UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Dissertação

Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em linha de processamento de *Beef Jerky*

Márcia Goulart Lopes Coradini

Pelotas, 2015

Márcia Goulart Lopes Coradini

Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em linha de processamento de *Beef Jerky*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Dr. Wladimir Padilha da Silva
Co-orientador: Drª Eduarda Hallal Duval

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas

Catalogação na Publicação

C787o Coradini, Marcia Goulart Lopes

Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em linha de prprocessamento de *Beef Jerky* / Marcia Goulart Lopes Coradini ; Wladimir Padilha da Silva, orientador ; Eduarda hallal Duval, coorientadora. — Pelotas, 2015.

44 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Carne curada. 2. *Listeria monocytogenes*. 3. PCR. I. Silva, Wladimir Padilha da, orient. II. Duval, Eduarda hallal, coorient. III. Título.

CDD : 636.2

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Márcia Goulart Lopes Coradini

Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em linha de processamento de *Beef Jerky*

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa:
22/12/2015

BANCA EXAMINADORA:

Drª Márcia Magalhães Mata

Prof. Dr. Celso Medina Fagundes

Prof. Drª Caroline Peixoto Bastos

Agradecimentos

À minha família, em especial ao meu esposo Elio Jorge Coradini Filho, por me substituir nos momentos ausentes com nossas filhas, incentivar e apoiar;

Minhas filhas Maria Laura e Maria Júlia que mesmo pequenas sabiam a hora de silenciar para mamãe estudar;

Aos amigos pelo apoio e incentivo, especialmente a Glau que me socorreu muitas vezes no transporte da Maria Laura quando eu não estava em Bagé;

À minha companheira de viagens e mestrado Fernanda Fernandes, pois muitas vezes não desisti porque não podia deixá-la sozinha na estrada.

Meu orientador Wladimir Padilha da Silva, por acreditar em mim, e mesmo após anos longe da Universidade me aceitou como sua orientanda;

A Darla Volcan e Mariana Iglesias, obrigada pela paciência e atenção: a ajuda de vocês foi fundamental;

Ao Frigorífico Marfrig – Pampeano, em especial ao Marcos Fernandes, por abrir as portas da unidade para realização da pesquisa;

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia do Frigorífico Pampeano, por ceder espaço e auxiliar quando foi necessário.

Muito Obrigada!

Resumo

CORADINI, Márcia Goulart Lopes. **Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em linha de processamento de *Beef Jerky*.** 41f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

A busca crescente dos consumidores por praticidade destaca-se dentre as principais tendências de consumo de alimentos no mundo. Neste contexto, enquadra-se o *Beef Jerky*, um produto cárneo produzido através de processo térmico, que não necessita de refrigeração no ponto de venda. Entretanto, por ser um alimento pronto para o consumo, deve-se garantir sua segurança e uma das bactérias patogênicas que, uma vez presente neste alimento, pode causar danos à saúde dos consumidores, é *Listeria monocytogenes.* O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de *L. monocytogenes* em uma linha de produção de *Beef Jerky* localizada no município de Bagé, Rio Grande do sul- Brasil. Foram realizadas sete coletas, nas quais se avaliaram 12 pontos ao longo da linha de processamento, dentre eles a matéria-prima, superfícies com e sem contato com o produto, bem como o produto final. As amostras foram analisadas no equipamento Mini Vidas® bioMérieux e, aquelas que apresentaram resultado positivo para *L. monocytogenes*, foram submetidas a PCR, utilizando-se o gene *prs* para confirmação de gênero, e os genes *inlA*, *inlC* e *inJ* para confirmação da espécie *L. monocytogenes*. A ocorrência global de *L. monocytogenes* foi de 7,14%, sendo 21,42% em superfícies sem contato com produto, 1,78% em superfícies de contato com produto, e 28,57% na matéria-prima, entretanto, não se identificou o patógeno no produto final. Observa-se que a matéria-prima é uma importante fonte de contaminação e introdução de *L. monocytogenes* na indústria produtora de *Beef Jerky* e que a contaminação por esse micro-organismo em superfícies de contato e sem contato com o alimento, reforça a importância dos programas de higienização como forma de evitar contaminação cruzada para o produto final. Entretanto, como o produto final (*Beef Jerky*) não apresentou contaminação por *L. monocytogenes*, as etapas do processo de produção que envolvem barreiras à multiplicação de patógenos e morte microbiana, podem ter sido efetivas no controle do patógeno.

Abstract

Coradini, Marcia Goulart Lopes. **Occurrence of *Listeria monocytogenes* in *Beef Jerky* processing line. 41f.** Dissertation (Master of Food science and technology) - Graduate Program in Food Science and Technology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2015.

The growing demand of consumers for convenience, stands out among the main trends in food consumption in the world. In this context is the *beef jerky* a meat product produced by thermal process that does not require refrigeration at the point of sale, ensuring practicality of use. However, being a food ready for consumption, should ensure its security and one pathogenic bacteria that, once present, can harm the health of consumers is *Listeria* monocytogenes. The objective of this research was to identify the occurrence of *L. monocytogenes* in a *Beef Jerky* production line located in the municipality of Bage, Rio Grande do Sul- Brazil. We evaluated 12 points along the processing line, including the raw materials, surfaces with and without contact with the product as well as the final product, in seven collections. Samples were analyzed in Mini Vidas® bioMérieux equipment and those that tested positive for *L. monocytogenes,* were subjected to PCR using the *prs* gene for gender confirmation and the *inlA* genes, inlC and inlJ to confirm the species *L. monocytogenes*. The overall occurrence of *L. monocytogenes* was 7.14% and 21.42% on surfaces without contact with product, 1.78% on product contact surfaces, and 28.57% in the raw material, however, it did not identify the pathogen in the final product. It is observed that the raw material is a major source of contamination and introduction of *L. monocytogenes* in producer *Beef Jerky* industry and the contamination by that micro-organism contact surfaces without contact with food, reinforces the importance of cleaning programs in order to avoid cross-contamination of the final product. However, since the final product (*Beef Jerky*) showed no contamination by *L. monocytogenes,* the steps of the production process involving barriers to multiplication of pathogens and microbial death, may have been effective in pathogen control.

Lista de Figuras

Figura 1 Representação esquemática da linha de produção de *Beef Jerky,* indicando os pontos de coleta de amostras.....23

Figura 2 Produtos da amplificação dos genes *inlA* (800 pb), *inlC* (517pb) e *inlJ* (238 pb). Coluna 1: marcador de peso molecular 1kb; Coluna 2 a 7: *L.monocytogenes* isoladas da planta de processamento de *Beef Jerky;* Coluna 8: *L. monocytogenes* ATCC 7644;.....29

Lista de Tabelas

Tabela 1 Parâmetros de multiplicação de *L. monocytogenes* 14

Tabela 2 Características fenotípicas de seis espécies de *Listeria* 14

Tabela 3 Sequência dos oligonucleotídeos utilizados e tamanho dos fragmentos estimados para detecção dos genes *prs*, *inlA*, *inlC* e *inlJ* em isolados de *L. monocytogenes* 26

Tabela 4 Presença de *L. monocytogenes* em uma linha de produção de *Beef Jerky* avaliada pelo Mini Vidas® bioMérieux.....27

Tabela 5 Resultados obtidos pelo Mini Vidas® e por PCR para presença de *L. monocytogenes* em planta de processamento de *Beef Jerky* 28

Tabela 6 Ocorrência de *L. monocytogenes* em planta de processamento de *Beef Jerky*.....29

Sumário

Introdução 9

1 Revisão de Literatura 11
1.1 Contextualização do Mercado 11
1.2 Características do *Beef Jerky* 11
1.3 *L. monocytogenes* 13
1.4 Fontes de contaminação na indústria 15
1.5 Métodos de detecção 17

Capítulo 1 – Manuscrito: Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em linha de processamento de *Beef Jerky* no Brasil 19
1. INTRODUÇÃO 22
2 MATERIAL E MÉTODOS 23
2.1 Coletas e pontos de amostragem 23
2.1.1 Amostras de superfícies 23
2.1.2 Amostras de matéria-prima e produto final 24
2.2 Identificação de *L. monocytogenes* pelo Mini Vidas® bioMérieux 24
2.3 Isolamento e caracterização de *Listeria* spp. por métodos convencionais 24
2.3.1 Seleção e purificação das colônias suspeitas de *Listeria* spp. 24
2.4 Caracterização molecular 25
2.4.1 Extração de DNA 25
2.4.2 PCR 26
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 27
3.1 Ocorrência global de *L. monocytogenes* em planta de processamento de *Beef Jerky* 27
3.2 Ocorrência de *L. monocytogenes* na matéria-prima 30
3.3 Ocorrência de *L. monocytogenes* em superfícies que entram em contato com produto 31
3.4 Ocorrência de *L. monocytogenes* em superfícies sem contato com produto 31
3.5 Ocorrência de *L. monocytogenes* no produto final (*Beef Jerky*) 32
4 Conclusão 33
Referências 34

Conclusão 38

Referências 39

INTRODUÇÃO

Em 2014, o Brasil celebrou 100 anos da sua primeira exportação de carne bovina e comemorou um novo recorde: encerrar o ano com faturamento acima de US$ 7 bilhões, conforme a Associação Brasileira da Indústria Exportadora de Carne (ABIEC, 2014). Dentre os produtos exportados está o *Beef Jerky*, criado pelos *cowboys* americanos. Este produto é uma carne seca vendida como lanche (*snacks*), geralmente em formato de palitinho embalado a vácuo, e já pronto para consumo. Pode ser aromatizado com diversos sabores e não exige refrigeração (SIC, 2014).

Segundo Santos e Palmeira (2014), a população norte-americana é grande consumidora de proteína animal e por esta razão, apresenta um expressivo potencial para o crescimento do mercado de carne processada brasileira. Até os primeiros anos do século XXI, as exportações brasileiras mantinham certa estabilidade, pois se exportava praticamente *Corned Beef* (carne bovina cozida enlatada), porém, nos últimos anos, a indústria brasileira de processamento de carne bovina, vem desenvolvendo novos produtos, como carne bovina cozida congelada, *Beef Jerky* (carne desidratada), *Dried Beef* (carne seca), além de outros produtos enlatados feitos à base de carne.

Segundo Cassel (2014), há grande demanda do mercado norte americano por produtos cárneos desidratados, como o *Beef Jerky.* O autor destaca as características nutricionais do produto, o qual, além de ser uma fonte proteica, é um alimento de baixo nível calórico e com muito baixo teor de gordura. Dessa forma, em função do crescente número de obesos existentes naquele país, bem como pelas características do *Beef Jerky*, este produto tem sido muito consumido pela população dos Estados Unidos da América (EUA).

