			Estatística
		A	B	C	
Aeróbios mesófilos (50 UFC/cm ²)	Faca	3/8	1/8	1/8	$\chi^2 = 2,02$, DF = 2, p = 0,364
	Mão	3/8	3/8	3/8	$\chi^2 = 0,00$, DF = 2, p = 1,000
	Mesa	3/8	3/8	4/8	$\chi^2 = 0,34$, DF = 2, p = 0,842
	Moedor	5/8	2/8	4/8	$\chi^2 = 2,34$, DF = 2, p = 0,308
	Amaciador	5/8	1/8	3/8	$\chi^2 = 4,26$, DF = 2, p = 0,118
	Balcão ref.	2/8	5/8	3/8	$\chi^2 = 2,40$, DF = 2, p = 0,301
Enterobactérias (50 UFC/cm ²)	Faca	3/8	0/8	1/8	$\chi^2 = 4,20$, DF = 2, p = 0,122
	Mão	1/8	2/8	1/8	$\chi^2 = 0,60$, DF = 2, p = 0,740
	Mesa	2/8	1/8	1/8	$\chi^2 = 0,60$, DF = 2, p = 0,740
	Moedor	3/8	3/8	2/8	$\chi^2 = 0,37$, DF = 2, p = 0,830
	Amaciador	2/8	0/8	1/8	$\chi^2 = 2,28$, DF = 2, p = 0,318
	Balcão ref.	0/8	1/8	1/8	$\chi^2 = 1,09$, DF = 2, p = 0,580
Coliformes (10 UFC/cm ²)	Faca	0/8	0/8	1/8	$\chi^2 = 2,08$, DF = 2, p = 0,352
	Mão	1/8	0/8	1/8	$\chi^2 = 1,09$, DF = 2, p = 0,580
	Mesa	0/8	0/8	1/8	$\chi^2 = 2,08$, DF = 2, p = 0,352
	Moedor	0/8	2/8	0/8	$\chi^2 = 4,36$, DF = 2, p = 0,112
	Amaciador	1/8	0/8	0/8	$\chi^2 = 2,08$, DF = 2, p = 0,352
	Balcão ref.	0/8	0/8	0/8	-
Escherichia coli (10 UFC/cm ²)	Faca	1/8	0/8	0/8	$\chi^2 = 2,08$, DF = 2, p = 0,352
	Mão	1/8	0/8	0/8	$\chi^2 = 2,08$, DF = 2, p = 0,352
	Mesa	0/8	0/8	0/8	-
	Moedor	0/8	0/8	0/8	-
	Amaciador	1/8	0/8	0/8	$\chi^2 = 2,08$, DF = 2, p = 0,352
	Balcão ref.	0/8	0/8	0/8	-

¹Valores Referenciais

Tabela 5: Frequências de amostras positivas para *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* em ambiente, equipamentos e utensílios, em três estabelecimentos comerciais analisados.

Alvo	Amostra	Açougue			Estatística
		A	B	C	
<i>Listeria</i> spp.	Faca	7/8	5/8	4/8	$\chi^2 = 2,62$, DF = 2, p = 0,269
	Mão	4/8	5/8	4/8	$\chi^2 = 0,33$, DF = 2, p = 0,845
	Mesa	8/8	8/8	6/8	$\chi^2 = 4,36$, DF = 2, p = 0,112
	Moedor	8/8	6/8	6/8	$\chi^2 = 2,40$, DF = 2, p = 0,301
	Amaciador	3 ^{ab} /8	0 ^b /8	6 ^a /8	$\chi^2 = 9,60$, DF = 2, p = 0,008
	Balcão ref.	1/8	3/8	3/8	$\chi^2 = 1,61$, DF = 2, p = 0,446
<i>Listeria monocytogenes</i>	Faca	2/8	3/8	1/8	$\chi^2 = 1,33$, DF = 2, p = 0,513
	Mão	2/8	1/8	0/8	$\chi^2 = 2,28$, DF = 2, p = 0,318
	Mesa	3/8	2/8	0/8	$\chi^2 = 3,53$, DF = 2, p = 0,170
	Moedor	1/8	3/8	3/8	$\chi^2 = 1,61$, DF = 2, p = 0,446
	Amaciador	2 ^{ab} /8	0 ^b /8	5 ^a /8	$\chi^2 = 4,66$, DF = 2, p = 0,021
	Balcão ref.	0/8	1/8	2/8	$\chi^2 = 2,28$, DF = 2, p = 0,318

¹ Médias com letras diferentes indicam diferenças significativas por χ^2 (p < 0.05).

Tabela 6: Frequências de amostras identificadas como positivas para diferentes sorogrupos de *Listeria monocytogenes* (número de isolados), em ambiente, equipamentos e utensílios, em três estabelecimentos comerciais analisados.

Alvo	Fonte	Açougue		
		A	B	C
Sorogrupo 4b, 4d, 4a ou 4c	Faca	1/8 (5)	1/8 (1)	0/8
	Mão	1/8 (3)	0/8	0/8
	Mesa	1/8 (2)	1/8 (1)	0/8
	Moedor	1/8 (1)	0/8	0/8
	Amaciador	2/8 (6)	0/8	2*/8 (2)
	Balcão ref.	0/8	1/8 (1)	0
Sorogrupo 1/2c ou 3c	Faca	1/8 (1)	2/8 (2)	1/8 (1)
	Mão	1/8 (1)	1/8 (1)	0/8
	Mesa	2/8 (2)	1/8 (5)	0/8
	Moedor	0/8	3/8 (13)	2/8 (9)
	Amaciador	1*/8 (1)	0/8	4*/8 (8)
	Balcão ref.	0/8	0/8	2/8 (6)

* uma amostra positiva para ambas divisões de sorogrupo.

**CAPÍTULO 2. Potencial de adesão in vitro e virulência de *Listeria monocytogenes*
sensibilidade aos sanitizantes Mister Max-DG1[®] e B-QUART SEPT[®]**

Danilo Augusto Lopes da Silva et al.

Trabalho a ser submetido ao periódico Food Control, após correções e sugestões da banca

Resumo

A contaminação por *Listeria monocytogenes* em ambientes de processamento de alimentos é de difícil controle, devido a sua ampla disseminação e adaptação, o que demanda monitoramento constante e adoção de procedimentos eficientes para eliminação desse patógeno. Este trabalho avaliou a ocorrência de *L. monocytogenes* (ISO 11.290 1/2) em utensílios e ambiente de manipulação em um açougue, e os isolados obtidos foram caracterizados quanto aos seus sorogrupos e genes de virulência e ainda avaliados quanto à capacidade de adesão *in vitro* e sensibilidade a dois sanitizantes (Mister Max-DG1[®] e B-QUART SEPT[®]). Do total de 40 amostras de mesas, facas, interior do balcão refrigeração, moedores e amaciadores de carne, 75 % foram positivas para *Listeria* spp. e 22,5 % para *L. monocytogenes*. Todos os isolados obtidos foram caracterizados como sorogrupos 1/2c ou 3c, e apresentaram resultados positivos para todos os genes de virulência analisados. Adicionalmente, todos os isolados apresentaram algum potencial de adesão, em sua maioria apresentando potenciais de adesão variando de fraco a moderado, sendo que somente um isolado apresentou um forte potencial de adesão. Os sanitizantes avaliados apresentaram potencial para inibir da multiplicação dos isolados em diferentes concentrações (1:256 a 1:512 para Mister Max-DG1[®], e 1:4.096 a 1:16.384 para B-QUART SEPT[®]), e interferiram na formação e remoção de biofilmes pelos isolados. Após avaliação, os sanitizantes foram adotados na rotina de higienização do estabelecimento comercial, e após 2 meses, amostras superficiais dos mesmos utensílios e equipamentos foram coletadas e submetidas a análise de *L. monocytogenes*, e nenhum resultado positivo foi identificado. Os resultados obtidos permitiram caracterizar os sorugrupos dos isolados de *L. monocytogenes* obtidos bem como a o seu potencial virulento, foi também demonstrado o potencial de adesão de *L. monocytogenes* e a eficiência dos sanitizantes Mister Max-DG1[®] e B-QUART SEPT[®] para o controle da contaminação por esse patógeno.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, adesão, biofilmes, sanitizantes

Abstract

Contamination by *Listeria monocytogenes* in food processing environments is difficult to control due to its wide dissemination and adaptation, which requires constant monitoring and adoption of efficient procedures to eliminate this pathogen. This study evaluated the occurrence of *L. monocytogenes* in the processing environment of a butcher shop, and the obtained isolates were characterized as to their serogroups and virulence genes and further evaluated for in vitro adhesion capacity sensitivity to two sanitizers (Mister Max-DG1[®] and B-QUART SEPT[®]). Of the total of 40 samples hands of manipulators, tables, knives, inner of butcher display, grinders and meat tenderizers, 75 % were positive for *Listeria* spp. and 22, 5 % for *L. monocytogenes*. All isolates were characterized as belonging to serogroup 1/2c or 3c, and showed positive results for all virulence genes analyzed. In addition, all isolates showed some potential of adhesion, mostly presenting potential of adhesion ranging from weak to moderate, and only one isolate showed a strong potential. The evaluated sanitizers had potential to inhibit the multiplication of isolates in different concentrations (1:256 - 1:512 for Mister Max-DG1[®], and 1:4.096 - 1:16.384 for B-QUART SEPT[®]), and interfered in the formation and removal of the biofilms. After evaluation, the sanitizers were adopted by the butcher shop cleaning routine, and after two months surface samples from the same utensils and equipment were collected and subjected to *L. monocytogenes* analysis, and no positive result was identified. The results allowed to characterize the sorugrupos of *L. monocytogenes* isolates obtained as well as their virulent potential, it has also demonstrated the potential of adhesion of *L. monocytogenes* and the effectiveness of sanitizers Mister Max-DG1[®] and B-QUART SEPT[®] to control contamination by this pathogen.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, adhesion, biofilm, sanitizers

Introdução

Listeria monocytogenes é um patógeno emergente associado a doenças causadas por ingestão de alimentos contaminados, dentre eles, diversos produtos cárneos. A contaminação por esse patógeno é de difícil controle, devido a sua ampla disseminação e capacidade de adaptação, o que permite o seu desenvolvimento sob condições desfavoráveis, o que é motivo de preocupação na cadeia produtiva de alimentos (Uhtil et al., 2004; Tasara et al., 2006; Gravesen et al., 2000).

A habilidade de adesão e formação de biofilme por *L. monocytogenes* é motivo de preocupação no ambiente de processamento de produtos cárneos, sendo este patógeno extremamente resistente à dessecação, ação de raios UV, e agentes antimicrobianos (sanitizantes e desinfetantes). A presença de *L. monocytogenes* neste ambientes pode levar a persistência através da formação de biofilmes e contaminação cruzada de produtos finais. Para garantir a eliminação deste patógenos no ambiente de processamento e prevenir a contaminação dos produtos finais, é importante a adoção de procedimentos adequados de sanitização (Carpentier et al., 2011; Ferreira et al., 2014).

A facilidade do uso, o baixo custo, a alta atividade antimicrobiana e completa dissolução em água, fazem com que os agentes clorados sejam frequentemente utilizados como desinfetantes em estabelecimentos produtores de alimentos. Além do cloro, há outros sanitizantes químicos que também podem ser aplicados no controle microbiológico como compostos quaternários de amônio, compostos iodados, clorhexidina, ácido peracético, peróxido de hidrogênio e álcoois. Antes da aplicação dos sanitizantes, há necessidade de conhecer funções, concentrações de uso, modo de ação, como e onde serão empregados e a forma correta de prepará-los (Andrade et al., 2008).

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de adesão *in vitro* e virulência de isolados de *L. monocytogenes* obtidos de um ambiente de processamento de produtos cárneos, e a eficiência dos sanitizantes Mister Max 1 - DG1[®] e B-QUART SEPT[®] sobre esse patógeno, assim como para prevenção e eliminação de biofilmes.

Material e Métodos

Amostragem

Para o presente estudo foi selecionado um açougue da cidade de Viçosa, MG, Brasil, após concordância do proprietário. Esse estabelecimento é regularmente

fiscalizado pelo Serviço de Vigilância Sanitária do município, e manipula produtos carnes de diferentes espécies animais.

O estabelecimento foi visitado em 8 oportunidades, quando amostras superficiais foram obtidas durante os procedimentos convencionais de manipulação de produtos cárneos. As amostras foram coletadas do ambiente de manipulação (balcão refrigerado e mesas), dos equipamentos (amaciadores de carne e moedores) e dos utensílios (faca), sendo 8 amostras por ponto, totalizando 40 amostras.

As superfícies das fontes analisadas foram amostrados por esfregaço de superfície em duas áreas de 50 cm² (uma área limitada com um molde esterilizado de 5 x 10 cm), utilizando-se duas esponjas estéreis (3M Microbiology, St. Paul, MN, USA) previamente umedecidas em uma solução de 10 mL de NaCl (0,85 % m/v) peptonada tamponada (0,1 % m/v) (PBS, Oxoid Ltd., Basingstoke, England), e mantidas sob refrigeração até a análise. Cada conjunto de duas esponjas por amostra foi transferido para um saco estéril e adicionou-se 80 mL de PBS (volume total de 100 mL por amostra), homogeneizados por 60 segundos (Stomacher 400 circulador, Seward Ltd., Leste Close, Sussex, Reino Unido), e submetidos a análise microbiológica, sendo que 1 mL do homogeneizado correspondeu a 1 cm² de cada amostra (Cossi et al. 2013).

Apartir desses procedimentos foram realizados o isolamento, a identificação e a verificação do potencial de adesão de *L. monocytogenes* bem como estudos da sua sensibilidade à sanitizantes utilizados no açougue selecionado.

Isolamento e caracterização de *Listeria monocytogenes*

Análises microbiológicas convencionais

As amostras superficiais foram submetidas à pesquisa de *L. monocytogenes* conforme metodologia ISO 11290-1(ISO, 1996; 2004). Uma alíquota de 40 mL da suspensão obtida conforme a amostragem acima foi centrifugada e o sedimento ressuspenso em caldo half fraser[®] (Oxoid), incubado a 30°C por 24h. Logo após, realizou-se semeadura em placas de chromogenic listeria agar[®] (ALOA, Oxoid) e listeria selective agar base[®] (Oxford, Oxoid) incubadas a 37 °C por 48h. Uma alíquota de 0.1 mL foi transferida para tubo contendo 10 mL de caldo fraser[®] (Oxoid) e incubados a 35 °C por 24 h. Posteriormente foi realizada semeadura em placas ágar ALOA e ágar Oxford, incubadas 37 °C/48 h.

As colônias características obtidas foram submetidas às provas bioquímicas de acordo com o Pagotto et al. (2011), para produção de catalase, motilidade a 25 °C, fermentação de carboidratos (dextrose, xilose, ramnose e manitol), produção de β -hemólise em ágar sangue de equino, e em seguida identificadas.

Análises moleculares

Após caracterização bioquímica, os isolados identificados como *L. monocytogenes* foram submetidos à extração e purificação do DNA com o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega Corp., Madison, WI, USA). O DNA extraído de cada isolado foi submetido a um PCR multiplex proposto por Borucki e Call (2003) para a caracterização dos sorogrupos associados às principais divisões: divisão I (sorogrupos 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e) e divisão II (1/2a, 1/2c, 3a, e 3c). A mistura de amplificação compôs 12.5 μ L de GoTaq Green Master Mix (Promega), 2 μ L DNA, 40 μ M de cada primer D1(F: CGATATTTTATCTACTTTGTCA; R: TTGCTCCAAAGCAGGGCAT) e D2 (F: GCGGAGAAAGCTATCGCA; R: TTGTTCAAACATAGGGCTA) e água ultrapura de PCR (Promega) obtendo-se uma reação final de 25 μ L. Os primers GLT (F: AAAGTGAGTTCTTACGAGATTT; R: AATTAGGAAATCGACCTTCT) e flaA (F: TTAGTAGATCAAACCTGCTCC; R: AAGAAAAGCCCCTCGTCC) foram utilizados em duas reações adicionais para identificação dos sorogrupos relacionados com cada divisão. As condições de amplificação utilizadas foram as mesmas descritas por Borucki & Call (2003) para cada gene pesquisado. Alíquotas de 5 μ L dos produtos de PCR foram submetidas a eletroforese em géis de agarose a 2,0 % (m/v) e tampão de 0,5 M Tris/borato/EDTA (TBE), coradas com GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA), e visualizado em um transiluminador. Para cada região de DNA alvo, foram observados os seguintes tamanhos de produtos de PCR: 214 pb para D1, 140 pb para D2, 538 pb para FlaA, e 483 pb para GLT. Em todos os ensaios moleculares, as cepas *L. monocytogenes* Scott A, ATCC 7644, foram utilizados como controles positivos.

Os isolados positivos para D1 e negativos para o gene GLT foram classificados como sorogrupos 4b, 4d (divisão I) ou 4a, 4c (divisão III, raramente encontrada). Já os isolados que apresentaram resultado positivo para D1 e GLT, foram classificados como pertencentes aos sorogrupos 1/2b ou 3b. Os isolados positivos para D2 e negativos para o gene flaA foram caracterizados como pertencentes ao sorogrupo 1/2c ou 3c (divisão II), e resultados positivos para flaA caracteriza o sorogrupo 1/2a ou 3a (divisão II).

O DNA de todos os isolados foram submetidos a reações de Simplex e Multiplex PCR para pesquisa de genes relacionados à virulência envolvidos nos processos de invasão celular e disseminação célula-célula no hospedeiro. Para pesquisa dos genes relacionados ao grupos das internalinas foi utilizado o protocolo proposto por Liu et al. (2007), que considera os seguintes genes alvos: *inlA* (F: ACGAGTAACGGGACAAATGC; R: CCCGACAGTGGTGCTAGATT), *inlB* (F: TGGGAGAGTAACCCAACCAC; R: GTTGACCTTCGATGGTTGCT), *inlC* (F: AATTCCCACAGGACACAACC; R: CGGGAATGCAATTTTTCATA), *inlJ* (F: GTAACCCCGCTTACACAGTT; R: AGCGGCTTGGCAGTCTAATA). Além disso, os isolados foram submetidos a pesquisa de outros genes relacionados com o ciclo de virulência intracelular: *plcA* (F: CTGCTTGAGCGTTCATGTCTCATCCCC; R: ATGGGTTTCACTCTCCTTCTAC), *hlyA* (F: GCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA; R: GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG, *actA* (F: CGCCGCGGAAATTAAAAAAGA R: ACGAAGGAACCGGGCTGCTAG) e *iap* (F: ACAAGCTGCACCTGTTGCAG; R: TGACAGCGTGTGTAGTAGCA), conforme metodologia proposta por Rawool et al. (2007). As condições de amplificação foram as mesmas descritas por Liu et al. (2007) e Rawool et al. (2007), e as reações de 25 µL foram compostas por 12,5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega), 2,0 µL do DNA extraído, 10 µM de cada primer, e água ultrapura de PCR (Promega) para completar o volume final. Os produtos de PCR foram separados e visualizados como descrito na caracterização dos sorogrupos. *L. monocytogenes* ATCC 7644 foi testado em paralelo como um controle positivo para os genes de virulência testados.