A exportação de *Beef Jerky* pelo Brasil somente é liberada se a indústria brasileira seguir as normas americanas e europeias de controle e segurança de alimentos. Dentre os requisitos exigidos, estão os programas de qualidade HACCP (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle), POPS (Procedimentos Operacionais Padronizados de Sanidade), e programas sentinela para *L. monocytogenes.* Neste contexto, a Instrução Normativa nº 9/2009, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil, representa um importante instrumento de modernização do sistema de inspeção de produtos de origem animal,

porque foi editada com base em “Objetivos de Inocuidade Alimentar”, OIA (*Food Safety Objectives – FSO,* sigla em inglês) previamente definidos, os quais focalizam os riscos da presença de eventuais agentes de Doenças Transmitidas pelos Alimentos (DTA).

A Instrução Normativa 175/2005, também do MAPA, determina que as produções de Carne Cozida Congelada e de *Beef Jerky* destinadas à exportação para os EUA devem ser submetidas ao controle de *Listeria* spp. Os estabelecimentos produtores devem desenvolver e implantar Programa Sentinela para *Listeria* spp, atrelando este programa aos de APPCC e PPHO, para garantir a sanidade de produtos prontos para consumo (LUBER *et al.*, 2011).

Dentre as bactérias pertencentes ao gênero *Listeria*, destaca-se *L. monocytogenes*, que pode causar listeriose em humanos. Esse micro-organismo é ubíquo, e capaz de se multiplicar em uma ampla faixa de temperatura, inclusive em temperatura de refrigeração, o que aumenta o risco de infecção em humanos por alimentos contaminados mantidos em baixas temperaturas (LIU, 2006).

Um importante aspecto a ser considerado nas indústrias de alimentos é o fato de alguns isolados de *L. monocytogenes* se tornarem persistentes, os quais são capazes de permanecerem meses, ou até anos, no ambiente de processamento, podendo provocar contaminações recorrentes no produto final (CARPENTIER & CEF, 2011).

A ausência de boas práticas de fabricação na produção de alimentos pode tornar o ambiente de processamento uma fonte de bactérias patogênicas, como *L. monocytogenes*, com habilidade para colonizar equipamentos e contaminar o produto final. Neste sentido, destacam-se as plantas processadoras de alimentos como o *Beef Jerky*, onde o produto exige intensa manipulação e contato direto com superfícies e equipamentos. Esse aspecto, aliado ao fato do *Beef Jerky* ser pronto para o consumo, o torna um alimento de risco para o consumidor.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de *L. monocytogenes* na linha de processamento de *Beef Jerky*.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Contextualização do Mercado

Conforme a ABIEC (2014), foram exportadas, no ano de 2013, período janeiro-dezembro, 101.695 toneladas de carne industrializada e, em 2014, período janeiro-setembro, 75.286 toneladas, com faturamento de US$ 469.330,00. Dentre estas exportações de produto industrializado, o principal destino foi os EUA com 14.534 toneladas (jan.-set, 2014).

A industrialização representa agregar valor a produtos brasileiros, tendo em vista que exportar carne *in natura* para os EUA ainda não é permitido. Nesse contexto, se encaixa o *Beef Jerky*, um produto pronto para consumo, que é consumido como petisco, principalmente no norte dos EUA e Canadá. Atualmente, a União Europeia liberou a importação do *Beef Jerky* do Brasil, aumentando o mercado de venda.

O Brasil é um grande produtor de *Beef Jerky* devido à oferta de matéria-prima. Já nos EUA, onde a carne *in natura* é muito cara, é mais barato importar o produto, do que produzir. Em função dos hábitos alimentares da população americana e do baixo valor de compra deste alimento (aproximadamente 4 dólares o pacote de 0,700 g), este chega ao consumidor com muita facilidade e tem um grande mercado de varejo (SIC, 2014).

Existem princípios e estratégias gerais normatizados para exportação de produtos prontos para consumo, os quais exigem segurança de que esses produtos não estejam contaminados e sejam produzidos com base nas orientações do *Codex Alimentarius* (LUBER, 2011; WARRINER e NAMVAR, 2009).

1.2 Características do Beef Jerky

Beef Jerky é um produto cárneo curado, termicamente processado e seco, pronto para o consumo, com atividade de água (A_a) abaixo de 0,80, portanto, não necessita de refrigeração quando exposto ao consumo. A indústria deve aplicar um tratamento térmico(letalidade e secagem) para controlar, reduzir ou eliminar os perigos biológicos identificados na análise de perigos. Esses perigos geralmente

incluem *Salmonella spp., L. monocytogenes, Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* O157:H7 (MAPA, 2011).

Segundo USDA/FSIS (2014), o processo de produção deve seguir alguns passos importantes, que serão descritos a seguir.

Inicialmente, é feita a preparação do músculo para ser fatiado. Nesta etapa deve-se remover o tecido adiposo, aponeuroses, vasos e contaminações aparentes.

Logo após, a matéria-prima pode seguir para processo de marinação, onde é submersa em uma solução contendo água, sal, açúcar, aromatizantes e outros ingredientes e/ou aditivos autorizados, entre eles nitrito e nitrato. A marinação é um passo opcional, no qual se podem adicionar ingredientes que podem afetar a sobrevivência de agentes patogênicos que teriam condições de se multiplicar neste tipo de alimento (HARRISON *et al.*, 2006).

Na sequência, os produtos, marinados ou não, são submetidos à cura, onde ficam em contato com ingredientes, por duas a 24 horas. Após, é realizado o tratamento denominado de letalidade, que é usado para destruir micro-organismos patogênicos num produto, tornando-o seguro para consumo humano. O tempo inicial é quando o produto é colocado no forno aquecido até que atinja a combinação de tempo/temperatura de letalidade desejada (também referido como o tempo de cozimento). Normalmente, utilizam-se temperaturas em torno de 90ºC, por 40 minutos, para que no interior do produto a temperatura atinja 71,1ºC (USDA/FSIS, 2104). Deve-se levar em consideração o valor D, que é o binômio tempo/temperatura necessário para reduzir 90% ou 1 $\log^{10}$ do micro-organismo alvo (HARRISON *et al.*, 2006).

Na etapa de secagem, diminui-se a atividade de água do produto, de forma que esta fique <0,80, com a finalidade de garantir seguridade alimentar. Buege *et al*. (2006), demonstraram que a elevada temperatura da secagem com a umidade ainda alta tem efeito positivo no processo de redução de *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7, onde a redução foi de 5 log UFC.

O padrão de qualidade e identidade deste produto requer relação umidade/proteína de 0,75:1 e atividade de água 0,80, o que garantirá a estabilidade durante sua vida útil. Estima-se que a validade deste produto embalado a vácuo seja de ±24 meses *(*PORT-FEET *et al.*, 2008). Entretanto, Ingham *et al.* (2009) avaliaram a multiplicação de *L. monocytogenes* em *Beef Jerky* com atividade de água entre 0,47 e 0,85 e relação proteína/umidade 0,75:1, e concluíram que apenas o

monitoramento desses parâmetros não é suficiente para controlar a presença desse micro-organismo em produtos prontos para consumo, devendo-se usar outros métodos pós tratamento de letalidade, como agentes antimicrobianos e programas de controles.

Sendo assim, a USDA/FSIS (2014) lançou o programa Controlling *Listeria monocytogenes* in Post-lethality Exposed Ready-to-Eat Meat and Poultry Products, o qual estabelece medidas após o tratamento de letalidade para evitar a contaminação por *L. monocytogenes,* tais como: utilização de um antimicrobiano ou aplicação de programas de qualidade.

1.3 *L. monocytogenes*

Listeria spp*.* são micro-organismos catalase positiva e oxidase negativa, apresentando colônias arredondadas, translúcidas, convexas e de bordas regulares em ágar nutriente. Apresentam coloração cinza azulada pela iluminação normal e produzem um brilho verde azulado característico quando a luz é transmitida obliquamente, após 24h-48h de incubação (ROUCORT; BUCHIESER, 2007).

Apresentam-se na forma de bastonetes curtos, com, aproximadamente, 0,4-0,5µm de diâmetro e 1-2µm de comprimento. (VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001).

O gênero *Listeria* é, atualmente, composto por dezessete espécies*: L. monocytogenes, L. ivanovii, L. seeligeri, L. innocua, L. welshimeri, L. grayi, L. marthii, L. rocourtiae, L. fleischmannii, e L. weihenstephanensis.* Recentemente foram isoladas mais 7 espécies do ambiente: *L. floridensis, L. aquatica, L. cornellensis, L. riparia, L. grandensis, L. booriae e L. newyorkensis (*BAKKER *et al.,* 2014)*.* Dentre estas espécies, somente duas, são potencialmente patogênicas: *L. monocytogenes* para humanos e animais e *L. ivanovii* para animais (BHUNIA, 2008, ZUNABOVIC *et al.*, 2011).

L. monocytogenes é um bacilo Gram-positivo, não produtor de esporos nem de cápsula, móvel a 25ºC, anaeróbico facultativo, fermentador de glicose e capaz de se desenvolver numa faixa de temperatura entre 0,5ºC a 45ºC, suportando uma variação de pH entre 4,3 e 9,8, atividade de água 0,91 e concentração de sal até 20% (WARRINER e NAMVAR, 2009; JIANG *et al.*, 2008). Os parâmetros de multiplicação desse micro-organismo podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1 Parâmetros de multiplicação de *L. monocytogenes*

Parâmetros	Mínimo	Ótimo	Máximo
Temperatura (ºC)	-0,4	37	45
pH	4,4	7,0	9,6
Tolerância a sal	-	10%	25% a 4ºC
Atividade de água	0,92	0,97	0,97

Fonte: adaptada de Wan Norhana *et al.*, 2010.