Potencial de adesão por *Listeria monocytogenes*

De acordo com as recomendações de Djordjevic et al. (2002), e Larivière-Gauthier et al (2014) os isolados de *L. monocytogenes* obtidos foram submetidos a testes de capacidade de adesão. Basicamente, 20 µL de uma cultura overnight de *L. monocytogenes* foi transferida para um poço de uma placa de microtitulação contendo 130 µl de meio de cultura tryptic soya broth[®] (TSB, Oxoid), e incubada a 37 °C durante 24 h. Após a incubação, o meio de cultura foi descartado, e os poços lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,2) três vezes consecutivas para remover células não aderidas. As células foram fixadas por adição de metanol (Sigma-

Aldrich), e seco ao ar durante 10 min. Em seguida, a solução de cristal violeta (1 % m/v) foi adicionada, e após 15 min as placas foram lavadas com água. Após a secagem, etanol a 95 % foi adicionado a cada poço, e a absorvância medida após incubação durante 30 min à temperatura ambiente ($\lambda = 550$ nm, BioTek Instruments, Inc. EUA). Todos os testes foram conduzidos em 4 replicatas, todos incluindo os devidos controles negativos e brancos nas placas.

Os resultados do teste de adesão foram avaliados de acordo com a classificação proposta por Stepanović et al. (2007). Considerando os valores de densidades ópticas (D.O.) obtidas dos quatro poços de cada isolado, as DO's médias foram calculadas e comparadas com os valores de densidade óptica média dos controles negativos (DO em branco), e ajustadas de acordo com a seguinte equação:

DO branco ajus.= valor da média da DO branco+ 3x (desvio padrão da DO branco)

Baseado nos resultados, cada isolado foi caracterizado de acordo com a seguinte classificação:

Ausência de adesão	DO teste $\leq$ DO branco ajus.
Fraca adesão	DO branco ajus.< DO teste $\leq$ 2DO branco ajus.
Adesão moderada	2DO branco ajus.< DO teste $\leq$ 4DO branco ajus.
Forte adesão	DO teste > 4DO branco ajus.

Efeito de sanitizantes sobre a adesão de *Listeria monocytogenes*

Sanitizantes

Considerando recomendações do setor de controle de qualidade do estabelecimento comercial selecionado para o estudo, dois sanitizantes foram avaliados quanto a eficiência na eliminação de *L. monocytogenes*, assim como na formação e eliminação de biofilmes por esse patógeno. O primeiro sanitizante é um detergente alcalino clorado em gel, Mister Max 1- DG1[®] (Ingleza) (sanitizante A) cuja fórmula não é disponibilizada pelo fabricante; o segundo é um desinfetante para superfícies, B-QUART SEPT[®] (Newdrop) (sanitizante B), cuja fórmula é: tensoativo não-iônico, EDTA, cloreto de alquil dimetil Benzil amônio, cloreto de didecil dimetil amônio, corante azul CI 61.585, coadjuvante, sequestrante e água.

Concentração mínima inibitória dos sanitizantes sobre *Listeria monocytogenes*

Todos os isolados de *L. monocytogenes* obtidos no ambiente de processamento do açougue foram submetidos a um teste fenotípico para determinação das concentrações mínimas inibitórias (MIC) dos sanitizantes A e B. Uma cultura overnight de cada isolado foi recuperada em caldo brain heart infusion[®] (BHI, Oxoid), onde uma alíquota de 100 µl de cada cultura foi diluída em 9,9 mL de solução salina 0,85 % (m/v); posteriormente, uma alíquota de 1 mL foi transferida para placas contendo 9,9 mL de ágar BHI. Procedeu-se então uma diluição seriada (1:1) em água estéril para cada sanitizante utilizado, até a 16^a diluição. Através do método de spot, uma alíquota de 10 µl de cada diluição foi gotejada nas placas de BHI previamente semeada com cada uma das culturas obtidas dos isolados (NCCLS, 2003); a diluição (de maior concentração) onde se verificou a ausência de desenvolvimento bacteriano (ausência de halo) foi considerada a MIC para o isolado em questão (NCCLS, 2003; Pacheco, 2003).

Efeito dos sanitizantes na formação e eliminação de biofilmes por *Listeria monocytogenes*

Uma alíquota de 20 µL de cada uma das culturas overnight dos isolados obtidos de *L. monocytogenes* foi transferida para poços de uma placa de microtitulação contendo 115 µL de meio de cultura tryptic soya broth[®] (TSB, Oxoid) adicionado de 15 µL de duas diluições do sanitizante A (1:64 e 1:256), e incubadas a 37 °C durante 24h. O mesmo procedimento foi realizado com o sanitizante B (1:1.024 e 1:4.096). As lavagens e aferição de absorvância foram realizadas conforme descrito anteriormente. A utilização das diluições acima apresentadas para cada sanitizante (A (1:64 e 1:256) ; B (1:1.024 e 1:4.096)), foi determinada com base nos resultados obtidos nos testes de determinação das concentrações mínimas inibitórias

Uma alíquota de 20 µL de cada uma das culturas overnight dos isolados de *L. monocytogenes* foi transferida para poços de uma placa de microtitulação contendo 130 µL de meio de cultura tryptic soya broth[®] (TSB, Oxoid), e incubada a 37 °C durante 24h. Após a incubação, o meio de cultura foi descartado e 150 µL de cada diluição dos sanitizantes A (1:64 e 1:256) e B (1:1.024 e 1:4.096) foram adicionados individualmente aos poços e novamente incubados à 37 °C por duas horas. após este período realizou-se as lavagens e aferição de absorvância como já descrito anteriormente.

Todos os testes foram conduzidos em 4 replicatas, e sempre incluindo os devidos controles negativos e brancos nas placas. As medidas de absorvância obtidas para cada isolado foram comparadas com os controles negativos para verificação de diferenças significativas por análise de variância ($p < 0,05$), utilizando-se o programa XLSat 2010.2.03 (AddinSoft, New York, NY, EUA).

Avaliação in loco do efeito dos sanitizantes sobre *Listeria monocytogenes*

Após uma etapa inicial de coleta de amostras superficiais (40 amostras coletadas), por uma determinação do setor de qualidade do estabelecimento, foi adotado a utilização dos dois sanitizantes previamente citados, na rotina de higienização de equipamentos e utensílios. Após um período de dois meses, 6 visitas adicionais foram realizadas nesse estabelecimento para coleta de amostras superficiais do ambiente de manipulação (balcão refrigerado e mesas), equipamentos (amaciadores de carne e moedores) e utensílios (faca), sendo 6 amostras por ponto, totalizando 30 amostras. A amostragem foi realizada conforme apresentado anteriormente.

Todas as amostras foram submetidas a pesquisa de *L. monocytogenes*, conforme previamente descrito. As frequências de amostras positivas para o patógeno nas duas etapas do estudo foram comparadas por Chi-quadrado ($p < 0,05$), utilizando-se o programa XLSat 2010.2.03 (AddinSoft).

Resultados e Discussão

Isolamento e caracterização de *Listeria monocytogenes*

A Tabela 1 apresenta a frequência de amostras positivas para *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* obtidas açougue selecionado para esse estudo. De um total de 40 amostras coletadas 30 amostras (75 %) apresentou resultado positivo para *Listeria* spp., sendo que em todas as fontes amostradas o gênero *Listeria* foi identificado. *L. monocytogenes* foi detectada em 9 amostras (22,5 %) (não sendo identificada apenas em facas); todos os 20 isolados obtidos pertencentes a esta espécie, foram caracterizados como sorogrupo 1/2c ou 3c (divisão I).

Em um estudo Barroset al. (2006) também evidenciaram em um ambiente de processamento de carne localizado no estado do Paraná, a ocorrência de *L. monocytogenes* em equipamentos, instalações e produtos finais prontos para

comercialização, sendo identificados os sorotipos 1/2a e 4b. Camargo et al. (2015) também investigaram a ocorrência de *L. monocytogenes* em um ambiente de processamento de carnes localizado no estado de Minas Gerais, Brasil. A presença do patógeno também foi confirmada em mesas e adicionalmente em mãos de manipuladores antes e durante o processamento, bem como cortes finais prontos para comercialização. Neste estudo, foi demonstrado a ocorrência de sorotipos reconhecidos como patogênicos (4b, 1/2b, e 1/2c) em diferentes fontes amostradas.

Em um trabalho conduzido por Martin et al. (2014), os autores avaliaram a presença de *L. monocytogenes* em plantas de processamento de carnes localizados na Espanha, onde um total de 106 amostras foram coletadas de superfícies que entram em contato com alimentos e produtos cárneos, e os sorotipos 4b, 1/2b, 1/2c e 1/2c foram identificados.

As frequências de positividade 75 % para *Listeria* spp. e 22,5 % para *L. monocytogenes*, indicam expressiva distribuição deste gênero no ambiente de processamento do estabelecimento avaliado; a positividade para *L. monocytogenes* potencialmente virulentas determina riscos aos consumidores, uma vez que este micro-organismo é frequentemente associado à surtos associados ao consumo de alimentos contaminados, especialmente produtos cárneos (Vázquez-Boland et al., 2001).

A contaminação pós-processamento por *L. monocytogenes* é importante na contaminação do produto final, e na persistência desse patógeno no ambiente (Keto-Timonen et al., 2008). *L. monocytogenes* tem sido isolada do solo, material fecal, água bem como alimentos de origem animal; devido sua natureza ubíqua é frequentemente isolada em ambientes de manipulação e processamento de alimentos (Donnelly et al., 2001; Moltz & Martin 2005). Em um estudo que avaliou os padrões de contaminação por *L. monocytogenes* em 121 estabelecimentos que produziam embutidos cárneos variados nos Estados Unidos, Simmons et al. (2014) obtiveram positividade para este patógeno em pelo menos 60 % dos estabelecimentos analisados; *L. monocytogenes* estava presente em 14,2 % das superfícies que não entravam em contato com alimentos, e em 4,5 % das superfícies que entravam em contato com alimentos. Larivière-Gauthier et al. (2014) avaliaram a prevalência de *L. monocytogenes* em uma planta de abate e processamento de carne suína, e observaram frequência de positividade de 43,9 % em equipamentos, e de 66,7 % em superfícies do ambiente de sala de desossa. Um total de 874 amostras foi obtido em toda a planta, sendo que 108 foram positivas para *L. monocytogenes*, que por sua vez foram agrupadas em 4 sorogrupos distintos, sendo que o mais prevalente foi o sorogrupo 1/2b ou 3b (divisão I).

Todos os isolados de *L. monocytogenes* obtidos apresentaram resultados positivos para os genes relacionados à virulência pesquisados. A expressão destes genes capacita este micro-organismo a invadir o organismo do hospedeiro e determinar infecção (Cabanés et al., 2002), aliado ao fato de que os produtos cárneos muitas vezes consumidos sem cozimento prévio ou sem práticas adequadas de cocção mantêm contato direto e frequente com as fontes consideradas positivas para *L. monocytogenes*. A detecção dos genes de virulência em *L. monocytogenes* é fundamental na identificação do risco de uma possível patogênese aos consumidores (Liu et al., 2006). Semelhante ao presente estudo, diversos autores identificaram a ocorrência dos genes de virulência *hlyA*, *iap*, *plcA*, *actA* (Rawool et al., 2007; Camargo et al. 2014) e *inlA*, *inlB*, *inlC* e *inlJ* (Santana et al., 2012; Camargo et al., 2015) em isolados do sorogrupo 1/2c ou 3c obtidos de diferentes origens. Uma variedade de proteínas relacionadas a patogenicidade desse patógeno são descritas, como as internalinas (expressadas pelos genes do grupo das internalinas *inlA*, *inlB*, *inlC* e *inlJ*), listeriolisinas e fosfolipases (expressadas por genes como *hlyA* e *plcA*) (de las Heras et al., 2011), e p60 (gene *iap*) e *actA* (*actA*) que atuam na invasão e sobrevivência em células intestinais (Vázquez-Boland et al., 2001).

Potencial de adesão por *Listeria monocytogenes*

O potencial de adesão dos isolados obtidos das diferentes amostras está apresentado na Tabela 2. Um isolado obtido de mesa apresentou forte potencial de adesão, enquanto 3 isolados de amaciador e 3 de mesa apresentaram um potencial de adesão moderado, e os demais isolados apresentaram fraco potencial de adesão (n=13). Galvão et al. (2012), avaliando isolados de *L. monocytogenes* dos sorotipos 1/2a e 4b obtidos de ambiente de processamento de produtos cárneos e carcaças bovinas, observaram cepas com diferentes potenciais de adesão (forte, moderado e fraco).

Uma variedade de estudos mostra que *L. monocytogenes* é capaz de aderir e formar biofilme em superfícies que frequentemente entram em contato com alimentos, como poliestireno, vidro e aço inoxidável (Blackman et al., 1996; Chae et al., 2006; Bonaventura et al., 2008; Bonsaglia et al., 2014). A formação de biofilmes determina risco no ambiente de processamento de produtos cárneos, pois pode representar uma importante fonte de contaminação de materiais ou alimentos. Adicionalmente, a formação de biofilmes possibilita a persistência de *L. monocytogenes*

no ambiente, bem como a capacidade de resistir à dessecação, a tratamentos com raios UV e agentes sanitizantes (Borucki & Call., 2003 ; Folsom et al., 2006).

A fixação bacteriana às superfícies é influenciada por propriedades físico-químicas, características de superfície (hidrofobicidade) e do próprio micro-organismo (hidrofobia, capacidade de formação de flagelo e de motilidade), bem como por fatores ambientais como condições de pH e temperatura (Moltz et al., 2005). A temperatura regula uma variedade de genes relacionados à patogenicidade bem como a adaptações às condições ambientais em *L. monocytogenes*, o que pode resultar em alterações de superfície na célula bacteriana afetando desta maneira a adesão (Folsom et al., 2006). *L. monocytogenes* é reconhecida pela capacidade de formar biofilmes em diferentes materiais e temperaturas; em alguns estudos foi observado que nas temperaturas entre 35 e 37 °C houve uma melhor formação de biofilme (Bonaventura et al., 2008; Galvão et al., 2012). Além disso, Bonsaglia et al. 2014 consideram o tempo de incubação como um importante fator na formação de biofilme in vitro.

Larivière-Gauthier et al. (2014), em um estudo que analisou cepas de *L. monocytogenes* em uma planta de abate e processamento de carne suína, testaram o potencial de adesão em condições similares de temperatura e meio de cultura utilizados no presente estudo, e observaram que cepas pertencentes aos sorogrupos 1/2a ou 3a e 1/2c ou 3c, apresentaram uma maior capacidade de produção de biofilme.

Efeito de sanitizantes sobre a adesão de *Listeria monocytogenes*

Considerando os resultados obtidos nas diferentes etapas do estudo, os sanitizantes A e B foram selecionados para determinação das MIC em relação aos isolados obtidos. A Tabela 3 apresenta os valores de MIC dos dois sanitizantes em relação aos isolados avaliados. O sanitizante A apresentou potencial de inibição até a diluição 1:256, enquanto o sanitizante B apresentou potencial de inibição até a diluição 1:4.096, sendo que para dois isolados a concentração atingiu 1:16.384. Esses resultados indicam a maior eficiência do sanitizante B quando comparado ao sanitizante A, em relação aos isolados de *L. monocytogenes* avaliados.

A etapa de sanitização consiste da aplicação de agente químico ou físico, tendo como objetivo eliminar micro-organismos patogênicos e reduzir o número de micro-organismos deteriorantes para níveis considerados seguros (Campdepadrós et al., 2012). De acordo com o presente estudo, entre os sanitizantes frequentemente utilizados em estabelecimentos que processam alimentos, a maioria é à base de cloro e compostos

clorados (Andrade et al., 2008). A facilidade do uso, o baixo custo, a alta atividade antimicrobiana e completa dissolução em água, fazem com que os agentes clorados sejam frequentemente utilizados como desinfetantes em estabelecimentos produtores de alimentos (Andrade et al., 2008). Além do cloro, há outros sanitizantes químicos que também podem ser aplicados no controle microbiológico como compostos quaternários de amônio, compostos iodados, clorhexidina, ácido peracético, peróxido de hidrogênio e álcoois. Entretanto, antes da aplicação dos sanitizantes é necessário o conhecimento adequado de suas funções, concentrações de uso, modo de ação, como e onde serão empregados e a forma correta de prepará-los (Andrade et al., 2008).

Os testes de interferência dos sanitizantes na produção e remoção de biofilmes pelos isolados de *L. monocytogenes* foram conduzidos com os valores de MIC obtidos (A: 1:256, B: 1:4.096), e também com diluições menores (A: 1:64, B: 1:1.024). Essas concentrações foram consideradas com o objetivo de se avaliar diferentes situações de aplicação dos sanitizantes no ambiente de processamento de produtos cárneos. As Tabelas 4 e 5 apresentam as médias obtidas por densidade ótica dos isolados de *L. monocytogenes* submetidos aos testes de inibição da formação de biofilmes pelos sanitizantes A e B, nas diferentes concentrações avaliadas. Esses resultados indicam que em concentrações maiores (Tabela 4), o sanitizante A foi eficiente na inibição de formação de biofilmes por 5 isolados de mesa, 4 de amaciador, 3 de balcão refrigerado, 1 de moedores ($p < 0,05$). Em relação ao sanitizante B, 11 isolados apresentaram absorvâncias significativamente superiores às observadas no controle, indicando ineficiência na inibição de formação de biofilme por esses isolados ($p < 0,05$, Tabela 4).

Considerando os valores de MIC, o sanitizante A foi eficaz na inibição de formação de biofilmes em 5 isolados (Tabela 5). Nessa concentração, o sanitizante A não determinou diferenças significativas na formação de biofilmes em 9 isolados ($p > 0,05$), indicando baixa eficiência na concentração de MIC determinada para os isolados de *L. monocytogenes*. O sanitizante B em sua MIC determinou a inibição de formação de biofilmes em 9 isolados ($p < 0,05$), determinando uma melhor performance que o sanitizante A em sua MIC (Tabela 5). A utilização de diferentes concentrações de cada sanitizante influenciou de maneira variada o comportamento de cada isolado na formação de biofilme, sendo que para alguns isolados as absorvâncias foram significativamente inferiores ao controle, enquanto para outros as absorvâncias foram significativamente superiores às observadas nos controles ($p < 0,05$), demandando estudos complementares para uma precisa determinação dos mecanismos envolvidos nesse processo.

As Tabelas 6 e 7 apresentam as médias obtidas por densidade ótica dos isolados de *L. monocytogenes* submetidos aos testes de remoção de biofilmes formados pelos sanitizantes A e B, nas diferentes concentrações avaliadas. De acordo com a Tabela 6, o sanitizante A na concentração 1:64 determinou remoção significativa dos biofilmes formados por 11 isolados ($p < 0,05$), sendo 4 isolados de amaciador, 4 de mesa, 2 de balcão refrigerado e um 1 de moedor. O sanitizante B na concentração 1:1.024 permitiu a remoção significativa de biofilmes formados por 4 isolados ($p < 0,05$, Tabela 6). Considerando os valores de MIC do sanitizante A (Tabela 7), os biofilmes formados por 8 isolados foram removidos após o tratamento ($p < 0,05$). De forma semelhante, o sanitizante B em sua MIC determinou a remoção significativa dos biofilmes formados por 7 isolados ($p < 0,05$, Tabela 7). Entre os isolados que apresentaram forte (isolado 1) e moderado (isolados 2, 3, 4, 5, 6, 7) potenciais de adesão, o sanitizante A em sua MIC foi capaz de remover todos os biofilmes formados, enquanto o sanitizante B foi capaz de remover os biofilmes formados por 6 desses isolados ($p < 0,05$, Tabela 7).