A identificação e diferenciação entre as espécies de *Listeria* baseiam-se em testes de fermentação de carboidratos (manitol, xilose, ramnose e dextrose), produção de β-hemólise em ágar sangue, e presença de motilidade em forma de guarda-chuva (FARBER; PETERKIN, 1991). Essas características estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 Características fenotípicas de seis espécies de *Listeria*

Características	*L. Monocytogenes*	*L. innocua*	*L. ivanovii*	*L. welshimeri*	*L. seeligeri*	*L. Grayi*
B-hemólise	+	-	+	-	+	-
Ramnose	+	*V*	-	*V*	-	-
Xilose	-	-	+	+	+	
Manitol	-	+	-	+	-	
Dextrose	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+
Motilidade	+	+	+	_	+	

Fonte: adaptada de Silva *et al.*, 2004. +=positivo, -=negativo, v=variável

L. monocytogenes é uma bactéria que pode contaminar o homem, principalmente através dos alimentos, podendo causar gastroenterite leve, infecções graves ou aborto, dependendo da susceptibilidade do hospedeiro. É um patógeno oportunista que causa a listeriose, uma doença de origem alimentar grave (IBARRECHE *et al.*, 2014; ALENBERGER, 2010), cuja taxa de letalidade pode atingir 30% (CDC, 2015).

A dose mínima necessária para a bactéria causar infecção clínica em seres humanos ainda não foi determinada, no entanto, o número de células de *L. monocytogenes* detectado em alimentos responsáveis por surtos e casos esporádicos de listeriose (em torno de 10^6 UFC mL^{-1}), sugere que seja elevada (TORRES *et al*., 2005).

A listeriose é considerada uma doença alimentar atípica devido a sua gravidade, sua natureza não entérica e seu longo período de incubação. É transmitida através de alimentos contaminados, afetando, principalmente, indivíduos imunocomprometidos, idosos, grávidas e recém-nascidos (LUBER *et al.*, 2011). No entanto, há relatos de sintomas gastrointestinais, acompanhados de febre, em indivíduos sadios (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

A incidência média anual de listeriose em 2013 foi de 0,26 casos por 100.000 habitantes nos EUA. Estima-se que 1600 casos de listeriose e 260 mortes ocorrem anualmente naquele país (CDC, 2014).

No Brasil, são escassos os dados sobre a ocorrência de listeriose e, nos poucos relatos que existem, não são relacionados ao consumo de alimentos contaminados (DESTRO, 2014). Além disso, a pesquisa de *L. monocytogenes* não está incluída nas análises de rotina dos alimentos, subestimando-se a ocorrência deste micro-organismo no Brasil (BARROS *et al.*, 2007).

Os parâmetros estabelecidos para *Beef Jerky* no Brasil são estabelecidos somente para produtos destinados a exportação, onde deve haver ausência em 25g no produto final e tolerância de 100 $UFC.g^{-1}$ durante o prazo de validade total do produto (CARRASCO *et al.*, 2007). A Inspeção Federal deve encaminhar amostras do alimento a laboratórios oficiais para a pesquisa de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*, bem como para a determinação da atividade de água e da relação umidade/proteína, com frequência de uma amostra por mês (BRASIL, 2011). Na RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, não existe parâmetro estabelecido para *L. monocytogenes* nesse tipo de produto.

1.4 Fontes de contaminação na indústria

L. monocytogenes encontra condições favoráveis para se manter e se multiplicar em pisos, ralos e equipamentos no interior das instalações das indústrias de alimentos, assim como nas salas refrigeradas onde, por ser psicrotrófica,

consegue se multiplicar. Isolados de *L. monocytogenes* têm sido recorrentemente encontrados nas superfícies de indústrias de alimentos, principalmente em locais refrigerados, ainda que estes sejam rotineiramente limpos e desinfetados (CARPENTIER & CEF, 2011), o que torna a contaminação cruzada entre superfícies e produto final, uma grande preocupação para a indústria de processamento (CARBALLO & ARAÚJO, 2012).

Muitos isolados têm a capacidade de resistir a compostos usados para inibir a multiplicação microbiana, como ácidos orgânicos, antioxidantes, nitrito de sódio, especiarias e ervas (TODD & NOTERMANS, 2011).

L. monocytogenes é, frequentemente, encontrada em alimentos e instalações de processamento, onde pode se multiplicar na forma de biofilmes em equipamentos de processamento ou em tubulações (VEEN *&* ABEE*,* 2011). Os biofilmes, que são definidos como comunidades estruturadas de micro-organismos que são ligados a uma superfície, são geralmente mais resistentes a antimicrobianos e desinfetantes do que as células planctônicas podendo, portanto, agir como uma fonte de contaminação dos alimentos, *in natura* ou processados. A formação de biofilme deve-se a falhas no processo de higienização (OLIVEIRA, 2013).

Formar biofilmes em superfícies de contato com alimentos tais como poliestireno, vidro e aço inoxidável, e persistir por longos períodos, é uma característica importante deste micro-organismo (IBARRECHE *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Evidências epidemiológicas indicam que os produtos alimentares que apresentam o maior risco para a listeriose são aqueles que apresentam longa vida útil sob refrigeração e estão prontos para consumo. Em geral, a contaminação de produtos à base de carne ocorre através de ingredientes e ambiente contaminados (BERSOT *et al.*, 2008).

Os produtos prontos para consumo são a grande preocupação quanto à multiplicação de *L. monocytogenes.* Nessa categoria, se enquadram, por exemplo, muitos queijos, saladas, defumados de peixe, sanduíches, produtos de carne processada, especialmente com menor teor de sal, e *snacks* de carne. O conhecimento do pH e atividade de água do produto é essencial para os fabricantes, de forma a evitar a multiplicação desse patógeno (LUBER *et al.*, 2011).

Conforme Uhitil *et al.* (2004), a eliminação desse micro-organismo dos ambientes de produção de alimentos é difícil, portanto, para a garantia da inocuidade são muito importantes os programas de HACCP, tanto na produção, quanto na

aquisição de ingredientes e matéria-prima. A implantação do Programa Sentinela, em indústrias de produção de produtos prontos para consumo, também contribui para melhores condições sanitárias no ambiente de produção, cumprindo assim, com o acordo sanitário para exportação de *Beef Jerky* produzido no Brasil (MAPA, 2005).

1.5 Métodos de detecção

Os métodos de imunoensaios baseiam-se na afinidade da ligação natural dos anticorpos com antígeno, a fim de obter resultados rápidos e confiáveis. Dentre esses métodos, destaca-se o sistema VIDAS® (bioMérieux) Vitek Immuno Assay Diagnostic System, que funciona por meio da adição de marcadores fluorescentes para anticorpos. No entanto, desvantagens da imunodetecção também existem, tais como as quantidades necessárias de amostras, as quantidades de resíduos produzidos, a disponibilidade de antígenos puros, a utilização de produtos químicos caros, tempo de enriquecimento longo ou a necessidade de equipamentos especializados (ZUNABOVIC *et al.*, 2011).

O Mini Vidas® bioMérieux (Manual de utilização Mini Vidas® versão 5.6.0, 2012) detecta mudanças químicas em uma cubeta óptica especializada, montada no final de cada tira do reagente, na qual a fluorescência do substrato é medida. Terminado o teste, os resultados são analisados automaticamente pelo aparelho, que fornece um valor para cada amostra. Este valor é comparado com referências internas (limiares) e cada resultado é interpretado como positivo ou negativo.

As culturas são enriquecidas para alcançar densidade celular de 10^4 UFC. mL^{-1}, necessária para a detecção pelo método ELFA (Enzime Linked Fluorescent Assay). A precisão dos resultados positivos foi de 97% em estudo realizado por Churchill *et al*. (2006), com falso positivo e negativo de 1,9% e 3,0%, respectivamente.

Métodos moleculares são, atualmente, usados para detecção de patógenos, como *L. monocytogenes,* em diversos tipos de alimento e em amostras provenientes de ambiente de indústria de alimentos (ZUNABOVIC *et al*., 2011). Grande parte deles é baseado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), uma técnica altamente específica, que pode identificar com precisão um DNA alvo (RODRIGUEZ-LÁZARO *et al*., 2005).

Embora os métodos convencionais, dependentes de cultura bacteriana, permaneçam aceitos, sua combinação com técnicas moleculares, permite obter resultados mais precisos e mais rápidos (ZUNABOVIC *et al*., 2011). Diversos conjuntos de *primers* têm sido utilizados para a detecção de *L. monocytogenes,* bem como para a caracterização de seu potencial de virulência. Entre os genes mais utilizados para essa finalidade, se destacam os genes das internalinas (BUBERT, 1999). A amplificação do gene da internalina A (*inlA)* tem sido utilizada para a identificação de *L. monocytogenes* em nível de espécie, e os genes das internalinas C e J (*inlC e inlJ)*, como marcadores de virulência dos isolados (LIU *et al*., 2007).

Capítulo 1 – Manuscrito: Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em linha de processamento de *Beef Jerky* no Brasil

Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em linha de processamento de *Beef Jerky* no Brasil

Coradini, Márcia Goulart Lopes[a]; Volcan, Darla[a]; Iglesias, Mariana Almeida[a], Duval,Eduarda Hallal[a], Silva, Wladimir Padilha[a].

[a] *Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel-Universidade Federal de Pelotas, RS-Brasil.*

(Food Science and Tecnology)

Resumo: O *Beef Jerky* é um produto cárneo produzido através de processo térmico, que não necessita de refrigeração no ponto de venda, trazendo praticidade ao consumidor. Entretanto, por ser um alimento pronto para o consumo, deve-se garantir sua segurança. Uma das bactérias patogênicas que, uma vez presente nesse tipo de alimento, pode causar danos à saúde dos consumidores, é *Listeria monocytogenes.* O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de *L. monocytogenes* em uma linha de produção de *Beef Jerky* localizada no município de Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil. Foram realizadas 7 coletas, avaliando-se 12 pontos (matéria-prima, superfícies com e sem contato com o produto, produto final) ao longo da linha de processamento. As amostras foram analisadas no equipamento Mini Vidas® bioMérieux e, aquelas que apresentaram resultado positivo para *L. monocytogenes*, foram submetidas a PCR utilizando-se o gene *prs* para confirmação de gênero e os genes *inlA*, *inlC* e *inJ*, para confirmação da espécie *L. monocytogenes.* A ocorrência global de *L. monocytogenes* foi de 7,14%, sendo 21,42% em superfícies sem contato com produto, 1,78% em superfícies de contato com produto, e 28,57% na matéria-prima, entretanto, não se identificou o patógeno no produto final. Observa-se que a matéria-prima é uma importante fonte de contaminação e introdução de *L. monocytogenes* na indústria produtora de *Beef Jerky* e que a contaminação por esse micro-organismo em superfícies de contato e sem contato com o alimento, reforça a importância dos programas de higienização como forma de evitar contaminação cruzada para o produto final. Entretanto, como o produto final (*Beef jerky*) não apresentou contaminação por *L. monocytogenes*, as etapas do processo de produção que envolvem barreiras à multiplicação de patógenos e morte microbiana, foram efetivas no controle do patógeno.

Palavra chave: produto seco curado; PCR*;* cepas persistentes; Mini Vidas®, genes de virulência

Occurrence of *Listeria monocytogenes* in *Beef Jerky* processing line in Brazil

Coradini, Márcia Goulart Lopes[a]; Volcan, Darla[a]; Iglesias, Mariana Almeida[a], Duval, Eduarda Hallal[a], Silva, Wladimir Padilha[a].

[a] *Department of Science and Agroindustrial Technology, Food Microbiology Laboratory, Faculty of Agronomy Eliseu Maciel - Federal University of Pelotas, Brazil - Brazil.*

Abstract: The *Beef Jerky* is a meat product produced by thermal process that does not require refrigeration at point of sale, ensuring the practicality of consumption. However, being a ready to eat food, should ensure its security and one of pathogenic bacteria that, once present, can harm the health of consumers is *Listeria monocytogenes.* The objective of this research was to identify the occurrence of *L. monocytogenes* in a *Beef Jerky* production line located in the municipality of Bage, Brazil. We evaluated 12 points along the processing line s samples were analyzed on the Mini VIDAS® bioMerieux, and those that were positive for *L. monocytogenes,* were subjected to PCR using the *prs* gene to confirm genus and genes *inlA* , *inLC and inlJ* to confirm the species *L. monocytogenes*. A occurrence overall of *L. monocytogenes* was 7.14% and 21.42% on surfaces without contact with product, 1.78% on product contact surfaces, and 28.57% in the raw material, however, did not identify the pathogen in the final product. It is observed that the raw material is a major source of contamination and introduction of *L. monocytogenes* in producer *Beef Jerky* industry and the contamination by that micro-organism contact surfaces without contact with food, reinforces the importance of cleaning programs in order to avoid cross-contamination of the final product. However, since the final product (*beef jerky)* showed no contamination by *L. monocytogenes*, the steps of the production process involving barriers to multiplication of pathogens and microbial death, were effective in pathogen control.

Keyword: dry cured product; PCR; persistent strains; Mini Vidas®, virulence genes

1. INTRODUÇÃO

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) brasileiro destacou, no seu último relatório de projeções para o consumo de carne bovina, que ocorrerá um crescimento de 3,6% ao ano entre 2013 e 2023, e que as exportações devem situar-se numa média de crescimento de 2,5% ao ano (MAPA, 2013). Esse fato faz com que as indústrias invistam em melhorias tecnológicas e sanitárias para acompanhar o crescimento projetado. Além disso, a busca pela diversificação de produtos faz com que surjam novos produtos prontos para consumo, que facilitam a vida da população, mas que, por não sofrerem processo térmico imediatamente antes do consumo, podem ser um perigo à saúde do consumidor.

Dentre os alimentos prontos para consumo está o *Beef Jerky*, um produto cárneo, curado, termicamente processado e seco, com atividade de água (A_a) abaixo de 0,80, que não necessita de refrigeração durante seu armazenamento. No entanto, o estabelecimento produtor deve aplicar um programa de qualidade para controlar, reduzir ou eliminar os perigos biológicos identificados na análise de perigos (MAPA, 2005, BUEGE *et al.*, 2006).

Um dos perigos biológicos de grande preocupação para as indústrias produtoras de alimentos é *L. monocytogenes*, uma bactéria veiculada principalmente por alimentos, que ocasiona a listeriose, a qual pode cursar com encefalites, septicemia, meningites e abortos (ALLERGERGUER & WAGNER, 2010). Os principais alimentos ligados a surtos de listeriose são os prontos para consumo (TODD e NOTERMANS, 2011). Essa bactéria é, frequentemente, encontrada em superfícies de equipamentos e utensílios utilizados em indústrias de alimentos e, pelo fato de ser psicrotrófica, consegue sobreviver e até se multiplicar em ambientes refrigerados, mesmo estes sendo rotineiramente limpos e desinfetados (CARPENTIER E CERF, 2011). Além disso, sua capacidade de formar biofilmes em superfícies abióticas contribui para contaminação do produto final durante a produção, pois estudos demonstram a capacidade destas bactérias em sobreviver e se multiplicar por anos no ambiente da indústria (OLIVEIRA *et al.*, 2010; DI CICCIO *et al.*, 2012).

Tendo em vista a importância para a saúde pública da contaminação por *L. monocytogenes* em produtos prontos para consumo, este estudo teve como objetivo, avaliar a ocorrência desse patógeno durante o processo de produção de *Beef Jerky*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coletas e pontos de amostragem

Foram realizadas sete coletas em uma indústria de processamento de *Beef Jerky* localizada na cidade de Bagé, RS, Brasil, durante o ano de 2014, nas quais foram amostrados 12 pontos por coleta, descritos na Figura 1.

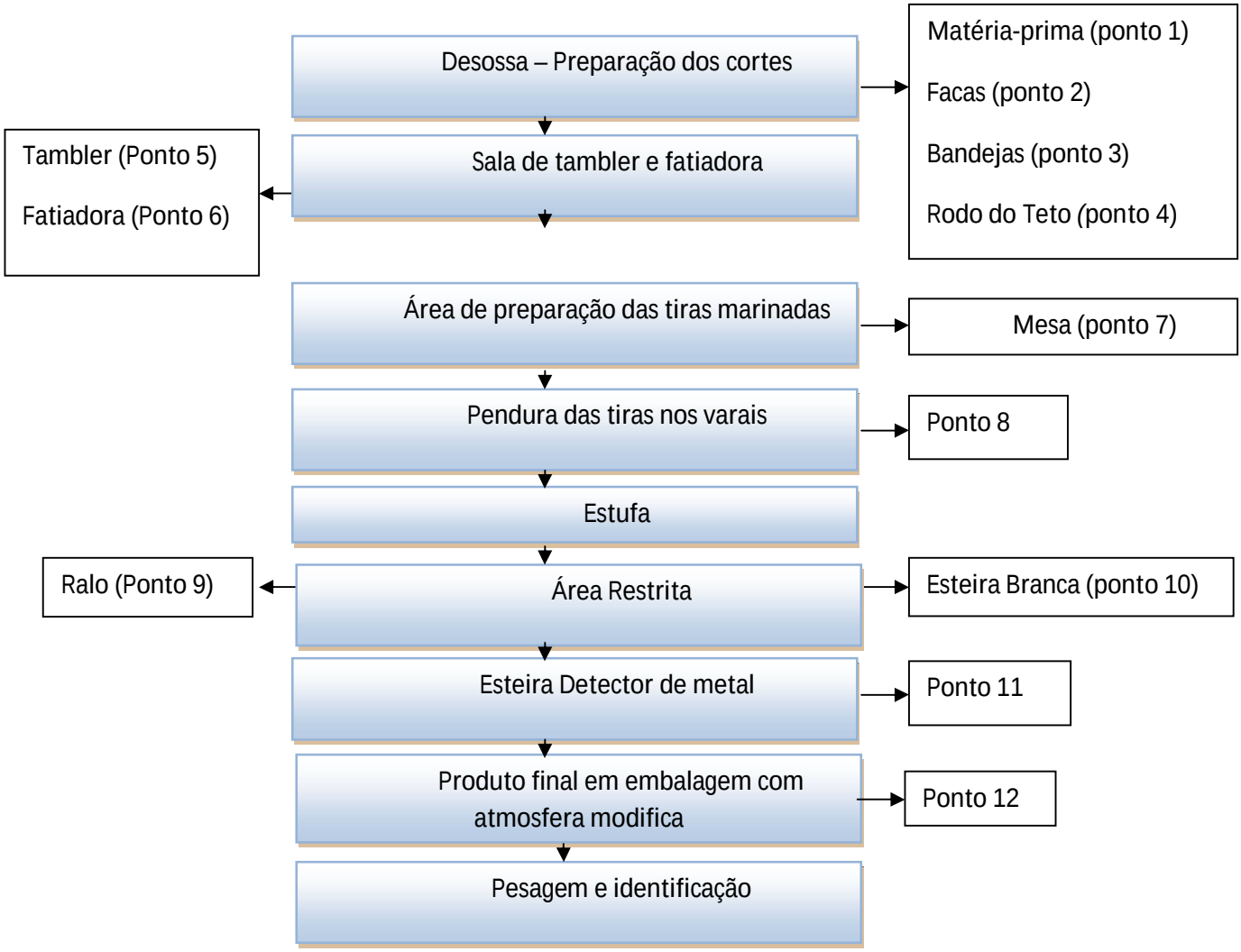

Figura 1 Representação esquemática da linha de produção de *Beef Jerky*, indicando os pontos de coleta de amostras

2.1.1 Amostras de superfícies

A amostragem foi realizada com *swab* 3M™, utilizando-se um molde de inox esterilizado, medindo 100 cm², para delimitar a área de amostragem.

2.1.2 Amostras de matéria-prima e produto final

Foram coletadas 25g de matéria-prima utilizada no setor de desossa, as quais foram armazenadas em saquetas esterilizadas 3M™, acondicionadas em caixas contendo gelo, e conduzidas ao Laboratório de Microbiologia da empresa;

As amostras do produto final (*Beef Jerky*) eram transportadas na embalagem com atmosfera modificada e analisadas no Laboratório de Microbiologia da empresa.

2.2 Identificação de *L. monocytogenes* pelo Mini Vidas® bioMérieux

As amostras provenientes de cada ponto de amostragem foram avaliadas pelo equipamento Mini Vidas® bioMérieux- Essentials-Version 001-15. As etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento foram realizadas segundo as instruções do fabricante. Para a detecção de *L. monocytogenes*, utilizou-se o programa e os reagentes específicos para esse micro-organismo, estabelecidos no método.

2.3 Isolamento e caracterização de *Listeria* spp. por métodos convencionais

Todas as amostras com resultado positivo no Mini Vidas® foram armazenadas em meio de enriquecimento Fraser (bioMérieux®), e mantidas refrigeradas na indústria até o momento do transporte.

No Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas, as amostras foram semeadas em caldo Triptona de Soja (TSB, Acumedia) suplementado com extrato de levedura (Acumedia) 0,6% (TSB-YE) e incubadas por 24h a 37ºC, para posterior semeadura em meios específicos para o isolamento de *Listeria* spp. Uma alíquota do meio TSB-YE foi transferida, pela técnica de plaqueamento em superfície, para placas de Petri contendo ágar Oxford (Oxoid) e ágar Cromogênio (Oxoid). As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas.