Apesar da eficiência dos sanitizantes nas diferentes condições testadas, alguns isolados não apresentaram diferença significativa na remoção dos biofilmes formados após os tratamentos com essas substâncias (Tabela 7). Essa particularidade ocorreu especialmente em isolados com fraca capacidade de adesão. Alguns estudos têm mostrado que biofilmes podem ser resistentes a higienização e descontaminação química; a matriz de exopolissacarídeos formada e o emaranhado composto por flagelos e fímbrias cria uma estrutura de difícil penetração, de forma que os sanitizantes são incapazes de agir nas camadas mais internas (Bridier et al., 2011, Ferreira et al. 2014). Biofilmes mistos também têm sido relatados como sendo mais resistente a ação de sanitizantes, quando comparados a formações compostas apenas por uma espécie bacteriana, sendo que uma formação mista composta por *Lactobacillus planturum* e *L. monocytogenes* foi resistente a sanitizantes à base de cloreto de benzalcônio e o ácido peracético (Abee et al., 2011).

L. monocytogenes é reconhecida pela sua capacidade de resistir uma série de estresses ambientais e persistir em ambientes de manipulação de alimentos, sendo que alguns estudos já isolaram cepas persistentes nestes ambientes mesmo após os procedimentos de sanitização (Lundén et al. 2003; Medrela et al. 2003; Soumet et al., 2005). Além disso, alguns autores relataram correlações entre aumento das MICs de desinfetantes utilizados comercialmente e a persistência ambiental de *L. monocytogenes* quando comparados a isolados esporádicos (Holah et al., 2002; Kastbjerg et al., 2009).

A resistência a produtos sanitizantes também é reforçada por genes associados ao estresse, que são expressados durante a formação dos biofilmes (Abee et al., 2011; Wood et al., 2011). Estudos mostraram que as formações de biofilmes são capazes de se espalhar pelo ambiente, sendo esta dispersão desencadeada por mudanças ambientais ou nutricionais em sua comunidade (Wood et al., 2011); essas formações são capazes de desenvolver características adaptativas em resposta à exposição repetida aos biocidas (Bridier et al., 2011). Estes e outros fatores tornam o controle e erradicação de biofilmes um desafio no ambiente de processamento e manipulação de produtos cárneos.

A Tabela 8 apresenta as frequências de amostras positivas para *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* nas duas etapas de visitas realizadas no açougue selecionado para o estudo. Na segunda etapa, apenas 12 amostras apresentaram resultado positivo para *Listeria* spp., porém nenhuma amostra foi positiva para *L. monocytogenes* (Tabela 8). Apenas para mesa e moedor houve uma redução significativa das frequências de amostras positivas para *Listeria* spp. ($p < 0,05$, Tabela 8). Porém, as taxas de redução observadas para *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em outras amostras, foram evidentes, apesar de não serem significativas ($p > 0,05$, Tabela 8). Esses resultados indicam o potencial dos sanitizantes A e B em controlar a contaminação ambiental por *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*.

Campdepadrós et al. (2014) avaliaram a persistência de *L. monocytogenes* utilizando dois protocolos de higienização em diferentes pontos em uma fábrica de processamento de alimentos, e obtiveram resultados que indicaram que os procedimentos de limpeza foram eficazes na redução do patógeno, mas foram incapazes em eliminá-los completamente. O ambiente de processamento de produtos cárneos apresenta uma microbiota altamente complexa formada por vários gêneros bacterianos, que estão amplamente distribuídos em superfícies variadas, equipamentos e utensílios; a concentração de sanitizante que chega a alguns locais específicos pode ser ineficiente e determinar a formação de biofilmes e a persistência de micro-organismos nesse ambiente. Contudo, outros autores também propuseram que há alguns locais em que micro-organismos, inclusive *L. monocytogenes*, podem sobreviver e persistir ao longo do tempo apesar da utilização de tratamentos de sanitização nestes locais específicos (Thévenot et al., 2011; Christison et al., 2008). A eficiência da limpeza, bem como do uso de sanitizantes contra *L. monocytogenes*, é fortemente influenciada pelo tipo do matriz alimentar presente no ambiente, e na maioria dos casos, a qualidade da sanitização no ambiente de processamento de produtos cárneos pode ser reduzida pela presença de restos ou resíduos cárneos (Chaitiemwong et al., 2012; Hazeleger et al.,

2010). Considerando que *L. monocytogenes* é capaz de sobreviver em ambientes frios e úmidos, bem como no piso e objetos utilizados no ambiente de processamento de produtos cárneos, estes últimos devem ser considerados reservatórios para este patógeno, tornando-se fundamental a adoção de boas práticas de higiene e sistemas de monitoramento da contaminação microbiológica (Christison et al., 2008).

Alguns autores destacam a importância da rápida secagem das superfícies molhadas após a limpeza e desinfecção quando os processos de manipulação terminam, por reduzir a proliferação de bactérias. A resistência de *L. monocytogenes* também tem sido associada à limpeza ineficiente e a existência de restos de matéria orgânica remanescentes nas superfícies, que por sua vez são usualmente removidos utilizando-se métodos físicos (fenômenos de adsorção e absorção) e químicos (fenômeno redox) distintos entre si, o que pode resultar na redução de suas atividades biocidas (Campdepadrós et al., 2012).

Conclusão

O presente estudo identificou a presença de sorogrupos de *L. monocytogenes* reconhecidos como patogênicos, bem como a presença dos genes de virulência, indicativos da potencial exposição dos consumidores a cepas patogênicas.

Todos os isolados de *L. monocytogenes* obtidos apresentaram algum potencial de adesão quando testados *in vitro*, evidenciando sua capacidade de colonizar diferentes pontos do ambiente de manipulação. O potencial de adesão dos isolados obtidos foi demonstrado, e os sanitizantes Mister Max 1- DG1® e B-QUART SEPT® apresentaram eficiência na prevenção e eliminação de biofilmes formados pelos isolados obtidos. Esses mesmos sanitizantes foram incorporados na rotina de higienização dos equipamentos e utensílios do estabelecimento selecionado, resultando em redução das frequências de amostras positivas para *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*.

Referências Bibliográficas

- Abee, T., Á.T. Kovács, O.P. Kuipers, S. Van Der Veen. 2011. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 22:172-179.
- Andrade, N. J. 2008. Higiene na indústria de alimentos. São Paulo: Varela. 400.
- Azevedo I., M. Regalo, C. Mena, G. Almeida, L. Carneiro, P. Teixeira, T. Hogg, P. Gibbs. 2005. Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal. *Journal of Food Control*. 16:121-124.

Barros, M.A., L.A. Nero, L.C. Silva, L. d'Ovidio, F.A. Monteiro, R. Tamanini, R. Fagnani, E. Hofer, V. Beloti. 2007. *Listeria monocytogenes*: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. *Meat Science*. 76:591-596.

Blackman, I.C., J.F. Frank. 1996. Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. *Journal of Food Protection*. 59:827-831.

Bonaventura G., R. Piccolomini, D. Paludi, V. D'Orio, A. Vergara, M. Conter. 2008. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*. 104:1552-1561.

Bonsaglia, E., N. Silva, A.F. Júnior, J.A. Júnior, M. Tsunemi, V. Rall. 2014. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Journal of Food Control*. 35:386-391.

Borucki, M.K., D.R. Call. 2003. *Listeria monocytogenes* Serotype Identification by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 41:5537-5540.

Bridier, A., R. Briandet, V. Thomas, F. Dubois-Brissonnet. 2011. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*. 27:1017-1032.

Cabanes, D., P. Dehoux, O. Dussurget, L. Frangeul, P. Cossart. 2002. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends in Microbiology*. 10:238-245.

Camargo, A.C, A. Lafisca, M. V. C. Cossi, F. G. P. A. Lanna, M.R. Dias, P. S.A. Pinto, L. A. Nero. 2014. Low occurrence of *Listeria monocytogenes* on bovine hides and carcasses in Minas Gerais state, Brazil: Molecular characterization and antimicrobial resistance. *Journal of Food Protection*. 77:1148-1152.

Camargo, A.C.C, N.P.A. Castilho, D.A.L., D.C. Vallim, E. Hofer, L.A. Nero. Antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from meat-processing environments, beef products, and clinical cases in Brazil. in press

Campdepadrós M., A.M. Stchigel, M. Romeu, J. Quilez, R. Solà. 2012. Effectiveness of two sanitation procedures for decreasing the microbial contamination levels (including *Listeria monocytogenes*) on food contact and non-food contact surfaces in a dessert-processing factory. *Food Control*. 23: 26-31.

Carpentier, B; O. Cerf. 2011. Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food, industry equipment and Premises. *International Journal of Food Microbiology*. 145:1-8.

Chae, M.S.H, L. Schraft, L. Truelstrup, R. Mackereth. 2006. Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. *Food Microbiology*. 23:888-889.

Chaitiemwong, N., W.C. Hazeleger, R.R. Beumer .2010. Survival of *Listeria monocytogenes* on a conveyor belt material with or without antimicrobial additives. *International Journal of Food Microbiology*. 142:260-263.

Chasseignaux, E., M.T. Toquin, C. Ragimbeau, G. Salvat, P. Colin, G. Ermel. 2001. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from the

environment, raw meat and raw products in two poultry- and pork processing plants. *Journal of Applied Microbiology*. 91:888-899.

Chavant, P., B. Martinie, T. Meylheuc, M. Bellon-Fontaine, M. Hebraud. 2002. *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Applied Environment Microbiology*. 68:728-737.

Christison C. A., D. Lindsay, A. von Holy. 2008. Microbiological survey of ready to-eat foods and associated preparation surfaces in retail delicatessens, Johannesburg, South Africa. *Food Control*. 19: 727-733.

Cossi, M. V. C.; Burin, R. C. K.; Silva, D. A. L.; Dias, M. R.; Castilho, N. P. A.; Soares, P. F.; Pinto, P. S. A.; Nero, L. A. 2013. Pathogenic potential and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. isolates obtained from butcher shop environments. *Journal of Food Protection*. 76:1633-1637.

de las Heras A., R. J. Cain, M. K. Bielecka, J. A. Vázquez- Bolland. 2011. Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Current Opinion in Microbiology*. 14: 118-127.

Djordjevic D., M. Wiedmann, and L. A. McLandsborough. 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied Environment Microbiology*. 68:2950-2958.

Domka J., J. Lee, T. Bansal, T.K. Wood. 2007. Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Applied Environment Microbiology*. 9:332-346.