2.3.1 Seleção e purificação das colônias suspeitas de *Listeria* spp.

Três colônias típicas de *Listeria* spp. de cada placa de Petri foram selecionadas e semeadas em ágar Tripticase de Soja (TSA, Acumedia), suplementado com extrato de levedura (Acumedia) 0,6% (TSA-YE), e incubadas a 37°C por 24 horas.

Como controle positivo, utilizou-se a cepa *L. monocytogenes* ATCC 7644.

2.4 Caracterização molecular

A partir do crescimento em TSA-YE, realizou-se a extração do DNA cromossomal, para a identificação em nível de gênero e espécie.

2.4.1 Extração de DNA

A extração de DNA dos isolados de *L. monocytogenes*, bem como das cepas padrão *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, foi realizada de acordo com o protocolo de Extração por Pérolas de Vidro, proposto por Sambrook e Russell (2001), com modificações.

Primeiramente, realizou-se o cultivo dos isolados de *L. monocytogenes* e das cepas padrão em TSA-YE e incubou-se a 37ºC por 24h. Após, os cultivos foram transferidos para 5mL de TSB-YE, e incubou-se a 37ºC, por 24 horas. Posteriormente, transferiu-se 1 mL de cada cultivo para microtubos, os quais foram centrifugados a 13.000 rpm por 3 min. Em seguida, o *pellet* foi suspendido com 100µL de STES ([Tris-HCl 0,2M; NaCl 0,5M; SDS 0,1%; EDTA 0,01M; pH 7,6), acrescido de pérolas de vidro e de 150µL de fenol-clorofórmio 1:1, e agitou-se em vortex por um minuto.

O material intracelular foi separado por centrifugação a 15.500 rpm por 15 min e transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo. A precipitação do DNA foi realizada com etanol absoluto a 4ºC e cloreto de sódio 5M, com manutenção a -20ºC por uma hora. Após este período, foi realizada nova centrifugação, a 15.500 rpm por 20 minutos. Para aumentar a pureza do material extraído, lavou-se o *pellet* com álcool etílico 70%, descartou-se o sobrenadante, e colocou-se para secar em estufa a temperatura de 37 ºC até evaporação completa do álcool. Após, suspendeu-se o *pellet* em 35µL de água ultrapura esterilizada e 1µL de RNAse. Todas as amostras de DNA foram submetidas à quantificação em NanoVue™ Plus, seguida da amplificação por PCR.

2.4.2 PCR

Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores visando a confirmação do gênero *Listeria* (gene *prs*) e da espécie *L. monocytogenes* (genes *inlA, inlC* e *inlJ*). Esses oligonucleotídeos foram sintetizados pela Eurofins®, e as sequências dos pares de bases, assim como o tamanho do produto e a referência, estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados e tamanho dos fragmentos estimados para detecção dos genes *prs, inlA, inlC* e *inlJ* em isolados de *L. monocytogenes*

Genes	Sequência (5'- 3')	Tamanho do fragmento amplificado (pb)	Referência
inlA-F	ACGAGTAACGGGACAATGC	800	Liu *et al.*, 2007
inlA-R	CCCGACAGTGGTGCTAGATT		
inlC-F	TGGGAGAGTAACCCAACCAC	517	Liu *et al.*, 2007
inlC-R	GTTGACCTTCGATGGTTGCT		
inlJ-F	TGTAACCCCGCTTACACAGTT	238	Liu *et al.*, 2007
inlJ-R	AGCGGCTTGGCAGTCTAATA		
prs-F	GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG		
prs-R	CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG	370	Doumith *et al.*, 2004

A amplificação por PCR foi realizada em um volume de 25µL utilizando-se 12,5µL de Go taq® Green Master Mix (Promega®), 25 pmol de cada iniciador e 10ng (2 µL) de DNA molde. Uma mistura de reação sem DNA molde foi incluída como controle negativo. O programa para PCR foi realizado em termociclador (Bioer®) e consistiu, para o gene *prs*, de 1 x 94ºC por 2 minutos, 35 x 94ºC por 40 segundos, 60,8ºC por 1 minuto e 15 segundos, 72ºC por 1 minuto e 15 segundos e 1 x 72ºC por 7 minutos. Para os genes das internalinas (*inl*A, *inlC* e *inlJ*) utilizou-se uma mPCR e o programa consistiu de 1 x 94ºC por 2 minutos, 30 x 94ºC por 20 segundos, 55ºC por 20 segundos e 72ºC por 50 segundos, e 1 x 72ºC por 2 minutos.

Depois de completados todos os ciclos, os produtos gerados nas PCR foram submetidos à eletroforese a 80V por uma hora em gel de agarose 1,5%. Os produtos amplificados foram corados com GelRed™ e visualizados em transiluminador (Loccus®).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ocorrência global de *L. monocytogenes* em planta de processamento de *Beef Jerky*

Alimentos prontos para consumo, como o *Beef Jerky*, necessitam de uma maior atenção com relação à possibilidade de contaminação cruzada durante o processamento, já que esses têm sido implicados como veículos de doenças transmitidas por alimentos (WAN NORHANA *et al.*, 2010 e LUBER *et al.*,2011).

Levando-se em consideração que o contato do produto com superfícies de equipamentos, instalações e utensílios de trabalho são importantes fontes de contaminação cruzada (BARROS *et al.*, 2007), as indústrias que produzem alimentos prontos para o consumo necessitam garantir a segurança do produto final. Entre as ferramentas utilizadas para essa finalidade, encontram-se as análises microbiológicas. Nesse aspecto, os métodos rápidos, como o Mini Vidas®, têm sido utilizados por indústrias de alimentos pela redução de trabalho e pela velocidade dos resultados.

Neste estudo, utilizou-se o Mini Vidas® para avaliar a presença de *L. monocytogenes* em 12 pontos de amostragem em uma linha de produção de *Beef Jerky*, cujos resultados estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4: Presença de *L. monocytogenes* em uma linha de produção de *Beef Jerky* avaliada pelo Mini Vidas® bioMérieux

Ponto de amostragem	1ª Coleta	2ª Coleta	3ª Coleta	4ª Coleta	5ª Coleta	6ª Coleta	7ª Coleta
1-Matéria-prima	+	+	-	-	-	-	-
2-Facas	-	-	-	-	-	-	-
3-Bandeja	-	-	-	-	-	-	-
4-Rodo de secagem teto	+	+	-	-	-	-	-
5-Tambler	-	-	-	-	-	-	-
6-Fatiadora	-	-	-	-	-	-	-
7-Mesa de produto *in natura*	+	-	-	-	-	-	-
8-Varal de Pendura	-	-	-	-	-	-	-
9-Ralo ar[1]	+	-	-	-	-	-	-
10-Esteira branca[1]	-	-	-	-	-	-	-
11-Esteira do detector de metal[1]	-	-	-	-	-	-	-
12-*Beef jerky*	-	-	-	-	-	-	-

1-Área restrita +: positivo -: negativo

O Mini Vidas® é um método automatizado que se baseia em reações imunoenzimáticas, não havendo isolamento do micro-organismo. Dessa forma, nas amostras que apresentaram resultado positivo para *L. monocytogenes* no Mini Vidas®, realizou-se o isolamento microbiano em meios específicos para *Listeria* spp. e, a partir de colônias típicas, realizou-se análise molecular para confirmação da identidade dos isolados. Utilizou-se o gene *prs* para identificação do gênero *Listeria* (DOUMITH *et al*., 2004) e os genes *inlA, inlC* e *inlJ* para identificação de *L. monocytogenes*, os quais são marcadores espécie específicos, para a identificação e confirmação em nível de espécie (LIU *et al*., 2007).

Os resultados obtidos para a detecção de *L. monocytogenes* pelo Mini Vidas® e por PCR, estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados obtidos pelo Mini Vidas® e por PCR para presença de *L. monocytogenes* em planta de processamento de *Beef Jerky*

Coleta	Ponto de amostragem	Mini Vidas® (bioMérieux)	Isolado	PCR
1ª	Mesas com esteiras	+	2	+
1ª	Ralo	+	3	+
1ª	Rodo	+	4	+
1ª	Matéria-prima	+	5	+
2ª	Rodo	+	6	+
2ª	Matéria-prima	+	7	+

Observa-se que os isolados 2, 3, 4, 5, 6 e 7 amplificaram os genes de virulência utilizados como marcadores espécie-específicos (Figura 02), portanto, foram confirmados como *L. monocytogenes*.

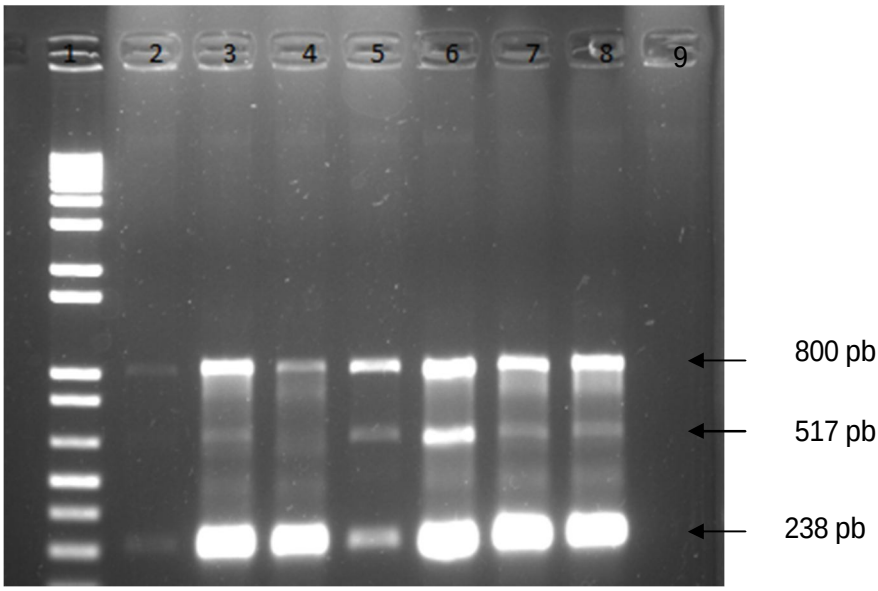

Figura 2 - Produtos da amplificação dos genes *inlA* (800 pb), *inlC* (517pb) e *inlJ* (238 pb). Coluna 1: marcador de peso molecular 1kb; Coluna 2 a 7: *L.monocytogenes* isoladas da planta de processamento de *Beef Jerky;* Coluna 8: *L. monocytogenes* ATCC 7644;Coluna 9: controle negativo da reação.

Aznar & Solis (2006) também avaliaram a presença de *L. monocytogenes* pelo Mini Vidas® e por PCR, e verificaram que a técnica molecular foi mais precisa e eficaz para a detecção desse micro-organismo, entretanto, neste estudo, os resultados obtidos no Mini Vidas® e na PCR foram similares, o que ressalta a utilidade do Mini Vidas® para o controle de qualidade da indústria, devido à produção de resultados rápidos e seguros.

Na Tabela 6 é apresentada a ocorrência de *L. monocytogenes*, considerando-se a identificação molecular dos isolados.

Tabela 6: Ocorrência de *L. monocytogenes* em planta de processamento de *Beef Jerky*

	Coletas							
Amostras								**Total**
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	
Superfície SCA[1]	**2/2**	**1/ 2**	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	**3/14 (21,42%)**
Superfície CCA[2]	**1/8**	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	**1/56 (1,78%)**
Matéria-prima	**1/1**	**1/1**	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	**2/7 (28,57%)**
Beef jerky	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	**0/7 (0%)**
Total	**4/12**	**2/12**	**0/12**	**0/12**	**0/12**	**0/1**	**0/12**	**6/84**
	33,33%	**16,66%**	**0%**	**0%**	**0%**	**0%**	**0%**	**7,14%**

1-Superfície sem contato com alimento 2-Superfície com contato com alimento

A ocorrência global de *L. monocytogenes* foi de 7,14% (6/84). Não há outro estudo no Brasil avaliando a contaminação da linha de produção de *Beef Jerky* por *L. monocytogenes*. Entretanto, comparando-se com relatos de monitoramento desse micro-organismo em plantas de processamento de alimentos de origem animal, verifica-se que a ocorrência de *L. monocytogenes* encontrada neste estudo foi mais baixa. Como exemplos, citam-se os trabalhos de Von Laer *et al.* (2009), que avaliaram uma linha de processamento de linguiça mista frescal situada na mesma região geográfica do Rio Grande do Sul, e encontraram *L. monocytogenes* em 25% das amostras. Nalerio *et al.* (2009), também nesta mesma região, relatam que 12,7% das amostras coletadas na linha de abate de um abatedouro de frangos apresentaram contaminação por esse patógeno. Já Barros *et al.* (2007), identificaram no estado do Paraná, 13,2% de contaminação por *L. monocytogenes* em estabelecimento processador de carne.

L. monocytogenes foi isolada apenas nas duas primeiras coletas. Ressalta-se que entre as coletas 2 e 3 ocorreu uma parada de 4 meses para a realização de um processo de higienização do setor de produção de *Beef Jerky*, o que pode ter contribuído para a redução do patógeno no ambiente, tanto pela não reintrodução de novos micro-organismos, quanto pela ausência de fontes de nutrientes orgânicos. A redução da população microbiana do ambiente e a obtenção de resultados negativos após período de manutenção da planta de processamento são resultados desejados pelas recomendações do *Codex Alimentarius*, descritas por Luber (2011).

3.2 Ocorrência de *L. monocytogenes* na matéria-prima

A matéria-prima (carne bovina) apresentou 28,57% (2/7) de contaminação por *L. monocytogenes*, o que é um resultado preocupante, tendo em vista a possibilidade de contaminação cruzada, tanto para superfícies, quanto para manipuladores e produto final. Silva *et al.* (2004) avaliaram a matéria-prima utilizada para a produção de linguiça mista frescal, na mesma região avaliada neste estudo, e encontraram *L. monocytogenes* em 29,4% das amostras, semelhante ao obtido neste trabalho. Esses resultados demonstram a importância da seleção adequada dos fornecedores (DAELMAN *et al.*, 2013) e de um maior controle microbiológico sobre a matéria-prima utilizada para a fabricação de derivados cárneos, especialmente naqueles que serão comercializados já prontos para o consumo (TODD & NOTERMANS, 2011), como o *Beef Jerky*.

3.3 Ocorrência de *L. monocytogenes* em superfícies que entram em contato com produto

A contaminação por *L. monocytogenes* em superfícies que entram em contato com o produto foi de 1,78% (1/56). A amostra que apresentou contaminação foi a mesa com esteira rolante (primeira coleta), na área de manipulação das tiras marinadas, cujo ambiente é mantido a temperatura média de 10°C. Esse resultado é semelhante ao de Daelman *et al.* (2013), os quais encontraram contaminação por esse patógeno em 1,8% das amostras de superfícies que entram em contato com alimento, também situadas em área refrigerada da planta de processamento.

Ressalta-se que o índice de contaminação de superfícies que entram em contato com alimentos por *L. monocytogenes* é bastante controverso nos diferentes estudos, pois dependem de diversas variáveis, como estrutura da planta, implantação e execução de programas de qualidade dentro da indústria, etc. Por exemplo, Nalério *et al.* (2009) encontraram 29,2% de contaminação por *L. monocytogenes* em superfície de contato com alimento em um abatedouro de frangos, enquanto Barros *et al.* (2007) observaram 9,7% em uma indústria de carnes, e Meloni *et al.* (2014), 6% em uma planta de processamento de um embutido fermentado.

3.4 Ocorrência de *L. monocytogenes* em superfícies sem contato com produto

Com relação às superfícies que não entram em contato com produto, observou-se a presença de *L. monocytogenes* em três amostras (21, 42%), sendo duas provenientes do rodo de secagem do teto da desossa e uma do ralo da área restrita. Os resultados obtidos neste estudo são superiores aos de Chiarini (2007), que encontraram 16,4% de contaminação por *L. monocytogenes* em superfícies sem contato com produto, numa linha de abate de frangos no interior de São Paulo.

As duas amostras provenientes do rodo foram obtidas em diferentes coletas, demonstrando a importância do controle desses pontos de contaminação. Além disso, presença de *L. monocytogenes* no mesmo ponto de amostragem durante duas coletas é um resultado relevante, tendo em vista que existem cepas que se tornam persistentes em plantas de processamento, podendo se manter por anos no ambiente da indústria e ocasionar contaminação recorrente do produto final (WARRINER e NAMVAR, 2009). Já a presença de *L. monocytogenes* no ralo da área restrita confirma que ralos/drenos, pisos, tubulações em

curva e sistema de ar podem ser reservatórios e fontes de contaminação desse micro-organismo para o produto final (MELONI et al., 2012 e DI CICCIO et al. 2012).

Salienta-se que o ralo onde *L. monocytogenes* foi isolada estava incluído no programa sentinela de controle de *Listeria* spp (MAPA, 2011), no qual é utilizado um sachê de quaternário de amônia, o que pode ter promovido a seleção de isolados resistentes a este desinfetante pela utilização de concentrações sub letais, conforme descrito por Aase et al. (2000) e Ramanova et al. (2002).

Embora as superfícies onde foi isolado o patógeno não tenham contato direto com o alimento, podem ser fontes de contaminação para o produto final ou favorecer a persistência do micro-organismo no ambiente da planta de processamento. Segundo Carpentier & Cef (2011), a persistência de *L. monocytogenes* em plantas de processamento de alimentos está fortemente relacionada com a dificuldade de higienização em locais onde estes micro-organismos se alojam, bem como a sua capacidade de se multiplicar em temperaturas baixas, o que pôde ser observado neste estudo, onde houve a presença de *L. monocytogenes* em duas amostragens consecutivas do rodo que realiza a secagem da condensação do teto da desossa, a qual é mantida a temperatura média de 10ºC.

Recentemente, ocorreu um surto de listeriose pelo consumo de maçãs caramelizadas pré-embaladas (CDC, 2015), no qual a principal fonte de contaminação foi o ambiente de processamento, evidenciando a importância da implantação e execução de programas de qualidade dentro das indústrias, como BPF (Boas práticas de fabricação), POP (Procedimento operacional padronizado), HACCP (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle), monitoramento da qualidade higiênica das superfícies e Programa Sentinela para *Listeria* spp. (MAPA, 2011), os quais garantem a qualidade microbiológica e a segurança do produto (WARRINER E NAMVAR, 2009).

As medidas de controle e prevenção para evitar a contaminação por *L. monocytogenes* entre superfícies e produto devem estar padronizadas nas indústrias que produzem alimentos prontos para consumo (LUBER *et al.*, 2011). Salienta-se que a planta processadora de *Beef Jerky* avaliada neste estudo segue as recomendações da USDA/FSIS (2014) e do MAPA (2011) quanto à implantação de programas de monitoramento, controle e prevenção.

3.5 Ocorrência de *L. monocytogenes* no produto final (*Beef Jerky*)

Não foi constatada contaminação por *L. monocytogenes* no produto final, o que também foi verificado por Harrison *et al*. (2006), Getty *et al*. (2006), Roberts *et al.* (2007) e

Porto Feet *et al.* (2008), demonstrando a eficácia do processo de letalidade ao qual esse alimento é submetido. As barreiras formadas pela temperatura (82,2 ºC), tempo adequado (aproximadamente 3 horas), somadas a umidade relativa do ar, marinação e redução da atividade de água (inferior a 0,80), garantiram um produto final com qualidade sanitária satisfatória e seguro ao consumidor. Além disso, a utilização de ácidos orgânicos, nitrito e especiarias, auxilia no processo de redução microbiana, tendo em vista que todos esses componentes formam barreiras impedindo a multiplicação de micro-organismos (FREITAS DE MACEDO *et al.*, 2013). Isso foi observado neste estudo, tendo em vista que embora se tenha isolado *L. monocytogenes* na matéria-prima (28,57%) e em superfícies dentro da indústria (5,71%), em nenhuma amostra do produto final foi encontrada contaminação por esse patógeno.

A indústria avaliada neste trabalho segue as exigências da USDA/FSIS (2014), a qual preconiza tolerância zero de contaminação por *L. monocytogenes* para *Beef Jerky* no final do processo de produção. De qualquer forma, é importante destacar que a EFSA (2013) descreve que a prevalência média de *L. monocytogenes* em produtos prontos para consumo a base de carne, na Europa, é de 2,07%. Já Leong *et al.* (2014) relatam que a prevalência desse micro-organismo foi de 4,6% em produtos prontos para consumo na Irlanda, enquanto SHEN *et al.* (2006) observaram prevalência de 2,97% de *L. monocytogenes* em produtos prontos para consumo na Florida, USA.

4 Conclusão

A matéria-prima é uma importante fonte de contaminação e introdução de *L. monocytogenes* na indústria de processamento de *Beef Jerky*. Além disso, a presença desse micro-organismo em superfícies de contato e sem contato com o alimento, reforça a importância dos programas de higienização como forma de evitar contaminação cruzada para o produto final.

O produto final (*Beef jerky*) não apresentou contaminação por *L. monocytogenes*, o que demonstra que as etapas do processo de produção que envolvem barreiras à multiplicação de patógenos e morte microbiana, foram efetivas no controle do patógeno.

O método Mini Vidas demonstrou ser um método de análise rápido e seguro para a detecção de *L. monocytogenes* na linha de processamento de *Beef Jerky*.

Referências

AASE, B.; SUNDHEIM,G.; LANGSRUD,S.; RØRVIK,L,M.; Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes.***International Journal of Food Microbiology**, v.62, p. 57-63, 2000.

ALLERBERGER, F.; WAGNER, M. Review. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. **Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 16, p.16-23, 2010.

AZNAR, R.; SOLÍS, I. PCR Detection of *Listeria monocytogenes* in different Food Products compared with the mini-VIDAS LMO System and the Standard Procedure ISO 11290-1. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit,** v. 1, n. 2, p. 115-120, 2006.

BARROS, M.A.; NERO, L.A.; SILVA, L.C.; D'OVIDIO, L.; MONTEIRO, F.A.; TAMANINI, F.; FAGNANI, R., HOFER, E.; BELOTI,V. *Listeria monocytogenes*: ocurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. **Meat Science**, v.76, p. 591-596, 2007.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Circular 175/2005.** Diretrizes para a Verificação no Local do Processamento de Produção de Jerked Beef.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n°62. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. Diário Oficial da União. Brasília, DF, p.14-51, 18 de setembro de 2003, seção 1.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Relatório de projeções 2013-2023.** Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/ministerio/gestao-estrategica/projecoes-do-agronegocio. Acesso em: outubro de 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. Circular nº 904, de 05 de dezembro de 2011. Dispõe sobre a revisão das diretrizes para verificação no local de processo de produção de *Beef Jerky*.** Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: agosto, 2014.

BUEGE, D. R.; SEARLS, G.; INGHAM, S. C. Lethality of commercial whole-muscle Beef Jerky manufacturing processes against *Salmonella* serovars and *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**. v. 69, p. 2091 – 2099, 2006.

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

CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC)**.** Disponível em: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/caramel-apples-12-14/index.html. Acesso em 15 de janeiro, 2015.

CHIARINI, E. ***Listeria monocytogenes* em matadouros de aves:** marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação. São Paulo, 2007. p. 141 Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade de São Paulo - USP.

DAELMAN, J.; JACXSENS, L.; LAHOU, E.; DEVLEIGHERE, F.; UYTTENDAELE, M.; Assessment of the microbial safety and quality of cooked chilled foods and their production process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, p. 193-200, 2013.

DICICCIO, P.; CONTER, M.; ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; VERGARA, A.; PALUDI, D.; FESTINO, A.R.; &IANIERI, A.; Review-*Listeria monocytogenes*: Biofilms in food processing. **Italian Journal Food Science,** v.24, p. 203-213, 2012.

DOUMITH M., CAZALET., SIMOES N., FRANGEUT C., KUNST F., MARTIN P., COSSART P., BUCHTIESER C. Nem aspects regarding evolution and virulence of Listeria monocytogenes revealed by comparative genomics and DNA arrays. **Infection Immune**, v. 72, p 1072-1083, 2004.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY EFSA. The community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006. **The EFSA journal**, v.130, p3-352, 2007.

FREITAS DE MACEDO, R.E.; MIYAGUE, L.; COSTA, L.B.; LUCIANO,F.B.;Control of *Listeria monocytogenes* growth by bacteriocin-producing starter cultures in the manufacturing of dry fermented sausage. **African Journal of Microbiology,** v. 7, p.710-718, 2013.

GETTY, K.J.K.; BOYLE, E.A.E.; ROBERTS, M.N.; AND LONNECKER, S.M. **Jerky Validation for Small and Very Small Meat and Poultry Businesses*(*2006)**.Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/35151cb4-1603-4164-b71f bfea44e487e8/C12_New_Technology_FY2004_Final_Report.pdf?MOD=AJPERES. Acessoem: outubro, 2014.

HARISSON, M.A.; SINGH, R.K.; HARISSOM, J. AND SINGH**,** N. **Antimicrobial Intervention and Process Validation in Beef Jerky Processing (2006).** Disponível em: http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/regulatory-compliance/new-technologies/food-safety-technologies/beef-jerky-processing. Acesso em: outubro, 2014.

LEONG, D.; ALVAREZ-ORDONEZ, A.; JORDAN, K.; Monitoring occurrence and persistence of *Listeria monocytogenes* in foods and food processing environments in the Republic of Ireland. **Frontiers in Microbiology,** v. 5, artigo 436, 2014.

LIU D.; LAWRENCE M.L.; AUSTIN F.W.; AINSWORTH A.J.A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes.* **Journal of Microbiological Methods**, v.71, p.133-140, 2007.

LUBER, P., CRERAR, S., DUFOUR, C., FARBER, J., DATTA, A., & TODD, E. C. D. Controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Working towards global scientific consensus and harmonization — Recommendations for improved prevention and control. **Food Control**, v.22:9, p.1535–1549, 2011.

MANUAL DE UTILIZAÇÃO MINI VIDAS® BIOMÉRIEUX S.A. Versão 5.6.0, 290p, 2012. Disponível em: <http://www.biomerieux.com>. Acesso em setembro de 2014.

MELONI, D., COSOLATI,S.G., MUREDU, A., MAZZA, R., FOIS,F.P., & MAZZETTE, R. Presence and molecular characterization of the major serovars of *Listeria monocytogenes* in ten Sardinian fermented sausage processing plants. **Meat Science,** v.97,p. 443-450, 2014.

MELONI, D., PIRAS, F., MUREDU, A., MAZZA, R., NUCERA, D., & MAZZETTE, R. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in traditional fermented sausage processing plants in Italy. **Italian Journal of Food Science**, V.24,P. 214–222, 2012.

NALÉRIO, E S.; ARAÚJO, M. R.; MENDONÇA, K. S., BASSANI, M. T;, SILVA, W. P. *Listeria monocytogenes*: monitoramento desse perigo biológico na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul. **Ciências Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 626-630,2009.

OLIVEIRA, M. M. M.; DE, BRUGNERA, D. F., ALVES, E., & PICCOLI, R. H., Biofilm formation by *Listeria monocytogenes*on stainless steel surface and biotransfer potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 97-106, 2010.

PORTO–FETT, A.C.S.; CALL, J.E.& LUCHANSKY, J.B.; Validation of a Commercial Process for Inactivation of *Escherichia coli O 157H7, Salmonella Ttphimutium, and Listeria monocytogenes* on the Surface of whole muscle Beef Jerky. **Journal of Food Protection**, v.71, p. 918-926, 2008.

RAMANOVA, N.; FAVRIN, S.; GRIFFITHS,M,W.; Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to Sanitizers Used in the Meat Processing Industry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 6405-6409, 2002.

ROBERTS, M.N., GETTY, K.J.K., and E.A.E. BOYLE.2006 **Thermal Process for Jerky Provides Proper Lethality for Controlling Pathogens.** Kansas State University Cattleman's Day Report 2007. Disponívelem:<http://www.asi.k-state.edu/species/beef/cattlemens-day/. Acesso: outubro, 2014.

SAMBROOK, J., & RUSSEL, D. W. **Molecular cloning.**Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 2001.

SHEN, Y.; LIU, Y.; ZHANG, Y.; CRIPE, J.; CONWAY, W.; MENG, J.; HALL, G.; BHAGWAT, A.A.; Isolation and Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolates from Ready-to-eat Foods in Florida.**Applied and Environmental Microbiology,** julho, p.5073-5076, 2006.

SILVA, W. P., LIMA, A. S., GANDRA, E. A., ARAÚJO, M. R., MACEDO, M. R. P., & DUVAL, E. H. *Listeria spp.* no processamento de linguiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS. **Ciência Rural**, v.34,p. 911e916, 2004

TODD, E.C.D., NOTERMANS, S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. **FoodControl**, v.22 p.1484-1490, 2011.

USDA.**United States Department of Agriculture - Food Safety and Inspection Service (USDA – FSIS).** Compliance Guideline for Meat and Poultry Jerky Produced by Small and Very Small Establishments. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/5fd4a01d-a381-4134-8b91-99617e56a90a/Compliance-Guideline-Jerky-2014.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: novembro 2014.

USDA. **United States Department of Agriculture - Food Safety and Inspection Service (USDAFSIS)** Compliance Guideline Controlling Listeria monocytogenes in post-lethality exposed ready-to-eat meat and poultry products.

Disponível:<http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/d3373299-50e6-47d6-a577-e74a1e549fde/Controlling-Lm-RTE-Guideline.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: novembro 2014.

VON LAER, A. E., LIMA, A. S., TRINDADE, P. S., ANDRIGUETTO, C., DESTRO, M. T., & SILVA, W. P. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from a fresh mixed sausage processing line in Pelotas-RS by PFGE. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 574e582, 2009.

WAN NORHANA, M.N., POOLE.S.E., DEETH.H.C., DYKES.G.A., Prevalence, persistence and control of *Salmonella* and *Listeria* in shrimp and shrimp products: A review. **Food Control**, v.21, p. 343-361, 2010.

WARRINER, K.; NAMVAR, A. What is the hysteria with Listeria? **Food Science and Thechnology,** v20, p.245-254, 2009.

Conclusão

A presença de *L. monocytogenes* na matéria-prima e no ambiente de processamento do *Beef Jerky*, onde pode haver contaminação cruzada, indica que a seleção de fornecedores da matéria-prima não está satisfatória e que existem falhas nos procedimentos higiênico-sanitários da linha de produção avaliada.

Mesmo não sendo observada contaminação no produto final, a preocupação existe, pois ficou evidente a contaminação do ambiente e o risco de contaminação cruzada. Entretanto, o *Beef Jerky* é favorecido pelos obstáculos existentes durante o processo, que contribuem positivamente para eliminação de *L. monocytogenes* bem como de outros patógenos, mas o risco existe e deve ser considerado objeto de medidas imediatas de higienização do ambiente de produção.

Com a realização desta pesquisa foi possível trazer informações relevantes, capazes de auxiliar, de maneira segura e confiável, a indústria de processamento de *Beef Jerky*, com relação a identificação de pontos de contaminação por *L. monocytogenes*.

Referências

ALLERBERGER, F.; WAGNER, M. Review. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. **Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 16, p.16-23, 2010.

ASSOCIAÇÃO DE INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE BOVINA ABIEC. **Exportação de carne Bovina no Brasi**l: <http://www.abiec.com.br/download/Relatorio%20exportacao%202013_jan.pdf>. Acesso: 10 dezembro 2014.

BAKKER, H.C.D.; DESJARDINS.C.A.; GRIGGS.A.D.G.; PETERS.J.P.; ZENG.Q.; YOUNG.K.S.; KODIRA.D.C.; YANDAVA.C.; HEPBURN.T.A.; BRIAN J.; HAAS.B.J.; BIRREN.B.W.; WIEDMANN.M. Evolutionary Dynamics of the Accessory Genome of Listeria monocytogenes. **PLoS ONE,** V. 8(6): e67511. doi:10.1371.2013.

BARROS, M.A.; NERO, L.A.; SILVA, L.C.; D'OVIDIO, L.; MONTEIRO, F.A.; TAMANINI, F.; FAGNANI, R., HOFER, E.; BELOTI,V. *Listeria monocytogenes*: ocurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. **Meat Science**, v.76, p. 591-596, 2007.

BERSOT, L.S.; GILLIO, C.;TAVOLARO,P.; LANGRAF,M.;FRANCO,B.D.G.M.; DESTRO,M.T.; Behavior of *Listeria monocytogenes* in sliced, vacuum-packed mortadella. **Brazilian Journal of Microbiology,** v.39, p. 514-516, 2008.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Circular 175/2005.** Diretrizes para a Verificação no Local do Processamento de Produção de JerkedBeef.

BRASIL, Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n°9. **Institui os procedimentos de controle de *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para consumo**. Diário Oficial da União. Brasília, DF, p.14, 2009.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n°62. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. Diário Oficial da União. Brasília, DF, p.14-51, 18 de setembro de 2003, seção 1.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Relatório de projeções 2013-2023.** Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/ministerio/gestao-estrategica/projecoes-do-agronegocio. Acesso em: outubro de 2014.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).** Resolução – RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Dispõe sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm> Acesso em: novembro, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. Circular n° 904, de 05 de dezembro de 2011. Dispõe sobre a revisão das diretrizes para verificação no local de processo de produção de *Beef Jerky*.** Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: agosto, 2014.

BHUNIA, A. K. Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis.**Nov a York. Springer**. p.276, 2008.

BUBERT A., HEIN I., RAUCH M., LENHER A., YONN B., GOEBE W., WAGNER M. Detection an differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.4688-4692, 1999.

BUEGE, D. R.; SEARLS, G.; INGHAM, S. C. Lethality of commercial whole-muscle Beef Jerky manufacturing processes against *Salmonella* serovars and *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**. v. 69, p. 2091 – 2099, 2006.

CAMPOS, L.C. *Listeria monocytogenes*. In: Trabulsi L R Alerthum. **Fundamentos em Microbiologia.** 4 ed. p.235-242. São Paulo: Atheneu, 2004.

CARBALLO, J. & ARAÚJO, A.B. Evaluation of the efficacy of commercial sanitizers against adhered and planktonik cells of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella spp.* **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** v.32, p. 602-612, 2012.

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

CARRASCO, E.; VALERO, A.; RODRIGUEZ, R. M.; GIMENO, G.; ZURERA, G., Management of microbiological safety of ready-to-eat meat products by mathematical modelling: Listeria monocytogenes as an example. **International Journal of Food Microbiology.**v.114, p. 221-226, 2007.

CASSEL, D. **The National Provisioner**. Disponível em*:* <http://www.provisioneronline.com/articles/94923-mystery-solved-1. Acesso em: dezembro 2014.

CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC)**.** Disponível em: <http://www.cdc.gov/listeria> Acesso em: novembro 2014.

CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC)**.** Disponível em: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/caramel-apples-12-14/index.html. Acesso em 15 de janeiro, 2015.

CHURCHILL, R.L.T.; LEE, H.; HALL, J.C. Review-Detection of Listeria monocytogenes and the toxin listeriolysin O in food. **Journal of Microbiological Methods**, v.64, p.141-179, 2006.

DESTRO, M.T. Disponível em: http://foodsafetybrazil.com/listeria-e-e-coli-nao-atormentam-aos-brasileiros/ Acesso em: 04 de dezembro 2014.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY EFSA. The community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006. **The EFSA journal**, v.130, p3-352, 2007.

FARBER, J.M., PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiology Review.** V.55, 476-511p., 1991.

HARISSON, M.A.; SINGH, R.K.; HARISSOM, J. AND SINGH**,** N. **Antimicrobial Intervention and Process Validation in Beef Jerky Processing (2006).** Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/8dd0f238-08d7-4ca0a31a77fa3ca8acf6/C17_New_Technology_FY2004_Final_Report.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: outubro, 2014.

IBARRECHE, M.; CASTELLANO, P.; VIGNOLO, G., Evaluation of anti-Listeria meat borne *Lactobacillus* for biofilm formation on selected abiotic surfaces. **Meat Science,** v .96, p 295-303, 2014.

INGHAM, S.C., SEARLS, G., MOHANAN, S., BUEGE, D.R. 2006b. Survival of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged beef jerky and related products stored at 21°C. **Journal Food Protection**. v 69, p. 2263-2267, 2006.

JIANG.L.; CHEN.J.; XU.J.; ZHANG.X .;WANG.S.; ZHAO.H ,;VONGXAY.K.; FANG. W. Virulence characterization and genotypic analyses of *Listeriamonocytogenes* isolates from food and processing environments in eastern China. International **Journal of Food Microbiology** v.121,p.53–59, 2008.

LIU D.; LAWRENCE M.L.; AUSTIN F.W.; AINSWORTH A.J.A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Microbiological Methods**, v.71, p.133-140, 2007.

LIU D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 645-659, 2006.

LUBER, P., CRERAR, S., DUFOUR, C., FARBER, J., DATTA, A., & TODD, E. C. D. Controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Working towards global scientific consensus and harmonization — Recommendations for improved prevention and control. **FoodControl**, v.22:9, p.1535–1549, 2011.

MANUAL DE UTILIZAÇÃO MINI VIDAS® BIOMÉRIEUX S.A. **Versão 5.6.0**, 290p, 2012. Disponível em: <http://www.biomerieux.com>. Acesso em setembro de 2014.

OLIVEIRA, M. M. M. DE, BRUGNERA, D. F., ALVES, E., & PICCOLI, R. H., Bi Disinfectant action of *Cymbopogon sp*. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, v. 21, p. 549-553, 2010.

OLIVEIRA, M. M. M. DE, BRUGNERA, D. F., ALVES, E.,& PICCOLI, R. H., Biofilmes em Indústria de Laticínios : Aspectos gerais e uso de óleos essências como nova

alternativa de controle. **Revista Instituto de Laticínios Candido Tostes**, v.68. p.65-73, 2013. Disponível em: <http://www.revistadoilct.com.br/rilct/issue/view/35

OLIVEIRA, M. M. M.; DE, BRUGNERA, D. F., ALVES, E., & PICCOLI, R. H., Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 97-106, 2010.

PORTO–FETT, A.C.S.; CALL, J.E.& LUCHANSKY, J.B.; Validation of a Commercial Process for Inactivation of *Escherichia coli O 157H7, Salmonella Ttphimutium, and Listeria monocytogenes* on the Surface of whole muscle Beef Jerky, **Journal of Food Protection**, v.71, p. 918-926, 2008.

ROCOURT, J.; BUCHRIESER, C.The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes:* phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: RYSER, E.T.; MARTH E.H. ***Listeria*, Listeriose, and Food Safety.** 3.ed. Boca Raton: CRC Press Taylor &Francis Group, 2007. cap 1, p.1-20.92

RODRIGUEZ.LAZARO, D., PLA, M., SCORTTI, M., MONZO, H.J., VAZQUEZBOLA ND, J.A. A novel realtime PCR for *Listeria monocytogenes* that monitors analytical performance via an internal amplification. Control. **Applied Environmenta l Microbiology.** v.71, p. 9008–9012, 2005.

SAMBROOK, J., & RUSSEL, D. W. **Molecular cloning.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 2001.

SANTOS, L.V e PALMEIRA E.M. Exportações gaúchas de carne bovina processada para os EUA. **Revista acadêmica de economia**. Disponível em**:** **<**http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/br/06/lvs.htm Acesso em: dezembro 2014.

SIC – **Serviço de informação da carne.** Disponível em: <http://www.sic.org.br/curiosidades/charque Acesso: novembro 2014.

SILVA, W. P., LIMA, A. S., GANDRA, E. A., ARAÚJO, M. R., MACEDO, M. R. P., & DUVAL, E. H. *Listeria spp.* no processamento de linguiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS. **Ciência Rural**, v.34,p. 911e916, 2004

TODD, E.C.D., NOTERMANS, S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. **FoodControl**, v.22p.1484-1490, 2011.

TORRES, K; SIERRA, S.; POUTOU, R.; CARRASCAL, A.; MERCADO, M. Patogenesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonotico emergente. **MVZ-Córdoba**, v. 10, p.511-543, 2005.

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

USDA. **United States Department of Agriculture - Food Safety and Inspection Service (USDAFSIS)** Compliance Guideline Controlling Listeria monocytogenes in post-lethality exposed ready-to-eat meat and poultry products. Disponível:<http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/d3373299-50e6-47d6-a577-

e74a1e549fde/Controlling-Lm-RTE-Guideline.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: novembro 2014.

VÁZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY,T.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J, KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinic and Microbiology Reviews**, v.14, n.3, p.584– 640. 2001.

VEEN, S.V.D. & ABEE, T., Generation of Variants in Listeria monocytogenes Continuous-Flow Biofilms Is Dependent on Radical-Induced DNA Damage and RecA-Mediated Repair. **PLoSONE, v.** 6(12): e28590. 2011.

WAN NORHANA, M.N., POOLE.S.E., DEETH.H.C., DYKES.G.A., Prevalence, persistence and control of *Salmonella* and *Listeria* in shrimp and shrimp products: A review. **Food Control**, v.21, p. 343-361, 2010.

WARRINER, K.; NAMVAR, A. What is the hysteria with Listeria? **Food Science and Thechnology,** v20, p.245-254, 2009.

ZUNABOVIC, M.; DOMING, K.; KNEIFEL, W. Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments – Review. **Food Science and Thecnology**, v 44, p.351-362, 2011.