Donnelly C.W. 2001. *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. *Nutrition Reviews*. 59:183-194.

Dyer J.G., N. Sriranganathan, S.C. Nickerson, F. Elvinger, 2007. F. Curli production and genetic relationships among *Escherichia coli* from cases of bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*. 90:193-201.

Ferreira, V., P. Wiedman, P. Texeira, M.J. Stasiewicz. 2014. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of Food Protection*. 77: 150-170.

Filioussis G., A. Johansson, J. Frey, V. Perreten. 2009. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from open-air food markets in Greece. *Food Control*. 20:314-317.

Flemming H.C., T.R. Neu, D.J. Wozniak. 2007. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *Journal of Bacteriology*. 189:7945-7947.

Folsom, J.P., J.F. Frank. 2006. Chlorine resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms and relationship to subtype, cell density, and planktonic cell chlorine resistance. *Journal of Food Protection*. 69:1292-1296.

Fuquay, J.W. 2011. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Second ed. Elsevier, Boston, MA.

- Galvão N. N., E. Chiarini, M.T. Destro, M.A. Ferreira, L. A Nero. 2012. PFGE characterisation and adhesion ability of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from bovine carcasses and beef processing facilities. *Meat Science*. 92:635-673.
- Gandhi, M., M. Chikindas. 2007 *Listeria*: a foodborne pathogen that know to survive. *International Journal of Food Microbiology*. 113:1-15.
- Gravesen, A., T. Jacobsen, P.L. Moller, F. Hansen, A.G. Larsen, S. Knochel. 2000. Genotyping of *Listeria monocytogenes*: comparison of RAPD, ITS, and PFGE. *International Journal of Food Microbiology*. 57:43-51.
- Holah, J. T., J. H. Taylor, D. J. Dawson, K. E. Hall. 2002. Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Systematic and Applied Microbiology*. 31:111-120.
- Ilsi Research Foundation/Risk Science Institute. 2005. Expert panel on *Listeria monocytogenes* in foods. Achieving continuous improvement in reductions in foodborne listeriosis - A risk-based approach. *Journal of Food Protection*. 68:1932-1994.
- International Organization for Standardization. 1996. ISO 11290-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. International Organization for Standardization, Geneva.
- International Organization for Standardization. 2004. ISO 11290-1/ Amd 1. Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data. International Organization for Standardization, Geneva.
- Kastbjerg, V. G., L. Gram. 2009. Model systems allowing quantification of sensitivity to disinfectants and comparison of disinfectant susceptibility of persistent and presumed nonpersistent *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*. 106:1667-1681.
- Keto-Timonen, R.O., T. Autio, H.J. Korkeala. 2003. An improved amplified fragment length polymorphism (AFLP) protocol for discrimination of *Listeria* isolates. *Systematic Applied Microbiology*. 26: 236-244.
- Larivière Re-Gauthier G., A. Letellier, A. Sadjia. 2014. Analysis of *Listeria monocytogenes* strain distribution in a pork slaughter and cutting plant in the province of Quebec. *Journal of Food Protection*. 77:2121-2128.
- Liu D. Y., M. L. Lawrence, F. W. Austin, A. J. Ainsworth. 2007. A multiplex PCR for species and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiology Methods*. 73: 133-140.
- Lundén, J. M., T. J. Autio, A. M. Sjöberg, H. J. Korkeala. 2003. Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. *Journal. Food Protection*. 66:2062-2069.
- Martín, B., A. Perich, D. Gómez, J. Yanguela, Rodríguez A., M. Garriga, T. Aymerich. 2014. Diversity and distribution of *L. monocytogenes* in meat processing plants. 44:1119-127.
- Medrala, D., W. Dałbrowski, U. Czekajło-Kołodziej, E. Daczowska-Kozon, A. Koronkiewicz, E. Augustynowicz, M. Manzano. 2003. Persistence of *Listeria*

- monocytogenes strains isolated from products in a Polish fish-processing plant over a 1-year period. *Journal of Food Microbiology*. 20:715-724.
- Moltz A.G., S.E. Martin. 2005. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. *Journal of Food Protection*. 68:92-97.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards-NCCLS. 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. 6th ed. Wayne. 23:81.
- Pacheco, A.B.N.D. 2003. Atividade antimicrobiana de desinfetantes comerciais para uso em odontologia. Tese Doutorado–Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba.
- Pruss B.M., C. Besemann, A. Denton, A. J. Wolfe. 2006. A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 188:3731-3739.
- Rawool D. B., S. V. S. Malik, S. B. Barbuddhe, I. Shakuntala, R. A. Aurora. 2007. A multiplex PCR for detection of virulence associated genes in *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Safety*. 9:56-62.
- Sant'Ana, A.S., M.S. Barbosa, M.T. Destro, M. Landgraf, B.D.G.M. Franco. 2012. Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*. 157:52-58.
- Simmons C., M.J. Stasiewicz, J. Wright. 2014. *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. contamination patterns in retail delicatessen establishments in three U.S. states. *Journal of Food Protection*. 77:1929-1939.
- Soumet, C., C. Ragimbeau, P. Maris. 2005. Screening of benzalkonium chloride resistance in *Listeria monocytogenes* strains isolated during cold smoked fish production. *Letters in Applied Microbiology*. 41:291-296.
- Stepanović S., D. Vuković, V. Hola, G. Di Bonaventura, S. Djukić, I. Ćirković. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. *APMIS*. 115:891-899.
- Takahashi H., S. Handa-miya, B. Kimura, M. Sato, A. Yokoi, S. Goto, I. Watanabe. T. Koda, K., T. Fujii. 2007. Development of multilocus single strand conformation polymorphism (MLSSCP) analysis of virulence genes of *Listeria monocytogenes* and comparison with existing DNA typing methods. *International Journal of Food Microbiology*. 118:274-284.
- Tasara T., R. Stephan. 2006. Cold stress tolerance of *Listeria monocytogenes*: a review of molecular adaptive mechanisms and food safety implications. *Journal of Food Protection*. 69:1473-1484.
- Thévenot D., M. L. Delignette-Muller, S. Christeans, C. Vernozzy-Rozand. 2005. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. *International Journal of Food Microbiology*. 102:85-94.

Vazquez-Boland J. A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Dominguez-Bernal, W. Goebel, B. Gonzalez-Zorn, J. Wehland, J. Kreft. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology*. 14:584-640.

Wood T.K., S.H. Hong, Q. Ma. 2011. Engineering biofilm formation and dispersal. *Trends in Biotechnology*. 29:87-94.

Xu D., L. Yanli, M. S. H. Zahid, S. Yamasaki, L. Shi, J. Li, H. Yana. 2014. Benzalkonium chloride and heavy-metal tolerance in *Listeria monocytogenes* from retail foods. *International Journal of Food Microbiology*. 190:24-30.

Tabela 1: Ocorrência de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* (número de isolados) em ambiente de processamento de um açougue localizado em Minas Gerais, Brasil.

Amostra	n	<i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>
Amaciador	8	6	3 (5)
Balcão ref.	8	4	1 (5)
Faca	8	4	0 (0)
Mesa	8	8	3 (7)
Moedor	8	8	2 (3)

Tabela 2:Potencial de adesão por isolados obtidos em diferentes amostras.

Origem	n (isolados)	Potencial de adesão			
		Forte	Moderado	Fraco	Ausente
Amaciador	5	0	3	2	0
Balcão ref.	5	0	0	5	0
Facas	0	0	0	0	0
Mesa	7	1	3	3	0
Moedor	3	0	0	3	0
Total	22	1	6	15	0

Tabela 3: Mínimas concentrações inibitórias para cada isolado de *L. monocytogenes* conforme cada sanitizante utilizado.

Cultura	Amostra	Sanitizante - Diluição	
		A -Mister Max Gel	B- B-Quart Sept
5	Amaciador	1:256	1:8.192
6	Amaciador	1:256	1:16.384
7	Amaciador	1:256	1:8.192
16	Amaciador	1:256	1:4.096
17	Amaciador	1:256	1:4.096
18	Balcão ref.	1:256	1:4.096
19	Balcão ref.	1:256	1:4.096
20	Balcão ref.	1:256	1:4.096
21	Balcão ref.	1:256	1:4.096
22	Balcão ref.	1:256	1:4.096
1	Mesa	1:256	1:4.096
2	Mesa	1:256	1:16.384
3	Mesa	1:256	1:8.192
4	Mesa	1:256	1:8.192
11	Mesa	1:512	1:8.192
12	Mesa	1:256	1:8.192
13	Mesa	1:256	1:4.096
9	Moedor	1:256	1:8.192
14	Moedor	1:512	1:4.096
15	Moedor	1:256	1:4.096

Tabela 4: Médias ($\pm$ desvio padrão) do pontencial de adesão dos isolados obtidos, com a co-inoculação dos sanitizantes A e B nas diluições de 1:64 e 1: 1.024, respectivamente.

Cultura	Sanitizante - Diluição				
	Amostra	Controle	A - 1:64	B - 1:1.024	ANOVA
5	Amaciador	0.16 ± 0.004^a	0.01 ± 0.01^b	0.13 ± 0.01^a	F (2, 9) = 34, p < 0.001
6	Amaciador	0.17 ± 0.04^a	0.01 ± 0.004^b	0.17 ± 0.04^a	F (2, 9) = 28.1 p < 0.01
7	Amaciador	0.18 ± 0.05^b	0.17 ± 0.04^c	0.17 ± 0.04^a	F (2, 9) = 67, p < 0.001
16	Amaciador	0.04 ± 0.01^a	0.002 ± 0.002^b	0.1 ± 0.03^c	F (2, 9) = 33.5, p < 0.001
17	Amaciador	0.02 ± 0.07^b	0.003 ± 0.002^b	0.13 ± 0.03^a	F (2, 9) = 36.4, p < 0.001
18	Balcão ref.	0.03 ± 0.002^b	0.01 ± 0.001^c	0.1 ± 0.01^a	F (2, 9) = 227.1, p < 0.001
19	Balcão ref.	0.02 ± 0.003^b	0.005 ± 0.001^b	0.44 ± 0.1^a	F (2, 9) = 86.2, p < 0.001
20	Balcão ref.	0.02 ± 0.01^b	0.004 ± 0.002^c	0.14 ± 0.01^a	F (2, 9) = 310, p < 0.001
21	Balcão ref.	0.03 ± 0.004^b	0.003 ± 0.005^b	0.12 ± 0.04^a	F (2, 9) = 31.2, p < 0.001
22	Balcão ref.	0.03 ± 0.01^a	0.003 ± 0.001^b	0.2 ± 0.04^a	F (2, 9) = 63, p < 0.001
1	Mesa	0.17 ± 0.03^a	0.01 ± 0.01^b	0.16 ± 0.05^a	F (2, 9) = 19.9, p < 0.01
2	Mesa	0.18 ± 0.05^a	0.01 ± 0.01^b	0.16 ± 0.04^a	F (2, 9) = 35.5, p < 0.001
3	Mesa	0.17 ± 0.07^a	0.005 ± 0.005^b	0.16 ± 0.08^a	F (2, 9) = 8, p < 0.01
4	Mesa	0.14 ± 0.04^a	0.01 ± 0.01^b	0.12 ± 0.02^a	F (2, 9) = 21, p < 0.01
11	Mesa	0.03 ± 0.02^b	0.01 ± 0.001^b	0.15 ± 0.03^a	F (2, 9) = 47.4, p < 0.001
12	Mesa	0.03 ± 0.002^b	0.004 ± 0.002^b	0.3 ± 0.03^a	F (2, 9) = 207.5, p < 0.001
13	Mesa	0.03 ± 0.01^b	0.003 ± 0.00^c	0.11 ± 0.01^a	F (2, 9) = 153.4, p < 0.001
9	Moedor	0.02 ± 0.01^b	0.005 ± 0.004^b	0.09 ± 0.01^a	F (2, 9) = 70, p < 0.001
14	Moedor	0.03 ± 0.005^b	0.003 ± 0.001^b	0.12 ± 0.03^a	F (2, 9) = 38, p < 0.001
15	Moedor	0.04 ± 0.01^b	0.005 ± 0.001^c	0.1 ± 0.02^a	F (2, 9) = 40, p < 0.001
Scott A		0.03 ± 0.003^b	0.005 ± 0.003^b	0.34 ± 0.05^a	F (2, 9) = 160, p < 0.001
ATCC 7644		1.03 ± 0.08^a	0.11 ± 0.01^c	0.15 ± 0.04^b	F (2, 9) = 427, p < 0.001

¹ Médias com letras diferentes indicam diferenças significativas por ANOVA (p < 0.05).

Tabela 5: Médias ($\pm$ desvio padrão) do pontencial de adesão dos isolados obtidos, com a co-inoculação dos sanitizantes A e B em suas respectivas (MIC).

Cultura	Amostra	Controle	Sanitizante – Diluição (MIC)		ANOVA
			A - 1:256	B - 1:4.096	
5	Amaciador	0.5 $\pm$ 0.01 ^a	0.15 $\pm$ 0.04 ^b	0.2 $\pm$ 0.05 ^b	F (2, 9) = 42.3, p < 0.001
6	Amaciador	0.5 $\pm$ 0.04 ^a	0.2 $\pm$ 0.003 ^b	0.2 $\pm$ 0.05 ^b	F (2, 9) = 89, p < 0.001
7	Amaciador	0.04 $\pm$ 0.005 ^a	0.03 $\pm$ 0.01 ^a	0.03 $\pm$ 0.01 ^a	F (2, 9) = 1.2, p < 0.348
16	Amaciador	0.06 $\pm$ 0.006 ^{ab}	0.1 $\pm$ 0.01 ^a	0.4 $\pm$ 0.01 ^b	F (2, 9) = 7.6, p < 0.01
17	Amaciador	0.05 $\pm$ 0.005 ^b	0.1 $\pm$ 0.01 ^c	0.03 $\pm$ 0.005 ^a	F (2, 9) = 50.3, p < 0.001
18	Balcão ref.	0.04 $\pm$ 0.005 ^b	0.1 $\pm$ 0.01 ^a	0.05 $\pm$ 0.01 ^b	F (2, 9) = 17.4, p < 0.001
19	Balcão ref.	0.03 $\pm$ 0.02 ^b	0.1 $\pm$ 0.01 ^a	0.04 $\pm$ 0.004 ^b	F (2, 9) = 6.6, p < 0.01
20	Balcão ref.	0.01 $\pm$ 0.002 ^b	0.05 $\pm$ 0.01 ^a	0.02 $\pm$ 0.005 ^b	F (2, 9) = 58.5, p < 0.001
21	Balcão ref.	0.05 $\pm$ 0.01 ^a	0.1 $\pm$ 0.01 ^a	0.01 $\pm$ 0.06 ^a	F (2, 9) = 2.4, p < 0.144
22	Balcão ref.	0.05 $\pm$ 0.01 ^b	0.11 $\pm$ 0.13 ^a	0.1 $\pm$ 0.01 ^b	F (2, 9) = 23.2, p < 0.01
1	Mesa	0.5 $\pm$ 0.1 ^a	0.3 $\pm$ 0.01 ^b	0.2 $\pm$ 0.05 ^b	F (2, 9) = 35.1, p < 0.001
2	Mesa	0.5 $\pm$ 0.1 ^a	0.3 $\pm$ 0.01 ^b	0.2 $\pm$ 0.05 ^c	F (2, 9) = 20.3, p < 0.01
3	Mesa	0.4 $\pm$ 0.03 ^a	0.3 $\pm$ 0.005 ^a	0.2 $\pm$ 0.1 ^b	F (2, 9) = 15.3, p < 0.001
4	Mesa	0.5 $\pm$ 0.04 ^a	0.25 $\pm$ 0.01 ^b	0.2 $\pm$ 0.05 ^c	F (2, 9) = 69.4, p < 0.001
11	Mesa	0.1 $\pm$ 0.01 ^a	0.1 $\pm$ 0.01 ^{ab}	0.05 $\pm$ 0.02 ^b	F (2, 9) = 6.7, p < 0.02
12	Mesa	0.1 $\pm$ 0.02 ^a	0.1 $\pm$ 0.02 ^a	0.1 $\pm$ 0.02 ^a	F (2, 9) = 0.8, p < 0.458
13	Mesa	0.1 $\pm$ 0.002 ^a	0.1 $\pm$ 0.01 ^{ab}	0.1 $\pm$ 0.02 ^b	F (2, 9) = 5, p < 0.035
9	Moedor	0.1 $\pm$ 0.02 ^a	0.1 $\pm$ 0.01 ^a	0.1 $\pm$ 0.003 ^a	F (2, 9) = 0.308, p < 0.742
14	Moedor	0.1 $\pm$ 0.01 ^a	0.1 $\pm$ 0.003 ^a	0.03 $\pm$ 0.01 ^b	F (2, 9) = 25, p < 0.01
15	Moedor	0.05 $\pm$ 0.005 ^b	0.1 $\pm$ 0.01 ^a	0.05 $\pm$ 0.01 ^b	F (2, 9) = 36, p < 0.001
Scott A		0.1 $\pm$ 0.014 ^a	0.1 $\pm$ 0.05 ^a	0.14 $\pm$ 0.1 ^a	F (2, 9) = 0.624, p < 0.56
ATCC 7644		1,02 $\pm$ 0.12 ^a	0.1 $\pm$ 0.01 ^b	0.13 $\pm$ 0.1 ^b	F (2, 9) = 103, p < 0.01

¹ Médias com letras diferentes indicam diferenças significativas por ANOVA (p < 0.05).

Tabela 6: Médias ($\pm$ desvio padrão) do efeito dos sanitizantes A e B nas diluições de 1:64 e 1: 1.024, na remoção do biofilme formado por cada isolado.

Cultura	Amostra	Controle	Sanitizante - Diluição		ANOVA
			A - 1:64	B - 1:1.024	
5	Amaciador	0.21 $\pm$ 0.01 ^a	0.05 $\pm$ 0.01 ^b	0.16 $\pm$ 0.04 ^a	F (2, 9) = 36, p < 0.001
6	Amaciador	0.24 $\pm$ 0.22 ^a	0.05 $\pm$ 0.01 ^c	0.2 $\pm$ 0.02 ^b	F (2, 9) = 112.3 p < 0.001
7	Amaciador	0.15 $\pm$ 0.02 ^a	0.1 $\pm$ 0.01 ^b	0.14 $\pm$ 0.02 ^a	F (2, 9) = 18.5, p < 0.001
16	Amaciador	0.03 $\pm$ 0.004 ^a	0.003 $\pm$ 0.004 ^a	0.03 $\pm$ 0.003 ^a	F (2, 9) = 61, p < 0.001
17	Amaciador	0.02 $\pm$ 0.004 ^b	0.003 $\pm$ 0.003 ^c	0.04 $\pm$ 0.003 ^c	F (2, 9) = 190, p < 0.001
18	Balcão ref.	0.04 $\pm$ 0.004 ^a	0.015 $\pm$ 0.002 ^b	0.045 $\pm$ 0.001 ^a	F (2, 9) = 143.3, p < 0.001
19	Balcão ref.	0.013 $\pm$ 0.002 ^b	0.004 $\pm$ 0.003 ^b	0.02 $\pm$ 0.01 ^a	F (2, 9) = 16.4, p < 0.001
20	Balcão ref.	0.02 $\pm$ 0.01 ^b	0.03 $\pm$ 0.005 ^c	0.04 $\pm$ 0.005 ^a	F (2, 9) = 49.5, p < 0.001
21	Balcão ref.	0.04 $\pm$ 0.01 ^a	0.02 $\pm$ 0.005 ^b	0.04 $\pm$ 0.003 ^a	F (2, 9) = 26.3, p < 0.001
22	Balcão ref.	0.05 $\pm$ 0.005 ^b	0.025 $\pm$ 0.01 ^b	0.15 $\pm$ 0.023 ^a	F (2, 9) = 85.2, p < 0.001
1	Mesa	0.21 $\pm$ 0.04 ^a	0.1 $\pm$ 0.02 ^b	0.13 $\pm$ 0.01 ^a	F (2, 9) = 22.3, p < 0.01
2	Mesa	0.1 $\pm$ 0.02 ^a	0.06 $\pm$ 0.02 ^c	0.135 $\pm$ 0.002 ^b	F (2, 9) = 23.2, p < 0.01
3	Mesa	0.24 $\pm$ 0.02 ^a	0.05 $\pm$ 0.01 ^c	0.2 $\pm$ 0.01 ^b	F (2, 9) = 104, p < 0.001
4	Mesa	0.2 $\pm$ 0.01 ^a	0.04 $\pm$ 0.01 ^a	46.3 $\pm$ 92.4 ^a	F (2, 9) = 1, p < 0.405
11	Mesa	0.03 $\pm$ 0.01 ^b	0.04 $\pm$ 0.001 ^b	0.125 $\pm$ 0.03 ^a	F (2, 9) = 28.4, p < 0.1
12	Mesa	0.04 $\pm$ 0.01 ^b	0.04 $\pm$ 0.11 ^b	0.16 $\pm$ 0.004 ^a	F (2, 9) = 31, p < 0.001
13	Mesa	0.04 $\pm$ 0.01 ^b	0.002 $\pm$ 0.002 ^c	0.1 $\pm$ 0.01 ^a	F (2, 9) = 219, p < 0.001
9	Moedor	0.03 $\pm$ 0.004 ^b	0.05 $\pm$ 0.02 ^b	0.12 $\pm$ 0.02 ^a	F (2, 9) = 43.2, p < 0.001
14	Moedor	0.002 $\pm$ 0.01 ^b	0.002 $\pm$ 0.002 ^c	0.035 $\pm$ 0.01 ^a	F (2, 9) = 45.5, p < 0.001
15	Moedor	0.005 $\pm$ 0.01 ^b	0.03 $\pm$ 0.02 ^b	0.13 $\pm$ 0.02 ^a	F (2, 9) = 40, p < 0.001
Scott A		0.006 $\pm$ 0.03 ^b	0.05 $\pm$ 0.03 ^b	0.15 $\pm$ 0.05 ^a	F (2, 9) = 10.6, p < 0.004
ATCC 7644		1.1 $\pm$ 0.1 ^a	0.9 $\pm$ 0.02 ^a	1,03 $\pm$ 0.2 ^a	F (2, 9) = 2.3, p < 0.1

¹ Médias com letras diferentes indicam diferenças significativas por ANOVA (p < 0.05).

Tabela 7: Médias ($\pm$ desvio padrão) do efeito dos sanitizantes A e B em suas respectivas (MIC), na remoção do biofilme formado por cada isolado.

Cultura	Sanitizante – Diluição (MIC)				
	Amostra	Controle	A - 1:256	B - 1:4.096	ANOVA
5	Amaciador	0.3 ± 0.02^a	0.2 ± 0.012^b	0.1 ± 0.02^c	F (2, 9) = 81, p < 0.001
6	Amaciador	0.21 ± 0.2^a	0.3 ± 0.04^a	0.12 ± 0.03^a	F (2, 9) = 2.8, p < 0.1
7	Amaciador	0.15 ± 0.03^a	0.02 ± 0.01^a	0.02 ± 0.01^a	F (2, 9) = 2.5, p < 0.1
16	Amaciador	0.05 ± 0.01^a	0.03 ± 0.003^b	0.04 ± 0.01^{ab}	F (2, 9) = 6.9, p < 0.01
17	Amaciador	0.01 ± 0.01^a	0.01 ± 0.01^a	0.01 ± 0.01^a	F (2, 9) = 1.73, p < 0.230
18	Balcão ref.	0.06 ± 0.003^a	0.04 ± 0.01^b	0.05 ± 0.01^{ab}	F (2, 9) = 4.8, p < 0.038
19	Balcão ref.	0.04 ± 0.005^a	33.7 ± 67.4^a	0.05 ± 0.004^a	F (2, 9) = 1, p < 0.405
20	Balcão ref.	0.04 ± 0.01^a	0.04 ± 0.003^a	0.04 ± 0.01^a	F (2, 9) = 00.3, p < 0.9
21	Balcão ref.	0.04 ± 0.01^a	0.03 ± 0.01^a	0.03 ± 0.02^a	F (2, 9) = 1.7, p < 0.233
22	Balcão ref.	0.05 ± 0.01^a	0.05 ± 0.01^a	0.04 ± 0.01^a	F (2, 9) = 1.3, p < 0.317
1	Mesa	0.3 ± 0.03^a	0.24 ± 0.01^b	0.1 ± 0.001^c	F (2, 9) = 74.3, p < 0.001
2	Mesa	0.24 ± 0.03^a	0.24 ± 0.03^a	0.14 ± 0.001^b	F (2, 9) = 18.5, p < 0.001
3	Mesa	0.3 ± 0.02^a	0.25 ± 0.1^a	0.1 ± 0.04^b	F (2, 9) = 15.5, p < 0.001
4	Mesa	0.36 ± 0.02^a	0.25 ± 0.015^b	0.1 ± 0.002^c	F (2, 9) = 203.6, p < 0.001
11	Mesa	0.05 ± 0.005^a	0.04 ± 0.002^b	0.04 ± 0.002^b	F (2, 9) = 8, p < 0.01
12	Mesa	0.02 ± 0.02^a	0.01 ± 0.003^a	0.02 ± 0.01^a	F (2, 9) = 0.85, p < 0.459
13	Mesa	0.05 ± 0.004^b	0.05 ± 0.003^b	0.06 ± 0.001^a	F (2, 9) = 23.1, p < 0.01
9	Moedor	0.05 ± 0.01^a	0.03 ± 0.005^b	0.02 ± 0.003^b	F (2, 9) = 16.4, p < 0.001
14	Moedor	0.003 ± 0.002^b	0.004 ± 0.06^b	0.01 ± 0.01^a	F (2, 9) = 6.9, p < 0.01
15	Moedor	0.04 ± 0.001^a	0.02 ± 0.005^a	33.7 ± 67.4^a	F (2, 9) = 1, p < 0.405
Scott A		0.035 ± 0.01^a	0.04 ± 0.01^a	0.03 ± 0.005^a	F (2, 9) = 1.22, p < 0.339
ATCC 7644		1 ± 0.1^a	0.7 ± 0.04^a	0.9 ± 0.28^a	F (2, 9) = 3.3, p < 0.08

¹ Médias com letras diferentes indicam diferenças significativas por ANOVA (p < 0.05).

Tabela 8: Frequências de amostras positivas para *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* na avaliação in loco do efeito dos sanitizantes.

Alvo	Amostra	Positividade		Estatísticas
		antes	depois	
<i>Listeria</i> spp.	Amaciador	6/8	3/6	$\chi^2 = 0.93$, DF = 1, p = 0.334
	Balcão ref.	4/8	2/6	$\chi^2 = 0.39$, DF = 1, p = 0.533
	Facas	4/8	3/6	$\chi^2 = 0.003$, DF = 1, p = 1.000
	Mesa	8/8	3/6	$\chi^2 = 5.09$, DF = 1, p = 0.024
	Moedor	8/8	1/6	$\chi^2 = 10.37$, DF = 1, p = 0.001
<i>L. monocytogenes</i>	Amaciador	3/8	0/6	$\chi^2 = 2.86$, DF = 1, p = 0.091
	Balcão ref.	1/8	0/6	$\chi^2 = 0.81$, DF = 1, p = 0.369
	Facas	0/8	0/6	-
	Mesa	3/8	0/6	$\chi^2 = 2.86$, DF = 1, p = 0.091
	Moedor	2/8	0/6	$\chi^2 = 1.75$, DF = 1, p = 0.186

¹ Médias com letras diferentes indicam diferenças significativas por X^2 (p < 0.05).

CONCLUSÕES

A ocorrência de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* foi confirmada no ambiente de processamento de todos os estabelecimentos analisados (ambas as etapas). A presença de *L. monocytogenes* no ambiente de processamento de produtos cárneos pode determinar contaminação dos produtos finais destinados aos consumidores, que por sua vez podem determinar contaminação cruzada para outros alimentos. O presente estudo identificou a presença de sorogrupos de *L. monocytogenes* reconhecidos como patogênicos, e a presença dos genes de virulência indicaram a potencial exposição dos consumidores a cepas patogênicas.

Na verificação do potencial de adesão de *L. monocytogenes* todos os isolados obtidos apresentaram algum potencial de adesão quando testados in vitro, evidenciando sua capacidade de colonizar diferentes pontos do ambiente de manipulação. O potencial de adesão dos isolados obtidos foi demonstrado, e os sanitizantes Mister Max 1- DG1[®] e B-QUART SEPT[®] apresentaram eficiência na prevenção e eliminação de biofilmes formados pelos isolados obtidos. Esses mesmos sanitizantes foram incorporados na rotina de higienização dos equipamentos e utensílios do estabelecimento selecionado, resultando em redução das frequências de amostras positivas para *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*.

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 51/2014, intitulado "Avaliação da contaminação, identificação dos fatores de patogenicidade e realização de um rastreamento epidemiológico de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* isoladas no ambiente de manipulação, de produtos cárneos em estabelecimentos comerciais da cidade de Viçosa-MG", coordenado pelo professor Luís Augusto Nero do Departamento de Veterinária, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 11/09/2014, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 51/2014, named "Assessment of the contamination, pathogenic markers and epidemiological tracking of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* obtained from butcher shop environment and beef production in commercial establishments from Viçosa-MG", is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on September 11, 2014 valid for 12 months.



Prof. Cláudio César Fonseca
Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV