

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL



Dissertação

**Diversidade genética de cepas de
Listeria monocytogenes isoladas na região sul do
Rio Grande do Sul através de PFGE**

Karla Sequeira Mendonça

Pelotas, 2009

KARLA SEQUEIRA MENDONÇA

**Diversidade genética de cepas de *Listeria monocytogenes*
isoladas na região sul do Rio Grande do Sul através de
PFGE**

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

Orientador: Wladimir Padilha da Silva

Pelotas, 2009

Banca examinadora:

Dr^a. Ana Eucares von Laer, Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Dulcinéa Blum Menezes, Universidade Federal de Pelotas

Prof^o. Dr. Wladimir Padilha da Silva, Universidade Federal de Pelotas

Dados de catalogação na fonte:

(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

M539d Mendonça, Karla Sequeira

Diversidade genética de cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas na região sul do Rio Grande do Sul através de PFGE / Karla Sequeira Mendonça; orientador Wladimir Padilha da Silva. - Pelotas, 2009 - 80f.: il. -Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2009.

1. *Listeria monocytogenes* 2. Alimentos 3. Plantas de processamento 4. Diversidade 5. PFGE I Silva, Wladimir Padilha da (orientador) II .Título.

CDD 664.9

DEDICATÓRIA

Ao meu adorado Marcelo, por ter imaginado
uma nova história para nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

Ao meu amado esposo Marcelo, por todo amor, amizade e companheirismo e por ter me encorajado a viver juntamente com ele, essa “linda aventura”.

Aos meus pais, Carlos e Cléria, que com muito carinho e incentivo, jamais mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Aos meus irmãos Manoel e Marina, pelos quais me esforço sempre, para servir como um bom exemplo.

A minha sogra Eva e ao meu cunhado Rodrigo, que sempre nos apoiaram e incentivaram para que seguíssemos nossos estudos.

Ao meu orientador, Prof^o Wladimir Padilha da Silva pela confiança depositada, pelos constantes incentivos e ensinamentos, e acima de tudo, pela grande amizade.

À Prof^a Marisa Cardoso por ter me recebido em seu laboratório de maneira tão atenciosa e aos colegas do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva (UFRGS), pela paciência em dividirem o espaço do laboratório comigo, durante a execução deste trabalho.

À Geovana Brenner, pelos valiosos ensinamentos e auxílio técnico, os quais possibilitaram a execução deste trabalho.

À querida amiga Élen, pela grande amizade e principalmente, por acreditar em mim mais do que eu mesma, em muitos momentos.

À amiga Márcia Araújo por ter me recebido, desde o primeiro momento, de maneira tão calorosa, comemorando sempre, a entrada de mais uma nutricionista no laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, tanto aqueles que passaram (Carô, Eduardo, Fernando, Francine, Graci, Kika, Márcia Jantzen, Natália), como aqueles que ainda estão por aqui (Andréia, Carol, Celso, Denise, Greici, Janaína, Júlia, Kátia, Lauri, Márcia Mata, Milena, Rodrigo, Simone, Tatiane, Valmor) por todo apoio, incentivo, carinho e amizade, e por compartilharem comigo todos os momentos vividos.

À Ana Eucares pelo apoio e incentivo, e por não poupar esforços em auxiliar, sempre que necessário.

À Prof^a Dulcinéa Blum, pelas importantes contribuições neste trabalho.

Aos amigos e colegas dos Laboratórios de Imunologia Aplicada e Biologia Molecular do Centro de Biotecnologia (CENBIOT), pelo apoio, auxílio e amizade.

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

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

RESUMO

MENDONÇA, KARLA SEQUEIRA. Universidade Federal de Pelotas, julho, 2009. Diversidade genética de cepas de *L. monocytogenes* isoladas na região sul do Rio Grande do Sul através de PFGE. Professor Orientador: Wladimir Padilha da Silva.

Listeria monocytogenes é uma bactéria patogênica de grande preocupação à saúde pública por causar infecções graves, apresentando alta taxa de mortalidade em pessoas imunocomprometidas. Além disso, é um grande problema para a indústria de alimentos devido à sua capacidade de crescer em baixas temperaturas, sua ampla distribuição no ambiente, e habilidade para aderir a diversas superfícies que entram em contato com os alimentos. Este estudo objetivou estudar a diversidade genética e a disseminação de cepas de *L. monocytogenes* isoladas a partir de quatro diferentes tipos de alimentos, bem como de três indústrias de alimentos e de aviários comerciais, localizados na região sul do Rio Grande do Sul. Quarenta e quatro cepas de *L. monocytogenes* foram caracterizadas por sorotipagem e PFGE. A sorotipagem indicou a presença de seis sorotipos diferentes (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 4b e 4e), com prevalência do sorogrupo 1/2 (77,3%). A combinação dos padrões de macrorestrição gerados pelas enzimas *Apal* e *Ascl* revelou 29 diferentes pulsotipos, os quais formaram 8 grupos. O grupo IVa foi o predominante agrupando cepas isoladas em períodos distintos e provenientes de diferentes origens. Cepas com perfis genotípicos similares foram recuperadas a partir de diferentes alimentos, bem como em plantas de processamento diferentes e em épocas distintas de isolamento, o que sugere a ampla disseminação destes genótipos nessa região. A presença de cepas persistentes nas indústrias avaliadas ressalta a importância da contaminação cruzada nesses ambientes, o que pode dever-se a ineficácia dos procedimentos de limpeza e sanitização adotados, os quais permitem a sobrevivência e a adaptação dessas cepas no ambiente de processamento, causando, assim, persistência e levando a contaminação dos produtos finais.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, alimentos, plantas de processamento, diversidade, PFGE.

ABSTRACT

MENDONÇA, KARLA SEQUEIRA. Universidade Federal de Pelotas, July, 2009. Genetic diversity of strains of *L. monocytogenes* isolated at southern of Rio Grande do Sul, Brazil by PFGE. Adviser: Wladimir Padilha da Silva.

Listeria monocytogenes is a pathogenic bacterium of great concern to public health causing severe infections with high mortality rate in immunocompromised persons. Furthermore, *L. monocytogenes* is a huge problem for the food industry because of its ability to grow in a wide range of temperatures, its large distribution in the environment, and ability to adhere to a variety of surfaces that can into contact with food. The objective of this study were to identify the genetic diversity and dissemination of strains of *L. monocytogenes* isolated from four different types of food, three food industries and commercial poultry farms, located in the southern region of Rio Grande do Sul - Brazil. Forty-four strains of *L. monocytogenes* were characterized by serotyping and PFGE. Serotyping indicated the presence of six different serotypes (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 4b and 4e), with prevalence of serogroup 1/2 (77.3%). Combination of the patterns generated by macrorestriction enzymes Apal and AscI shown 29 different pulsotypes formed 8 groups. The group IVa was the predominant grouping strains isolated in different periods and from different sources. Strains with similar genotypic profiles were recovered from different processing plants and foods, as well as different seasons of isolations which suggests a wide spread of these genotypes in this region. The presence of persistent strains evaluated of these industries emphasizes the importance of cross-contamination in these environments, which may be due to inefficiency of the procedures adopted for cleaning and sanitization, which permit the survival and adaptation of these strains in the processing environment, this way causing persistent and leading a contamination of final products.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, food, processing plants, diversity, PFGE.

Lista de Figuras

Figura 1	Perfis genotípicos por PFGE do DNA genômico de <i>L. monocytogenes</i> obtidos com a enzima <i>Ascl</i> ..	41
Figura 2	Perfis genotípicos por PFGE do DNA genômico de <i>L. monocytogenes</i> obtidos com a enzima <i>Ascl</i> ..	42
Figura 3	Perfis genotípicos por PFGE do DNA genômico de <i>L. monocytogenes</i> obtidos com a enzima <i>Apal</i> ..	43
Figura 4	Perfis genotípicos por PFGE do DNA genômico de <i>L. monocytogenes</i> obtidos com a enzima <i>Apal</i> ..	44
Figura 5	Representação esquemática da linha de processamento de linguiça mista frescal (Planta A) e pontos de isolamento das cepas de <i>L. monocytogenes</i> genotipadas por PFGE.....	45
Figura 6	Representação esquemática da linha de abate e processamento de frangos (Planta B) e pontos de isolamento das cepas de <i>L. monocytogenes</i> genotipadas por PFGE.....	49
Figura 7	Dendrograma representando a relação genética entre as 44 cepas de <i>L. monocytogenes</i> analisadas por PFGE utilizando <i>Apal</i> e <i>Ascl</i>	62
Figura 8	Distribuição dos grupos de <i>L. monocytogenes</i> de acordo com os pontos de amostragens da linha de processamento de linguiça mista frescal (planta A)	68
Figura 9	Distribuição dos grupos de <i>L. monocytogenes</i> de acordo com os pontos de amostragens da linha de abate e processamento de frangos (planta B).....	69

Lista de Tabelas

Tabela 1	Características bioquímicas de bactérias do gênero <i>Listeria</i>	19
Tabela 2	Surtos de listeriose invasiva em diferentes países, 1980-2005.....	23
Tabela 3	Distribuição de sorotipos de <i>L. monocytogenes</i> isoladas em distintos ambientes de processamento e em alimentos adquiridos a partir da indústria e do comércio, no sul do Rio Grande do Sul	36
Tabela 4	Perfil de digestão por endonucleases (<i>Ascl</i> e <i>Apal</i>) das 44 cepas de <i>L. monocytogenes</i> analisadas por PFGE	39
Tabela 5	Perfil genotípico e sorológico de 44 cepas de <i>L. monocytogenes</i> isoladas em distintos ambientes de processamento e em alimentos adquiridos a partir da indústria e do comércio, no sul do Rio Grande do Sul	58
Tabela 6	Grupos formados a partir da análise visual do dendrograma dos perfis combinados (Pulsotipos) com <i>Ascl</i> e <i>Apal</i> , por PFGE	63

Lista de Quadros

Quadro 1	Fórmula para determinação do índice discriminatório	33
Quadro 2	Sítios de clivagem para as endonucleases de restrição, <i>ApaI</i> e <i>AsclI</i>	38

Sumário

1 Introdução	15
2 Revisão de Literatura	17
2.1 Histórico.....	17
2.2 Classificação.....	17
2.3 Morfologia, metabolismo e bioquimismo.....	18
2.4 Fontes e disseminação ambiental	19
2.5 Contaminação de alimentos	21
2.6 Patogênese da listeriose	24
2.7 Sorotipificação	26
2.8 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	27
3 Materiais e Métodos	30
3.1 Cepas bacterianas.....	30
3.2 Sorotipificação	30
3.3 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	30
3.3.1 Suspensão celular.....	30
3.3.2 Solução SSP	31
3.3.3 Blocos de agarose.....	31
3.3.4 Lise celular	31
3.3.5 Lavagens.....	31
3.3.6 Restrição do DNA cromossomal	32
3.3.7 Eletroforese em gel de campo pulsado	32
3.3.8 Análise dos resultados	32
3.4 Determinação do Índice de Discriminação (D).....	33
4 Resultados e Discussão	34
4.1 <i>L. monocytogenes</i> em alimentos e ambientes de processamento na região sul do Rio Grande do Sul.....	34
4.2 Sorotipificação das cepas de <i>L. monocytogenes</i> isoladas na região sul do Rio Grande do Sul	35
4.3 Tipificação por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	38
4.3.1 Disseminação de <i>L. monocytogenes</i> em uma planta de processamento de linguiça mista frescal (Planta A)	45
4.3.2 Disseminação de <i>L. monocytogenes</i> em um frigorífico abatedouro de frangos (Planta B).....	49

4.3.3	Disseminação de <i>L. monocytogenes</i> em frigorífico abatedouro de ovino (Planta C).....	51
4.3.4	Diversidade genética de <i>L. monocytogenes</i> em queijo artesanal tipo Minas comercializado em Pelotas	52
4.3.5	Diversidade genética de <i>L. monocytogenes</i> em frangos refrigerados comercializados em Pelotas	53
4.3.6	<i>L. monocytogenes</i> em estabelecimento avícola na região sul do Rio Grande do Sul	54
4.3.7	Diversidade genética de <i>L. monocytogenes</i> em alimentos, em indústrias de alimentos e em aviários comerciais, na região sul do Rio Grande do Sul	54
5	Conclusões	70
6	Referências bibliográficas	71

1 Introdução

O patógeno *Listeria monocytogenes* é motivo de grande preocupação em saúde pública, por ser responsável pela listeriose, uma séria infecção, causada principalmente pelo consumo de alimentos contaminados (GHANDI; CHIKINDAS, 2007) e que pode vir a provocar entre outras sintomatologias, encefalites, septicemias, meningites ou abortos (DUSSURGET; PIZARRO-CERDA; COSSART, 2004). É uma doença que cursa com uma alta taxa de casos fatais e que ocorre em grupos de risco bem definidos, incluindo indivíduos imunocomprometidos, idosos, mulheres grávidas e neonatos (FARBER; PETERKIN, 1991).

Devido a sua natureza ubíqua, de cepas de *L. monocytogenes* tem sido encontrada amplamente distribuída na natureza, sendo isolada de diversas fontes ambientais e podendo contaminar uma grande variedade de alimentos, principalmente produtos lácteos e carnes (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001). Como o alimento é a principal fonte de contaminação por *L. monocytogenes*, esta bactéria tornou-se uma importante preocupação para a indústria de alimentos a partir do momento em que os surtos e casos de listeriose foram, em sua grande maioria, associados ao consumo de produtos processados industrialmente (ILSI, 2005). A contaminação pós-processamento é considerada a causa mais frequente da contaminação de alimentos, seja por contaminação cruzada, que pode ocorrer dentro da própria indústria, ou através da contaminação no ponto de distribuição ou venda do produto (CAPITA et al., 2005).

Para monitorar as rotas de contaminação por *L. monocytogenes* em plantas processadoras de alimentos e identificar as fontes de contaminação dos produtos, vários métodos de tipificação baseados em tamanho dos fragmentos de DNA têm sido desenvolvidos (HEIR et al., 2004). Entre os diversos métodos moleculares disponíveis atualmente, a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) tem sido amplamente utilizada demonstrando ser precisa e útil para a tipificação epidemiológica de *L. monocytogenes*, auxiliando na detecção e rastreamento de surtos de listeriose, determinando rotas de contaminação na cadeia produtiva de alimentos e auxiliando na detecção de cepas virulentas (WIEDMANN, 2002), além de ser uma técnica sensível, com bom poder discriminatório e altamente reprodutível (GRAVES; SWAMINATHAN, 2001).

Este trabalho teve como objetivo determinar o perfil genotípico, pelo emprego da técnica de PFGE, de cepas de *L. monocytogenes* isoladas a partir de quatro diferentes tipos de alimentos, em três indústrias de alimentos e em aviários comerciais, localizados na região sul do Rio Grande do Sul, a fim de estudar a disseminação e a diversidade genética desse patógeno em alimentos e no ambiente, nessa região do Brasil.

2 Revisão de Literatura

2.1 - Histórico

Listeria monocytogenes foi inicialmente descoberta por Murray em 1924, sendo denominada inicialmente de *Bacterium monocytogenes* devido à monocitose apresentada por animais de laboratório infectados experimentalmente (MURRAY, 1926 apud VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001). Em 1927, Pirie, estudando uma epizootia em roedores na África do Sul, isolou do fígado destes animais uma bactéria a qual denominou de *Listerella hepatolytica*, em homenagem ao pesquisador Joseph Lister (HOFER; REIS, 2005). Devido às cepas isoladas por Murray (1926) e Pirie (1927) serem muito semelhantes, estes pesquisadores, resolveram denominar este microrganismo de *Listerella monocytogenes*. Contudo, *Listerella* já contemplava um gênero protozoário, então, Pirie sugeriu a mudança da nomenclatura para *Listeria monocytogenes* (AUTIO et al., 2003).

Por muitos anos, isolados clínicos de *Listeria* spp. foram raras e a epidemiologia da doença permaneceu pouco conhecida. Entretanto, a partir do final da década de setenta, o número de relatos do isolamento de *Listeria* spp. começou a aumentar, sendo que a partir de 1983, uma série de surtos epidêmicos de listeriose em humanos ocorreu na América do Norte e Europa, estabelecendo a listeriose como uma importante doença de origem alimentar (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

2.2 Classificação

O gênero *Listeria* consiste de um grupo de bactérias com baixo conteúdo de G+C em seu DNA, o qual varia em torno de 36% a 42% (ALLERBERGER, 2003), diretamente relacionada à *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. (MONTVILLE; MATTHEWS, 2005). O gênero *Listeria* atualmente é constituído em seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. grayi* (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Contudo, somente duas espécies, *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*, são patogênicas (ZHANG et al., 2007). *L. ivanovii* é considerada patogênica apenas para animais (SCHMID et al., 2005) e embora *L. monocytogenes* seja a única espécie consistentemente associada com a listeriose humana (LINDSTEDT et al., 2008),

existem relatos de *L. ivanovii* e *L. seeligeri* relacionadas a casos de doenças em humanos (GASANOV; HUGHES; HANSBRO 2005).

2.3 Morfologia, metabolismo e bioquimismo

L. monocytogenes, assim como as demais espécies de *Listeria*, apresentam-se como bacilos curtos, possuindo aproximadamente 0,4-0,5µm de diâmetro e 1-2µm de comprimento (GRAY; KILLINGER, 1966; LOW; DONACHIE, 1997). São bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos e com ausência de cápsula celular (VAZQUEZ-BOLAND, 2001). Em meios de cultura semi-sólidos, *Listeria* spp., quando incubada a 25°C, apresenta motilidade devido à presença de flagelos peritríquios, perdendo essa capacidade quando incubada a 37°C (FARBER; PETERKIN, 1991). Essa motilidade típica é característica de *Listeria* spp. e ocorre em forma de “guarda-chuva”, devido à sua natureza de microaerofilia (RYSER; MARTH, 1999).

São bactérias anaeróbias facultativas com metabolismo fermentativo, e que se multiplicam bem em ambientes com baixa quantidade de O₂ e aumento na tensão de CO₂, como no caso de alimentos embalados a vácuo ou em atmosfera modificada (NILSSON et al., 2000).

Esse patógeno possui uma ampla capacidade de adaptação e sobrevivência a situações ambientais adversas, tolerando altas concentrações de sal (10%) (HAIN et al., 2007), grandes variações de pH (entre 4,3 e 9,4), e atividade de água de até 0,92 (BELL; KYRIAKIDES, 2005). Apresenta capacidade de multiplicação em uma ampla faixa de temperatura, entre -0,4°C a 50°C (GRAVES; SWAMINATHAN, 2001), com um ótimo de 37°C. Além dessas importantes características, *L. monocytogenes* é ainda capaz de se aderir a diferentes superfícies que entram em contato com o produto (AUTIO et al., 2003), e por conseqüência, diferentes alimentos têm sido relatados por estarem associados com casos esporádicos e surtos de listeriose (AUTIO et al., 2002; NAKAMURA et al., 2004; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007).

Para se realizar a identificação bioquímica, as espécies do gênero *Listeria* devem ser classificadas como catalase positiva, oxidase negativa, fermentadoras de glicose produzindo, principalmente, ácido lático, e não redutores de nitrato a nitrito (SCHMID et al., 2005).

As colônias de *Listeria* spp. em ágar nutriente são arredondadas, translúcidas, convexas e de bordas regulares. 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).

A diferenciação entre as espécies baseia-se em testes de fermentação de carboidratos (manitol, xilose, ramnose e dextrose), produção de β -hemólise em ágar sangue, e no Camp-test (FARBER; PETERKIN, 1991). Essas características bioquímicas podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características fenotípicas de bactérias do gênero *Listeria*

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

^a Reações em TSI (ágar tríplice açúcar ferro) rampa/fundo: A= ácido e K= alcalino; V: variável.
Fonte: Adaptado de HOLT et al., 1994; Gasanov; Hughes; Hansbro, 2005.

2.4 Fontes e disseminação ambiental

As bactérias do gênero *Listeria* possuem a característica de serem difundidas na natureza, tendo sido isoladas de diversas fontes ambientais, uma vez que estão presentes no solo, água, efluentes e material fecal, humano e animal (MONTVILLE; MATTHEWS, 2005; TAKARASHI et al, 2007). Alimentos contaminados são as

maiores fontes de infecção por *L. monocytogenes*. Produtos como carnes e seus derivados, leite e seus derivados, vegetais e peixes, têm sido implicados como veículos de listeriose (DAUPHIN; RAGIMBEAU, MALLE, 2001; SILVA et al., 2006; FUGETT et al., 2007).

A contaminação por *Listeria* spp. é de difícil controle, tendo em vista sua ampla disseminação e capacidade fisiológica de adaptação, as quais permitem seu desenvolvimento sob condições que usualmente são desfavoráveis a outras bactérias patogênicas (UHITIL et al., 2004; TASARA et al., 2006). Assim sendo, esse patógeno tornou-se motivo de preocupação para a indústria de alimentos (GRAVESEN et al., 2000).

Por essa ubiquidade, *Listeria* spp. pode se estabelecer em ambientes variados, tendo sido recuperada do ambiente doméstico, incluindo superfícies de cozinhas e refrigeradores (AZEVEDO et al., 2005). Azevedo et al. (2005), avaliaram a incidência de *Listeria* spp. em refrigeradores domésticos em Portugal e investigaram se as práticas de higiene no ambiente doméstico contribuiriam para persistência do microrganismo. Os autores verificaram que 9,3% (8/86) dos 86 refrigerados estavam contaminados com *Listeria* spp. Desses, 3,5% (3/86) foram positivas para *L. monocytogenes*, 4,6% (4/86) e 1,2% (1/86) positivas para *L. gray* e *L. innocua*, respectivamente.

A presença dessa bactéria em plantas de processamento de alimentos, mesmo após a higienização, representa risco microbiológico para os produtos. Devido a sua capacidade de formar biofilmes (MEDRALA et al., 2003; ILSI, 2005), espécies de *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; HEIR et al., 2004). Chasseignaux et al. (2002) pesquisando a incidência de *L. monocytogenes* em plantas de processamento de aves e suínos, isolaram esse patógeno em 23,7% das amostras provenientes do ambiente de processamento, observando que as principais fontes de contaminação pela bactéria foram os equipamentos e utensílios, além de pisos e drenos.

A entrada de *L. monocytogenes* em unidades produtoras de alimentos pode ocorrer através de sapatos e do vestuário dos manipuladores, equipamentos e utensílios, alimentos de origem animal e vegetal, bem como a partir de portadores assintomáticos (ROCOURT; JACQUET; REILLY, 2000; FILIOUSIS et al., 2009).

Assim, torna-se difícil determinar a verdadeira contribuição das matérias-primas e do ambiente, na contaminação do produto final.

Para tanto, estudos epidemiológicos são necessários para indicar as fontes potenciais de contaminação e reforçar o conhecimento sobre as condições ambientais em que *L. monocytogenes* pode sobreviver e se desenvolver nestes ambientes (CHASSEIGNAUX et al., 2001). Dessa maneira, a caracterização das cepas isoladas é uma ferramenta essencial na detecção de prováveis fontes de contaminação (PECCIO et al., 2003).

2.5 Contaminação de alimentos

Estudos têm descrito a ocorrência de *L. monocytogenes* em diferentes tipos de alimentos, tanto de origem animal quanto vegetal e embora frequentemente esta bactéria esteja presente nestes alimentos, surtos e casos esporádicos de listeriose foram também associados com produtos prontos para o consumo (WHO/FAO, 2004).

Os vegetais podem ser facilmente contaminados pela presença da bactéria na água e no solo, ou a partir de fezes de animais saudáveis, porém portadores de *L. monocytogenes*, quando seu esterco são utilizadas como adubo (CDC, 2009). Como exemplo dessa afirmativa pode-se citar o primeiro surto de listeriose associado ao consumo de alimentos, que ocorreu no Canadá em 1981, através do consumo de alimento típico do país (*coleslaw*) contaminado com *L. monocytogenes*. Através da investigação epidemiológica, concluiu-se que as plantações de repolho usadas para produzir *coleslaw*, haviam sido adubadas com fezes de ovinos com histórico da doença (IVANEK; GROHN; WIEDMANN, 2006).

A presença constante e assintomática de *L. monocytogenes* em animais os torna disseminadores da bactéria para o ambiente, contaminando alimentos de origem animal, como carnes e produtos lácteos (BERSOT, 2004), o que requer a execução de medidas de controle específicas durante todo o seu processo produtivo (FUGGET et al., 2007). Em 1983 um surto de listeriose em Massachusetts (EUA), promoveu o questionamento sobre a eficiência do processo de pasteurização do leite na inativação de *L. monocytogenes*. Os casos ocorridos foram devido ao consumo de leite pasteurizado integral contaminado pela presença da bactéria, que infectava o rebanho de vacas, responsáveis pelo fornecimento de leite para a indústria. Dessa maneira, concluiu-se que a carga elevada deste patógeno presente

no leite tornou o processo de pasteurização insuficiente (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007).

As carnes prontas para o consumo, contaminadas por *L. monocytogenes*, são outra fonte importante de listeriose humana, pois suportam a multiplicação da bactéria, apresentam uma longa vida de prateleira, quando refrigeradas, e são frequentemente consumidas sem cozimento prévio (ILSI, 2005). Assim sendo, diversos surtos foram atribuídos a este grupo de alimentos, no Reino Unido, França e muitos locais dos Estados Unidos (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007).

A ocorrência de *L. monocytogenes* foi ainda observada, em um surto ocorrido em 1985, nos Estados Unidos da América, pelo consumo de queijo tipo mexicano, que resultou em 142 casos de listeriose com 46 mortes, destes 85% envolveram mulheres grávidas. A contaminação foi provavelmente causada por pasteurização insuficiente do leite ou por uma mistura de leite cru com leite pasteurizado, que é realizada para fazer este tipo de queijo (ICMSF, 1996). Esse processo de utilização de leite cru na fabricação de queijos moles não curados foi responsável também por surtos ocorridos na Suíça (1987), Carolina do Norte (2000), Canadá (2002) e no Texas (2003) (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007). Os surtos de listeriose e o número de casos de listeriose ocorridos nos últimos anos podem ser visualizados na tabela 2.

Devido a estes surtos, houve preocupação por parte da indústria, quanto à eficácia das medidas adotadas para a inativação e minimização da presença de *L. monocytogenes* dentro de unidades processadoras de alimentos. Em resposta a este problema, a indústria de alimentos, implementou normas de boas práticas de fabricação e um sistema de análises de perigos e pontos críticos de controle (HACCP), e realmente durante 1990, o número de alimentos contaminados com *L. monocytogenes* foi reduzido (RAMASWAMY et al., 2007).

Tabela 2. Surtos de Listeriose invasiva em diferentes países, 1980-2005.

Ano	País	N° casos	N° mortes	Alimento suspeito/ implicado	Sorotipo
1981	Canadá	41	18	Salada de repolho	4b
1983	USA	49	14	Leite pasteurizado	4b
1985	USA	142	48	Queijo tipo mexicano	4b
1983-1987	Suíça	122	65	Queijo "Vacherin mont d'Or"	4b
1987-1989	Reino Unido	366	94	Patê	4b
1989-1990	Dinamarca	26	7	Queijo azul	4b
1992	França	279	85	Língua de porco em geléia	4b
1993	França	38	10	Rillettes- preparação tipo patê	4b
1998-1999	USA	108	14	Hot dog	4b
1999	Finlândia	25	6	Manteiga	3 ^a
1999-2000	França	10	3	Rillettes- preparação tipo patê	4b
2000	USA	30	7	Delicatessen de carne de peru	1/2 ^a
2000	USA	13	5	Queijo tipo mexicano	4b
2002	USA	54	8	Delicatessen de carne de peru	4b
2002	Canadá	17	0	Queijo	-
2003	USA	12	?	Queijo tipo mexicano	4b
2005	Suíça	3	1	Queijo mole	-

Fonte: adaptado de SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007.

No Brasil, ainda não existem relatos de listeriose humana associada ao consumo de alimentos contaminados, no entanto, a bactéria *L. monocytogenes* tem sido isolada de uma ampla variedade de alimentos (DESTRO, 1996; ANTONIOLLO, 2001; LIMA, 2004; SILVA et al., 2006; NALÉRIO, 2007; CRUZ et al., 2008).

Ainda que *L. monocytogenes* esteja presente inicialmente em contagens baixas no alimento, sua capacidade de multiplicação durante a armazenagem refrigerada, proporciona um aumento em seus níveis (WHO/FAO, 2004), que pode causar casos de infecção, associados a este patógeno. Para tanto, o FDA (EUA) estabeleceu uma política de "tolerância zero" para esta espécie bacteriana em alimentos prontos para o consumo, isto é, sem níveis detectáveis permitidos (WHO/FAO, 2004). No Brasil, a legislação vigente (BRASIL, 2001), exige a avaliação deste microrganismo em queijos de média e alta umidade e, para que esses alimentos estejam próprios para o consumo, é necessária a ausência desta bactéria em 25g do produto analisado.

2.6 Patogênese da listeriose

L. monocytogenes é o agente etiológico da listeriose, causando uma grave doença bacteriana, que embora relativamente rara (BERRANG et al., 2005), representa a segunda causa mais conhecida de infecções humanas fatais, ocasionadas pelo consumo de alimentos contaminados, próximo as taxas de infecções por *Salmonella* (WIEDMANN, 2002). Apresenta uma alta taxa de mortalidade, em torno de 20% a 30%, e a mais elevada taxa de internação hospitalar (90%) entre todos os agentes patogênicos de origem alimentar (ZHANG et al., 2004), os quais fazem desta bactéria uma importante preocupação em saúde pública. Além disso, estima-se que 2500 pessoas tornam-se gravemente doente com listeriose a cada ano, e que desses, aproximadamente 500 casos evoluam para óbito (CAI et al., 2002).

A listeriose é clinicamente definida quando o organismo é isolado do sangue, fluido cérebro-espinhal, ou outro local normalmente estéril (LINDSTEDT et al., 2008; RAMASWAMY et al., 2007), sendo caracterizada por um período de incubação, que pode variar de 7 a 60 dias (WIEDMANN, 2002; FUGETT et al., 2007). Em adultos, a doença é 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, 2005; LIU et al., 2006; RAMASWAMY et al., 2007). Em mulheres grávidas, a listeriose pode ser transmitida ao feto através da placenta. Frequentemente, durante a gravidez, a infecção da mãe pode ser assintomática ou caracterizada por uma doença com sintomas semelhante à gripe, com febre, mialgia e cefaléia (LEMES-MARQUES; CRUZ; DESTRO, 2007). Isto pode, no entanto, conduzir a graves consequências, incluindo parto prematuro, aborto espontâneo, morte fetal, ou graves problemas de saúde para o recém-nascido (ILSI, 2005; LEITE et al., 2006; SPERRY et al., 2008).

A susceptibilidade do hospedeiro desempenha um papel importante na apresentação da doença clínica. Assim, muitos pacientes com listeriose têm um comprometimento fisiológico ou patológico que afetam a sua imunidade celular (FARBER; PETERKIN, 1991; VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001). Dessa maneira, *L. monocytogenes* é considerada uma bactéria oportunista (COSSART; TOLEDO-

ARANA, 2008), uma vez que produz principalmente doença em indivíduos com o sistema imune comprometido (BORUCKI et al., 2004; THÉVENOT et al., 2006).

Em indivíduos suscetíveis, células viáveis deste patógeno ingeridas com os alimentos contaminados, podem atravessar a barreira intestinal e entrar na circulação, multiplicar-se no fígado e baço e, na ausência de uma adequada resposta imune, propagar-se para os órgãos-alvo, ou seja, sistema nervoso central e placenta (VÁZQUEZ-BOLAND et al, 2001; COSSART; TOLEDO-ARANA, 2008).

Pacientes imunossuprimidos, crianças recém-nascidas, idosos e mulheres grávidas, constituem a população de risco para a listeriose (AUTIO et al., 2002; RAMASWAMY et al., 2007). Porém, dentro destas populações, é possível identificar subpopulações, que são mais suscetíveis à doença do que outras, como pessoas que sofreram transplantes, pacientes com câncer ou HIV positivo ou com alguma outra doença grave que comprometa o sistema imune (ILSI, 2005; WHO/FAO, 2005).

Em contrapartida, a forma não invasiva da listeriose, se apresenta como gastroenterite febril, e é induzida quando indivíduos saudáveis consomem um alimento contaminado com grande número de bactérias (GRAVES et al., 2005; ILSI, 2005).

A dose mínima necessária para a bactéria causar infecção clínica em seres humanos ainda não foi determinada (FARBER; PETERKIN, 1991), no entanto, o número de *L. monocytogenes* detectada 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). É de se esperar que o número de células que causam a doença, possa variar dependendo de diversos fatores, dos quais os mais importantes são as diferenças entre a virulência das cepas bacterianas e suscetibilidade do hospedeiro (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Após a entrada de *L. monocytogenes* no organismo do hospedeiro, este pode se multiplicar dentro de macrófagos, bem como pode induzir a sua entrada em diversos tipos de células, que normalmente não são fagocíticas, como células epiteliais intestinais e hepatócitos (COSSART, 2002; RAMASWAMY et al., 2007). O ciclo infeccioso intracelular de *L. monocytogenes* é constituído por quatro fases distintas: 1) adesão e internalização dentro da célula hospedeira; 2) escape da vesícula fagocítica para dentro do citoplasma; 3) multiplicação e movimentação pelo

citoplasma da célula hospedeira devido à polimerização; 4) formação da cauda de actina; e a passagem para as células adjacentes (ILSI, 2005).

Embora a listeriose possa ser causada por todos os 13 sorotipos de *L. monocytogenes*, os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b tem sido responsáveis pela maior parte dos casos humanos (VAZQUEZ-BOLAND et al., 200; BORUCKI; CALL, 2003; TORRES et al., 2005). *L. monocytogenes* sorotipo 4b foi responsável por 60% dos casos de listeriose humana reportados no Japão, enquanto que as cepas do sorotipo 1/2b foram responsáveis por outros 30%, com predominância similar à relatada em outros países (NAKAMA et al., 1998).

No Brasil, os primeiros casos comprovados de meningite por *L. monocytogenes*, ocorreram em pacientes do Distrito Federal em 1989, embora somente tenham sido descritos em 1998. Os pacientes foram um bebê com 10 dias de vida, uma criança de 8 anos e uma mulher com lúpus eritematoso sistêmico, e a identificação sorológica revelou em dois casos, a presença do sorotipo 4b e, em outro caso, o sorotipo 1/2a, caso esse que evoluiu para o óbito (HOFER, NASCIMENTO; OLIVEIRA, 1998).

Segundo Hofer, Reis e Hofer (2006), a ocorrência de *L. monocytogenes* em humanos no Brasil, não é um fato inusitado, inclusive reproduzindo resultados similares aos de outras partes do mundo quanto à prevalência de sorotipos.

2.7 Sorotipificação

A sorotipagem é uma ferramenta clássica, utilizada para promover a diferenciação de cepas de patógenos de origem alimentar. É baseada no fato de que diferentes cepas da mesma espécie bacteriana diferem quanto aos antígenos apresentados na superfície celular e podem ser detectados por anticorpos e anti-soros específicos (WIEDMANN, 2002).

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; MARTH, 1999), que serão identificadas e determinadas com base nos antígenos somático (O) e flagelar (H).

A sorotipagem, mesmo com benefícios epidemiológicos limitados, devido ao seu insuficiente poder discriminatório, por discriminar bactérias de acordo com suas características fenotípicas, tem fornecido informações rápidas para o rastreamento

de surtos por *L. monocytogenes* durante as investigações preliminares (CHASSEIGNAUX et al., 2001; LUKINMAA et al., 2003; THÉVENOT et al., 2006).

Interessantemente, 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; CALL, 2003), o que sugere que o sorotipo 4b é mais bem adaptado aos tecidos de células de hospedeiros mamíferos do que o sorogrupo 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, 2002).

Qualquer cepa de *L. monocytogenes* pode ser considerada potencialmente patogênica para humanos. Várias observações sugerem que esse microrganismo apresenta virulência heterogênea entre as cepas, os quais estariam associados, de alguma forma, com o potencial de virulência do microrganismo (JACQUET et al., 2002).

Muito embora os sorotipos envolvidos em surtos e casos clínicos sejam frequentemente os mesmos, faz-se necessário uma tipificação com técnicas que apresentem maior poder discriminatório (VON LAER, 2004). Para tanto, a PFGE tem sido intensamente utilizado, com o objetivo de atingir maior discriminação das cepas de *L. monocytogenes*, quando comparada os resultados da sorotipagem (NANDON et al., 2001).

2.8 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

L. monocytogenes apresenta grande variabilidade genética, com cepas demonstrando diferença no seu potencial de virulência, entretanto, o conhecimento detalhado da diversidade dessas cepas, é ainda insuficiente. Para tanto, métodos fenotípicos e genotípicos têm sido desenvolvidos para determinar a diferenciação de *L. monocytogenes* em subtipos e grupos clonais, a fim de melhorar nosso entendimento sobre sua habilidade de causar surtos e doenças em humanos (WIEDMANN, 2002; RAGON et al., 2008).

Vários métodos genotípicos baseados em fragmentos de DNA têm sido desenvolvidos para subtipificar *L. monocytogenes* (WIEDMANN, 2002). Destes, destacam-se o Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso - RAPD (MARTINEZ at

al., 2003), o Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos Amplificados – AFLP (AUTIO et al., 2003), assim como a PFGE (AUTIO et al., 2003; ZHANG et al., 2007).

A PFGE tem demonstrado ser particularmente útil para o agrupamento e diferenciação de patógenos bacterianos (AUTIO et al., 2002; REVAZISHVILI et al., 2004). Embora a sensibilidade e a discriminação da PFGE dependam do microrganismo a ser subtipado e das enzimas de restrição que serão utilizadas, esta técnica é o “padrão ouro” para a subtipificação de bactérias patogênicas em alimentos, em investigações epidemiológicas (GRAVES; SWAMINATHAN, 2001; HUNTER et al., 2005). Devido à sua sensibilidade, alto poder discriminatório, padronização e reprodutibilidade, é atualmente reconhecida como a mais importante técnica de tipificação para *L. monocytogenes* (WIEDMANN, 2002) sendo utilizada com sucesso para a caracterização epidemiológica dos isolados envolvidos em casos esporádicos e em surtos de listeriose humana, tanto clínicos, quanto de alimentos (KEROUANTON et al., 1998; VELA et al., 2001; THÉVENOT et al., 2006), por permitir a identificação de subtipos específicos que não puderam ser distinguidos previamente pela sorotipificação (BORUCKI et al., 2004).

É uma técnica derivada da eletroforese convencional do DNA em gel de agarose, tendo como principal diferença, a mudança repetida da orientação do campo elétrico (TENOVER et al., 1995; HERSCHLEB; ANANIEV; SCHWARTZ; 2007). Uma endonuclease de restrição específica cliva enzimaticamente o DNA cromossômico em uma sequência específica de nucleotídeos. O número e o tamanho dos fragmentos gerados refletem a frequência e a distribuição destes sítios de restrição (DESTRO, 1995). A análise do DNA genômico pode ser feita empregando-se endonucleases de restrição que clivam tanto o DNA em regiões encontradas frequentemente, como naquelas infrequentes.

Para tipificar *L. monocytogenes* através desta técnica, as enzimas de restrição comumente utilizadas são *Ascl* e *Apal* (GRAVES; SWAMINATHAN, 2001), que são endonucleases de baixa frequência de corte, as quais, quando empregadas na digestão do DNA, geram de 10 a 20 fragmentos visíveis, com pesos moleculares distintos. Após a digestão, estes fragmentos de DNA bacteriano são separados por eletroforese, utilizando a PFGE. Após a coloração e visualização das bandas no gel, estas são analisadas em programas computacionais especializados, permitindo uma rápida e fácil comparação entre os perfis obtidos, os quais são agrupados em subtipos, também referidos como pulsotipos (AUTIO et al., 2002).

O PulseNet é uma rede internacional de subtipagem molecular para bactérias associadas a doenças de origem alimentar, desenvolvido e gerenciado pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), dos Estados Unidos, que utiliza a PFGE como um método fundamental para a detecção de cepas que poderão possivelmente estar relacionadas a surtos (SPERRY et al., 2008). Quando os grupos de isolados com perfis de PFGE similares são detectados, os laboratórios de saúde pública que constituem o PulseNet, compartilham estes dados com epidemiologistas, os quais realizarão investigações sobre o histórico dos alimentos envolvidos, de forma a traçar a origem do microrganismo (MONTVILLE; MATTHEWS, 2005). Os laboratórios PulseNet utilizam os perfis submetidos ao banco de dados da rede para detectar grupos de casos, identificar o aumento na ocorrência de subtipos específicos e identificar possíveis surtos (SPERRY et al., 2008).

Para assegurar que os padrões de PFGE de diferentes géis e até mesmo de diferentes laboratórios possam ser comparados com precisão no banco de dados do PulseNet, *Salmonella enterica* sorotipo Braenderup, cepa H9812, foi estabelecida como marcador de tamanho padrão universal para análises de PFGE de todos os patógenos bacterianos causadores de surtos alimentares (HUNTER et al., 2005). O objetivo de um marcador de tamanho padrão é normalizar as imagens eletrônicas e corrigir variações que possam existir entre os géis que foram gerados por diferentes laboratórios, como por exemplo, o tempo de corrida da eletroforese, permitindo que bactérias patogênicas de diferentes locais do mundo possam ter seus perfis comparados no banco de dados (HUNTER et al., 2005).

3 Materiais e Métodos

3.1 Cepas bacterianas

Foram analisadas 44 cepas de *L. monocytogenes*, de diferentes fontes, originárias da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas.

Estas cepas foram provenientes de quatro diferentes origens de alimentos (carcaça de ovinos, queijo artesanal tipo Minas, linguiça mista frescal, carcaça de frangos) e de amostras de três indústrias de alimentos (planta de linguiça mista frescal, frigorífico abatedouro de frangos e frigorífico abatedouro de ovinos). Além dessas, foram utilizadas cepas isoladas a partir de *swab* cloacal de frangos em aviários comerciais e de manipuladores de alimentos. Todas as cepas foram obtidas entre 2001 e 2006, na região sul do Rio Grande do Sul, Brasil.

A cepa controle estabelecida como padrão universal para PFGE, *Salmonella enterica* sorotipo Braenderup (H9812), foi utilizada com a finalidade de servir de referência para a análise comparativa entre os pulsotipos.

3.2 Sorotipificação

Todas as cepas de *L. monocytogenes* foram caracterizadas por sorotipagem pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

3.3 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

A técnica de PFGE seguiu o protocolo preconizado pelo CDC (GRAVES; SWAMINATHAN, 2001), com adaptações:

3.3.1 Suspensão celular

As células foram cultivadas em caldo Triptona de Soja com 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE) e incubadas por 18h a 37°C. A seguir, determinou-se a absorbância da suspensão celular a 578nm e a densidade ótica foi ajustada para 0,3 (SCHWARZ; LIEBISCH, 1994; BESSA, 2006).

A partir dessa suspensão, foram transferidos 240µL de cada solução de células bacterianas para microtubos tipo eppendorf de 1,5mL, aos quais foram

adicionados 60 μ L de solução de lisozima (10mg mL⁻¹) (Sigma). Os tubos foram cuidadosamente homogeneizados e, a seguir, incubados em banho-maria a 37°C por 10 minutos.

3.3.2 Solução SSP

A solução SSP [1,2% de agarose Pulsed Field (Bio-Rad), 1% de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) (Invitrogen) e 0,2mg.mL⁻¹ de proteinase K (LGC Bio)] foi preparada de acordo com a seguinte proporção para cada cepa: 30 μ L de SDS 10%, 267 μ L de agarose a 1,2% e 3 μ L de proteinase K a 20mg. mL⁻¹.

3.3.3 Blocos de agarose

Aos microtubos contendo a suspensão de células em lisozima, foram adicionados 300 μ L de solução SSP aquecida a 56°C. Os microtubos foram, homogeneizados e, imediatamente, a suspensão foi dispensada nos moldes para blocos. A solidificação foi realizada a temperatura de refrigeração (7°C) por 10 minutos.

3.3.4 Lise celular

O tampão de lise foi preparado utilizando-se 4mL de solução de lise (50mM Tris-HCL, 50 mM EDTA pH 8,0, 1% de sarcosina e 0,15mg.mL⁻¹ de proteinase K) para cada amostra. Após a solidificação, os blocos de agarose foram transferidos para tubos tipo Falcon contendo 4mL do tampão de lise e, em seguida, foram incubados por 2 horas em banho-maria a 54°C.

3.3.5 Lavagens

Após a lise, os blocos de agarose foram lavados. Realizaram-se duas lavagens por 10 minutos cada, com água bidestilada estéril (pré-aquecida a 54°C) sob agitação constante. Em seguida, foram realizadas 4 lavagens com tampão TE pH 8,0 (pré-aquecido a 54°C), com duração de 15 minutos cada. Após a última lavagem, os blocos de agarose foram armazenados em microtubos tipo eppendorf com 900 μ L de tampão TE, e mantidos sob refrigeração, até a restrição.

3.3.6 Restrição do DNA cromossomal

Os blocos de agarose contendo o DNA cromossomal foram cortados em fatias de aproximadamente 2mm cada, as quais foram submetidas à digestão com as enzimas de restrição. As cepas de *L. monocytogenes* foram digeridas com as enzimas *Apal* e *Ascl* (New England BioLabs) e a cepa padrão de *Salmonella enterica* sorotipo Braenderup, com a enzima *Xbal* (Fermentas, Glen Burnie). A digestão foi realizada *overnight* a 25°C para a enzima *Apal*, com uma concentração de 160U μL^{-1} (4 μL /amostra), e a 37°C para as enzimas *Ascl* e *Xbal*, com concentrações de 25U μL^{-1} (2,5 μL /amostra) e 10U μL^{-1} (2 μL /amostra), respectivamente.

Quadro 2: Sítios de clivagem para as endonucleases de restrição *Apal* e *Ascl*.

	<i>Ascl</i>	<i>Apal</i>
Sítios de clivagem	5'... GG [▽] CGCGCC...3' 3'... CCGCGC [▲] GG...5'	5'... GGGCC [▽] C...3' 3'... C [▲] CCGGG...5'

3.3.7 Eletroforese em gel de campo pulsado

Os produtos da digestão enzimática foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,0 % agarose Pulsed Field, BioRad) em tampão TBE 0,5X (0,9M Tris base, 0,9 M ácido bórico, 0,02 M EDTA), sendo os fragmentos separados em um aparelho CHEF-DR II (BioRad), em temperatura de 14°C, durante um período de 23 horas a 6 V.cm⁻¹. O tempo de pulso inicial foi de 4 segundos e o tempo final de 40 segundos. Após a corrida, o gel de agarose foi corado em solução de brometo de etídio (100 μL . L⁻¹) por 5 minutos e descorado por 15 minutos em água destilada sendo, posteriormente, examinado sob transiluminação em luz ultra-violeta. A imagem foi capturada com o auxílio do transiluminador High Performance UV Transilluminator, UVP.

3.3.8 Análise dos resultados

Os perfis de macrorestrição gerados com cada uma das enzimas foram comparados visualmente e agrupados. Os resultados obtidos com cada enzima foram combinados e a correlação entre os perfis foi avaliada com o programa computacional BioNumerics v 5.10 (Applied-Maths, Belgium), utilizando-se o

coeficiente de similaridade Dice, com 1% de confiança. Os grupamentos foram determinados por *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean* (UPGMA) e *Similarity Average from Experiments*. Todos os resultados foram analisados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP).

3.4 Determinação do Índice de Discriminação (D)

O poder de discriminação foi determinado pelo Índice de Discriminação (Quadro 1), descrito por Hunter & Gaston (1988). O valor D indica a probabilidade de dois isolados selecionados ao acaso na população testada serem classificados em grupos diferentes.

Quadro 1. Fórmula para determinação do índice discriminatório

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1), \text{ onde}$$

N = número total de amostras

n = número de amostras encontradas em cada um dos perfis analisados

4 Resultados e Discussão

4.1 *L. monocytogenes* em alimentos e ambientes de processamento na região sul do Rio Grande do Sul

Neste estudo, foram avaliadas 44 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em diferentes origens: alimentos distintos e amostras ambientais e de manipuladores de alimentos de três plantas de processamento, da região sul do Rio Grande do Sul. Estas cepas foram obtidas em estudos prévios realizados pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCTA/FAEM/UFPel.

Foram selecionadas 29 cepas provenientes de alimentos, 13 de amostras ambientais, uma da cloaca de frangos e uma de manipulador de alimentos. Das cepas provenientes de alimentos, 4 foram isoladas de carcaças de ovino, 8 de queijo artesanal tipo Minas, 9 de carcaças de frango e 8 de linguiça mista frescal. Com relação às cepas isoladas de equipamentos, foram selecionadas 6 cepas da Planta A (linguiça mista frescal), sendo uma (1) do carrinho de aço inox que transporta a matéria-prima, uma (1) de caixa plástica para armazenamento da matéria-prima, uma (1) da mesa de manipulação da matéria-prima, uma (1) da embutideira, uma (1) do moedor, uma (1) do amarrador (Figura 5). Da Planta B (frigorífico abatedouro de frangos), foram selecionadas 7 cepas, sendo uma (1) do chão da evisceração, uma (1) do dreno da sala de resfriamento, uma (1) das escovas da depenadeira, uma (1) da esteira de cortes antes do abate, uma (1) do estrado da mesa de transpasse, uma (1) da mesa de separação de miúdos e uma (1) da esteira de cortes no final abate (Figura 6).

A ocorrência de *L. monocytogenes* em ambientes de processamento de alimentos tem sido constantemente observada, tornando-se o foco de estudo de diversos pesquisadores, os quais descrevem que esse tipo de contaminação é bastante importante na contaminação do produto final por *L. monocytogenes* (AUTIO et al., 1999; DAUPHIN; RAGIMBEAU; MALLE, 2001; AUTIO et al., 2003; GUDMUNDSDÓTTIR et al., 2005; THÉVENOT et al., 2006; LOMONACO et al., 2009). Como exemplo, cita-se a pesquisa de Chasseignaux et al. (2002), que avaliaram *L. monocytogenes* no ambiente de plantas de processamento de frango e de suíno e encontraram 23,7% (118/497) das amostras contaminadas com o patógeno. Recentemente, Lopéz et al. (2008), pesquisaram a incidência de *L.*

monocytogenes em produtos e no ambiente de processamento de um frigorífico abatedouro de suínos, e verificaram que de um total de 250 amostras, 161 apresentavam-se contaminadas por esse microrganismo.

É relevante destacar que a presença de *L. monocytogenes* nos equipamentos e utensílios nas duas plantas de processamento avaliadas neste estudo (Plantas A e B) é uma indicação de processos de higienização (limpeza e sanitização) ineficientes, pois as superfícies dos equipamentos foram amostradas imediatamente antes do início das atividades diárias de abate e processamento (von LAER, 2004; NALÉRIO, 2007). Esses equipamentos e utensílios podem ser responsáveis pela contaminação dos produtos finais, bem como pela permanência de *L. monocytogenes* em unidades de processamento de alimentos, tendo em vista que algumas cepas de *L. monocytogenes* podem permanecer por meses, e até anos, nestes locais (AUTIO et al., 1999; BERRANG et al., 2005; FUGETT et al., 2007). A técnica de PFGE permitiu verificar que isso ocorreu nas duas plantas de processamento avaliadas, como será demonstrado posteriormente.

4.2 Sorotipificação das cepas de *L. monocytogenes* isoladas na região sul do Rio Grande do Sul

Todas as 44 cepas de *L. monocytogenes* foram caracterizadas sorologicamente, das quais 38,6% (17) pertenciam ao sorotipo 1/2b, 25,1% (11) ao sorotipo 1/2c, 13,6% (6) ao sorotipo 1/2a, 13,6% (6) ao sorotipo 4b, 6,8% (3) ao sorotipo 4e e 2,3% (1) ao sorotipo 3a. A distribuição dos sorotipos em função da origem da cepa (alimento e ambiente de processamento) pode ser observada na Tabela 3.

Tabela 3. Distribuição de sorotipos de *L. monocytogenes* isoladas em distintos ambientes de processamento e em alimentos adquiridos a partir da indústria e do comércio, no sul do Rio Grande do Sul.

Origem	Sorotipos					Total	
	1/2a	1/2b	1/2c	3ab	4b		4e
Planta A¹							
- Linguíça mista	(-)	3	3	(-)	2	(-)	8
- Ambiente	(-)	(-)	6	(-)	(-)	(-)	6
- Manipulador	(-)	(-)	1	(-)	(-)	(-)	1
Planta B²							
- Carcaça de frango	(-)	3	(-)	(-)	(-)	(-)	3
- Ambiente	(-)	5	(-)	(-)	2	(-)	7
Planta C³							
- Carcaça de ovino	1	1	1	1	(-)	(-)	4
Comércio⁴							
- Queijo artesanal	3	3	(-)	(-)	2	(-)	8
- Frango refrigerado	2	2	(-)	(-)	(-)	2	6
Aviário⁵							
- cloaca de frango	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1	1
Total	6	17	11	1	6	3	44
Porcentagem (%)	13,6	38,6	25,1	2,3	13,6	6,8	100

¹ Planta de processamento de linguiça mista frescal; ² Frigorífico abatedouro de frangos; ³ Frigorífico abatedouro de ovinos; ⁴ Comércio; ⁵ Aviário; Número de cepas; (-) Não detectado.

Houve prevalência do sorogrupo 1/2 (77,3%), o que vem ao encontro de resultados obtidos em outras pesquisas, que também demonstraram que os sorotipos 1/2a, 1/2b e 1/2c, pertencentes a este sorogrupo, são os mais frequentemente isolados de alimentos e ambientes de processamento de alimentos (DAUPHIN et al., 2001; AARNISALO et al., 2003; THÉVENOT et al., 2006; LOPÉZ et al., 2008). Lawrence; Gilmour (1995) sugerem que o isolamento recorrente de cepas do sorogrupo 1/2 em uma ampla variedade de alimentos e de plantas de processamento, pode estar relacionado aos antígenos de superfície presentes nas cepas pertencentes a este sorogrupo, o que, provavelmente, facilitaria sua habilidade em colonizar equipamentos no ambiente de processamento.

As cepas do sorotipo 1/2a (n=6), interessadamente, só foram isoladas em alimentos, das quais, uma cepa foi isolada em carcaça de ovino, duas em carcaças de frango (Marcas A e B), e três em queijo artesanal tipo Minas Frescal. Chasseignaux et al. (2001) avaliaram o ambiente e equipamentos de duas diferentes plantas de processamento de carnes de frango e suíno, bem como, o produto final, e detectaram que 64% (321/502) de todos os isolados pertenciam ao sorotipo 1/2a. Resultado semelhante, também foi verificado por Thévenot et al. (2006), que encontraram 49,9% (513/1028) dos isolados obtidos a partir de amostras de carne suína salgada e do ambiente de 13 plantas de processamento de produtos suínos curados, pertencendo a esse sorotipo.

O sorotipo 1/2b foi o mais prevalente neste estudo, tendo sido obtido tanto a partir de amostras de alimentos (n=10) quanto de amostras ambientais (n=7). Nesta

mesma região geográfica, Nálério (2007) também observou a prevalência desse sorotipo na cadeia produtiva de frangos, verificando que 66,3% (55/83) dos isolados foram 1/2b.

O sorotipo 1/2c foi isolado em alimentos e em amostras do ambiente da Planta A (Tabela 3). Diversas pesquisas relatam que este sorotipo é frequentemente encontrado em alimentos, porém, raramente é implicado em casos de listeriose (KATHARIOU et al., 2002). Segundo Vitas, Aguado e Garcia-Jalon (2004), o fato do sorotipo 1/2c nunca ter sido envolvido em surtos de listeriose, contrasta com a frequência de isolamento deste sorotipo em alimentos.

Cepas sorotipo 4b (n=6) foram isoladas t em alimentos na Planta A e em amostras ambientais da Planta B. Sabe-se, que apesar dos isolados pertencentes ao sorotipo 4b possuem capacidade patogênica comprovada (BORUCKI; CALL, 2003; TORRES et al., 2005), estes não são prevalentes em alimentos. Entretanto, segundo Bruhn, Vogel; Gram (2005), cepas pertencentes a esses sorotipos são mais sensíveis aos meios seletivos de enriquecimento utilizados para o isolamento de *L. monocytogenes* do que os demais sorotipos, fato este que subestimaria sua presença em alimentos.

Cepas do sorotipo 4e (n=3) foram isoladas apenas na cadeia produtiva de frangos. Uma foi isolada em cloaca de frango nas granjas de criação, e duas em frango refrigerado em nível de comércio. A baixa prevalência desse sorotipo, está de acordo com os resultados encontrados por Thévenot et al. (2006), que estudaram a distribuição de sorotipos de *L. monocytogenes* em amostras de carne salgada suína, e detectaram que somente 0,1% estavam contaminadas com cepas 4e.

Os dados obtidos neste estudo corroboram resultados de outras pesquisas, de que há predominância dos sorotipos 1/2a, 1/2b e 1/2c em alimentos e no ambiente de processamento de alimentos (DAUPHIN et al, 2001; MIETTINEN et al., 2001 AARNISALO et al., 2003; THÉVENOT et al., 2006; LÓPEZ et al., 2008). Além disso, demonstraram que a maioria (65,9%) das cepas isoladas na região pertence aos sorotipos mais envolvidos em casos e surtos de listeriose em todo o mundo (4b, 1/2a e 1/2b).

4.3 Tipificação por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

As cepas de *L. monocytogenes* foram submetidas à digestão por endonucleases de restrição de baixa frequência de corte, seguida da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Como o DNA genômico dessa bactéria apresenta aproximadamente 38% de G+C (SEELIGER; JONES, 1986), o emprego de endonucleases de restrição que reconheçam sítios do DNA ricos em guanina e citosina, como é o caso das enzimas utilizadas neste estudo, *Ascl* e *Apal* (Quadro 2), originou um número restrito de fragmentos, facilitando a interpretação dos resultados. É importante reforçar que vários pesquisadores têm demonstrado que a combinação dessas duas enzimas fornece uma adequada discriminação de *L. monocytogenes* (AUTIO et al., 2002; AARNISALO et al., 2003; REVAZISHVILI et al., 2004; LEITE et al., 2006; NEVES et al., 2008). Além disso, o protocolo utilizado pelo CDC PulseNet para tipificação de *L. monocytogenes* preconiza a utilização dessas duas enzimas, pelo fato dos padrões de banda gerados para ambas as enzimas, situarem-se dentro da mesma faixa de tamanho, o que exige apenas um único padrão de referência (GRAVES; SWAMINATHAN, 2001).

A genotipagem das 44 cepas de *L. monocytogenes* e a comparação visual dos padrões de macrorestrição gerados pelas enzimas *Ascl* e *Apal*, revelou 20 e 21 Perfis de Digestão por Endonucleases (PDEs), aos quais foram atribuídos números e letras, respectivamente. O número de bandas para *Ascl*, variou entre 6 e 14, sendo o PDE 14 o perfil mais frequente, agrupando 8 das 44 cepas de *L. monocytogenes*. Com a endonuclease *Apal*, o número de bandas variou entre 10 e 22, e o PDE N foi o perfil predominante, também reunindo 8 das 44 cepas analisadas (Tabela 4). O poder discriminatório para a PFGE, utilizando a endonuclease *Ascl* foi $D=0,94$, enquanto para a *Apal*, o valor D foi de 0,95.

Tabela 4. Perfil de digestão pelas endonucleases *Ascl* e *Apal* de 44 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em alimentos e ambiente de processamento na região sul do Rio Grande do Sul, analisadas por PFGE.

Cepa	Perfil de Digestão por Endonuclease (PDE) - <i>Ascl</i>	Cepa	Perfil de Digestão por Endonuclease (PDE) - <i>Apal</i>
27/32/39/58	PDE 1	29	PDE A
33/34/60/62	PDE 2	32	PDE B
40	PDE 3	58	PDE C
37	PDE 4	40	PDE D
12	PDE 5	33/34/60/62	PDE E
29	PDE 6	37	PDE F
9/10/11	PDE 7	27/39	PDE G
1/6	PDE 8	9/10/11	PDE H
5	PDE 9	12	PDE I
2/3/4	PDE 10	1/6	PDE J
16	PDE 11	2/3/4	PDE K
26	PDE 12	5	PDE L
18	PDE 13	23/52	PDE M
22/23/42/43/44/45/ 50/ 51	PDE 14	14/16/17/22/26/44/ 50/51	PDE N
20/41/52	PDE 15	20/41	PDE O
19	PDE 16	18/19/42	PDE P
14/17	PDE 17	43/45	PDE Q
7/73	PDE 18	66/70	PDE R
70/71	PDE 19	7/8	PDE S
8/66	PDE 20	71	PDE T
-	-	73	PDE U

Autio et al. (2002) utilizaram PFGE para tipificar 295 cepas de *L. monocytogenes* pertencentes a uma coleção de culturas isoladas a partir de diferentes produtos alimentícios e observaram que, diferentemente dos resultados encontrados neste estudo, a enzima *Ascl* apresentou um maior poder discriminatório que a enzima *Apal*, originando 61 padrões de macrorestrição comparados com os 47 padrões obtidos com *Apal*, sendo que a combinação dos padrões obtidos com as duas enzimas, resultaram em 66 pulsotipos. Em contrapartida, Gudmundsdóttir et al. (2005) caracterizaram por PFGE 201 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de salmão defumado e do seu ambiente de processamento, utilizando as mesmas endonucleases de restrição, e obtiveram 16 perfis para *Ascl*, 22 para *Apal*, e 24 diferentes pulsotipos.

Neste estudo, as duas enzimas geraram um número muito próximo de perfis (20 perfis para *Ascl* e 21 perfis para *Apal*). Já Cruz et al. (2008), analisaram 179

cepas de *L. monocytogenes* isoladas em uma linha de processamento de salmão, as quais geraram 28 perfis com *Ascl*, 30 com *Apal*, e 61 pulsotipos.

Verifica-se que não existe uma endonuclease de restrição que possa ser considerada a mais discriminatória para a técnica de PFGE, pois o número de perfis obtidos para cada enzima varia de acordo com as características genéticas individuais de cada cepa, recomendando-se, portanto, o uso conjunto de duas enzimas, a fim de que se possa obter um aumento do poder discriminatório da técnica. Neste sentido, Fugett et al. (2007), relatam que a combinação de *Apal* e *Ascl* apresentou significativamente maior poder discriminatório do que quando foi utilizada uma única enzima, ressaltando a importância da utilização de pelo menos duas enzimas para tipificação de *L. monocytogenes* por PFGE.

Nas Figuras 1, 2, 3 e 4 podem ser observadas as fotos dos géis de agarose com os diferentes perfis obtidos com as endonucleases de restrição *Ascl* e *Apal* em 44 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em alimentos e ambiente da região de Pelotas, RS.

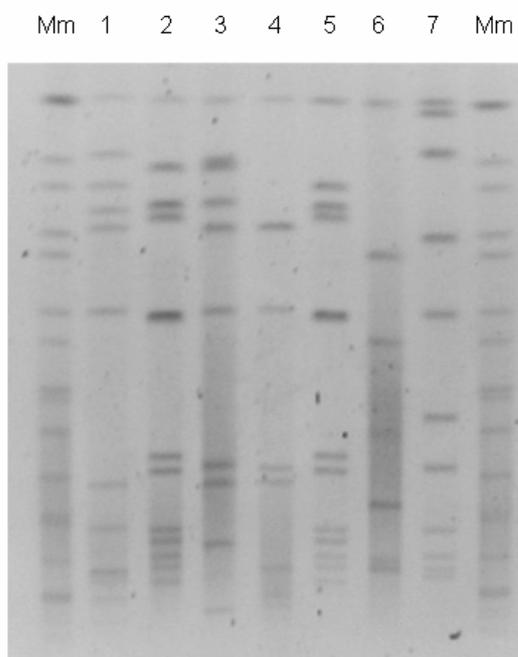


Figura 1 Perfis genotípicos por PFGE do DNA genômico de *L. monocytogenes* obtidos com a enzima *Ascl*. Marcador de Peso Molecular: *S. enterica* sorotipo Braenderup H 9812 digerida com *XbaI*. Linhas Mm: *S. enterica* sorotipo Braenderup H 9812. Linha 1: PDE 1. Linha 2: PDE 2. Linha 3: PDE 3. Linha 4: PDE 4. Linha 5: PDE 5. Linha 6: PDE 6. Linha 7: PDE 7.

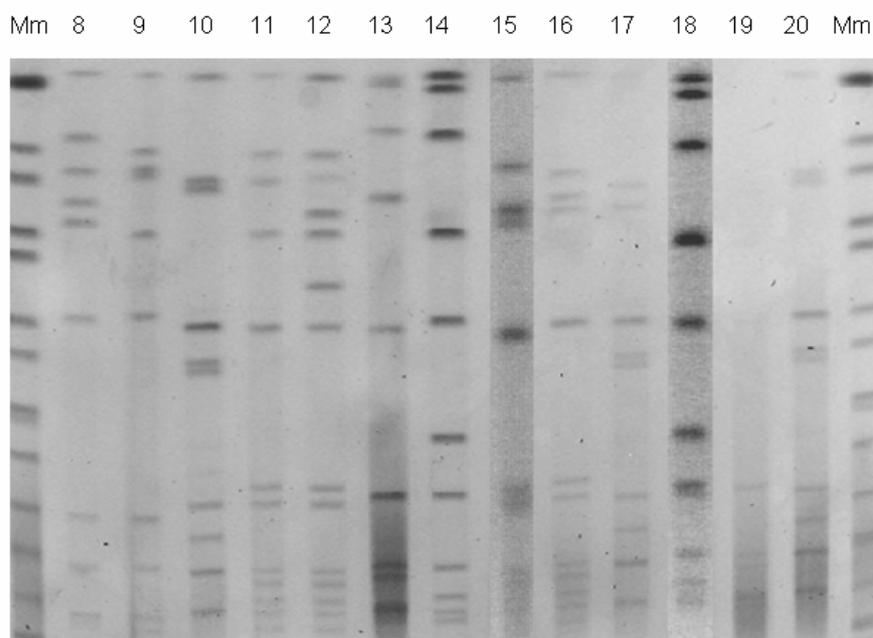


Figura 2 Perfis genotípicos por PFGE do DNA genômico de *L. monocytogenes* obtidos com a enzima *Ascl*. Marcador de Peso Molecular: *S. enterica* sorotipo Braenderup H 9812 digerida com *Xba*I. Linhas Mm: *S. enterica* sorotipo Braenderup H 9812. Linha 8: PDE 8. Linha 9: PDE 9. Linha 10: PDE 10. Linha 11: PDE 11. Linha 12: PDE 12. Linha 13: PDE 13. Linha 14: PDE 14. Linha 15: PDE 15. Linha 16: PDE 16. Linha 17: PDE 17. Linha 18: PDE 18. Linha 19: PDE 19. Linha 20: PDE 20.

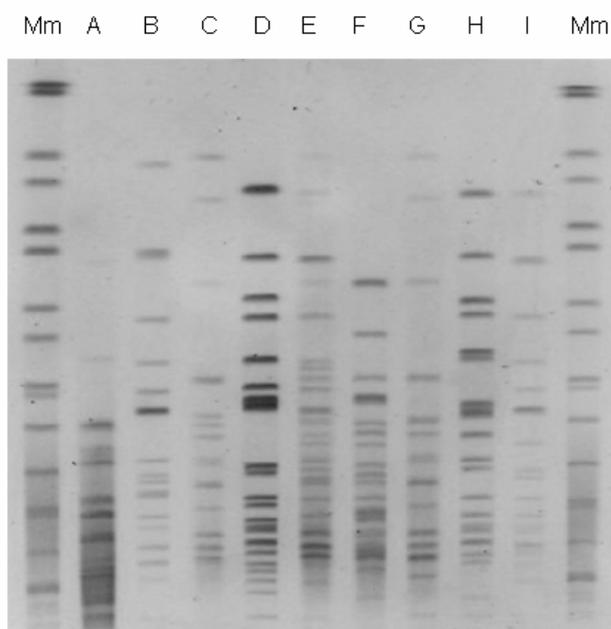


Figura 3 Perfis genotípicos por PFGE do DNA genômico de *L. monocytogenes* obtidos com a enzima *ApaI*. Marcador de Peso Molecular: *S. enterica* sorotipo Braenderup H 9812 digerida com *XbaI*. Linhas Mm: *S. enterica* sorotipo Braenderup H 9812. Linha A: PDE A. Linha B: PDE B. Linha C: PDE C. Linha D: PDE D. Linha E: PDE E. Linha F: PDE F. Linha G: PDE G. Linha H: PDE H. Linha I: PDE I.

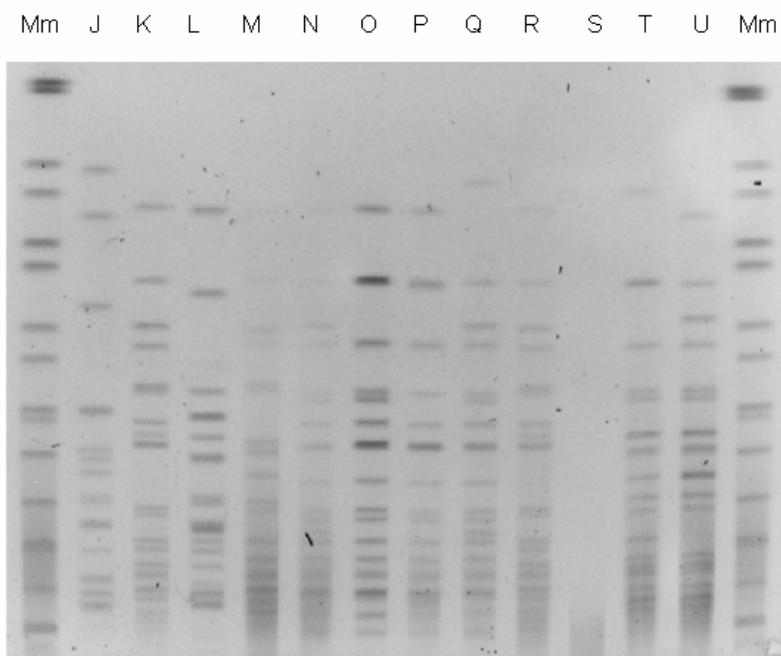


Figura 4 Perfis genotípicos por PFGE do DNA genômico de *L. monocytogenes* obtidos com a enzima *Apal*. Marcador de Peso Molecular: *S. enterica* sorotipo Braenderup H 9812 digerida com *Xba*I. Linhas Mm: *S. enterica* sorotipo Braenderup H 9812. Linha J: PDE J. Linha K: PDE K. Linha L: PDE L. Linha M: PDE M. Linha N: PDE N. Linha O: PDE O. Linha P: PDE P. Linha Q: PDE Q. Linha R: PDE R. Linha S: PDE S. Linha T: PDE T. Linha U: PDE U.

4.3.1 Disseminação de *L. monocytogenes* em uma planta de processamento de linguiça mista fresca (Planta A)

As cepas 27, 29, 32, 33, 34, 37, 39, 40, 58, 60 (sorotipo 1/2c), 18, 20, 41 (sorotipo 1/2b), 71 e 73 (sorotipo 4b) foram isoladas em uma planta de processamento de linguiça mista fresca (Planta A) durante os meses de novembro de 2002 a abril de 2003, com intervalos de aproximadamente 30 dias entre as coletas (Figura 5).

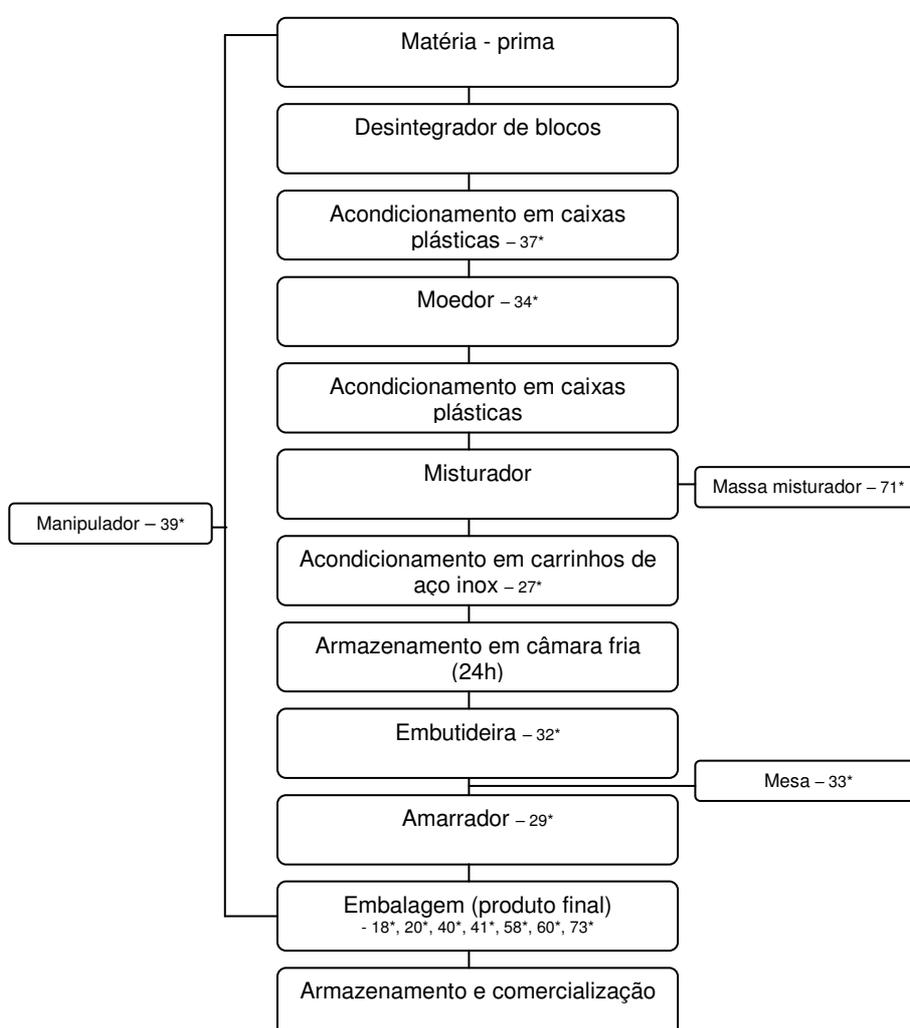


Figura 5 - Representação esquemática da linha de processamento de linguiça mista fresca (Planta A) e pontos de isolamento das cepas de *L. monocytogenes* genotipadas por PFGE. *Representa o número das cepas.

A fonte de contaminação do produto final por *L. monocytogenes* tem sido controversa nos diversos estudos descritos na literatura, porém, se observa que é bastante dependente do tipo de matéria-prima utilizada. Muitos pesquisadores

ênfatisam a importância das matérias-primas como uma fonte de contaminação (GUDMUNSDÓTTIR et al., 2005; THÉVENOT et al., 2006; CRUZ et al., 2008), enquanto outros destacam a importância dos equipamentos e do ambiente na disseminação da contaminação (AUTIO et al., 1999; DAUPHIN et al., 2001; LEITE et al., 2006).

Nessa indústria, a ausência de contaminação na matéria-prima, associada ao isolamento de cepas apresentando alta similaridade genética no ambiente de processamento da Planta A durante todo o período de coleta demonstram a persistência do patógeno. Esses resultados são reforçados pelo fato da amostragem ter sido realizada imediatamente antes do início das atividades. Além disso, há disseminação do patógeno no ambiente, o que pode ser confirmado pelo fato destas cepas terem sido isoladas em diferentes pontos de amostragem.

É difícil estabelecer a rota exata da disseminação, entretanto, os resultados obtidos nos dão uma boa visão geral do que está ocorrendo nessa planta de processamento.

As cepas 27, 32, 39 e 58 foram isoladas em um carrinho de aço inox utilizado para o transporte de carnes (1ª coleta), da embutideira (5ª coleta), de um manipulador (4ª coleta) e do produto final (2ª coleta), respectivamente. Estas cepas, quando clivadas com a endonuclease de restrição *Ascl*, apresentaram o mesmo perfil genotípico (PDE 1). No entanto, ao serem digeridas com a enzima *Apal*, observou-se que as cepas 32 e 58 foram separadas em perfis genotípicos distintos e únicos (PDEs B e C, respectivamente), enquanto as cepas 27 e 39 apresentaram novamente o mesmo perfil (PDE G), demonstrando a estreita relação clonal entre essas cepas (Tabela 4).

O carrinho de aço inox utilizado para o transporte da matéria-prima (carne) já estava contaminado antes do início das atividades de processamento e pode ter importante papel na disseminação de clones persistentes dentro dessa indústria, uma vez que cepas com pulsotipos similares àqueles encontrados neste ponto de amostragem foram isoladas em manipulador, na embutideira, e no produto final, em diferentes tempos de amostragem.

Por outro lado, as mãos dos manipuladores também podem desempenhar papel relevante na disseminação dos patógenos aos alimentos por meio da contaminação cruzada (LOMONACO et al., 2009), o que foi observado neste estudo, haja vista que cepas com perfil similar ao da cepa isolada no manipulador (PDE 1)

foram isoladas em outros pontos de coleta. Além disso, as cepas 27 (isolada no carrinho de inox) e 39 (isolada no manipulador) pertencem a um único clone, pois apresentaram perfil genético idêntico com as duas endonucleases de restrição (pulsotipo1G). É interessante ressaltar que a indústria avaliada (Planta A) é de pequeno porte, com um quadro de funcionários reduzidos, portanto, esses funcionários, não apresentavam uma função fixa durante o processo de produção, circulando por toda a área de processamento e podendo, assim, desempenharem diferentes funções em um único dia de trabalho, conforme relatado por LIMA (2004) durante a etapa de isolamento dessas cepas. Segundo Destro et al. (1996) e Autio et al. (1999), a importância dos funcionários na contaminação dos alimentos, pode ser maior se forem realizadas rotações de funções.

A importância dos manipuladores na contaminação por *L. monocytogenes* também foi destacada por Cruz et al. (2008) que avaliaram uma planta de processamento de salmão defumado, no Brasil, e observaram que a bactéria estava presente em 34% das amostras provenientes dos manipuladores. Quando caracterizaram por PFGE as cepas isoladas na indústria, observaram que as cepas isoladas nos manipuladores apresentavam o mesmo perfil genotípico daquelas isoladas na matéria-prima e no produto final. Os pesquisadores sugeriram que isto pode ter ocorrido devido ao fato de que nesta fábrica os manipuladores desempenhavam múltiplas funções e dependendo da necessidade podiam trabalhar no mesmo dia, tanto com a matéria-prima quanto com o produto final, semelhantemente ao observado na planta avaliada neste estudo.

As cepas 33, 34 e 60 foram isoladas de uma mesa de processamento (5ª coleta), do moedor (1ª coleta) e do produto final (5ª coleta), respectivamente. Estas cepas apresentaram os mesmos perfis genotípicos (pulsotipo 2E), sendo, portanto, consideradas idênticas (Tabela 4).

Esse clone foi encontrado no moedor na primeira coleta, o qual foi amostrado após a higienização, porém antes do início das atividades de processamento. O isolamento de cepas com perfil genético idêntico durante cinco meses, e seu isolamento no produto final após esse tempo, ressalta a importância da contaminação cruzada nessa indústria. Fica o questionamento, se esse clone persistiu e se manteve viável durante o período de amostragem, ou se foi continuamente introduzido na indústria. De qualquer forma, demonstra a utilização de práticas inadequadas de higienização, permitindo dessa maneira a persistência

deste clone em equipamentos e no ambiente de processamento da planta de linguiça mista frescal, ou sua contínua reintrodução.

Em relação a isso, diversos pesquisadores relatam que frequentemente os produtos podem tornar-se contaminados ao entrar em contato com as superfícies e equipamentos de trabalho, mesmo após as operações de rotina de limpeza e desinfecção. Segundo Thévenot et al. (2006) a persistência de *L. monocytogenes* no ambiente de processamento, deve-se a interação de dois fatores: limpeza e desinfecção ineficientes, pois a higienização, para ser eficaz, deve atingir o local de contaminação em quantidades e duração corretas, o que nem sempre ocorre devido à complexa estrutura da linha de processamento ou má concepção das máquinas; e a natureza das próprias cepas, pois algumas se adaptam melhor a ambientes de indústria.

As cepas 29, 37 e 40 apresentaram perfis genotípicos únicos (pulsotipos 6A, 4F e 3D, respectivamente) sendo, portanto, consideradas geneticamente distintas. A cepa 29 foi isolada do equipamento amarrador (2ª coleta), a cepa 37 foi obtida de uma caixa plástica utilizada para o transporte de carnes (1ª coleta), e a cepa 40 foi isolada do produto final (1ª coleta). É possível que essas cepas estivessem presentes em outros pontos da indústria, porém não foram detectadas. Outrossim, podem ser cepas não persistentes, que contaminam transitoriamente a indústria.

A cepa 18 (1ª coleta), isolada do produto final (linguiça mista frescal), foi agrupada no perfil PDE P com mais duas cepas, de origens e datas de isolamento diferentes: cepas 42 e 19. No entanto, após clivagem com a enzima *Ascl*, todas apresentaram perfis distintos. As cepas 20 e 41 obtidas a partir da linguiça mista frescal (5ª e 1ª coletas) apresentaram o mesmo perfil com as duas enzimas (pulsotipo 15O), sendo, portanto, consideradas idênticas. As cepas 71 e 73 foram isoladas na 1ª coleta, a partir de amostras da massa do misturador (matéria-prima para a linguiça) e do produto final, respectivamente. Quando clivadas com a enzima de restrição *Apal*, apresentaram perfis genotípicos únicos (PDE T e PDE U, respectivamente). No entanto, ao serem clivadas posteriormente com a enzima *Ascl*, estas cepas agruparam-se com isolados do mesmo sorotipo, porém de origens distintas (Tabela 5).

4.2.2 Disseminação de *L. monocytogenes* em um frigorífico abatedouro de frangos (Planta B)

As cepas 22, 42, 43, 44, 45, 50, 51, 52 (sorotipo 1/2b), cepas 7 e 8 (sorotipo 4b) foram todas isoladas em um frigorífico abatedouro de frangos (Planta B), durante o período de novembro de 2005 a maio de 2006, com intervalos de aproximadamente 45 dias entre as coletas (Figura 6).

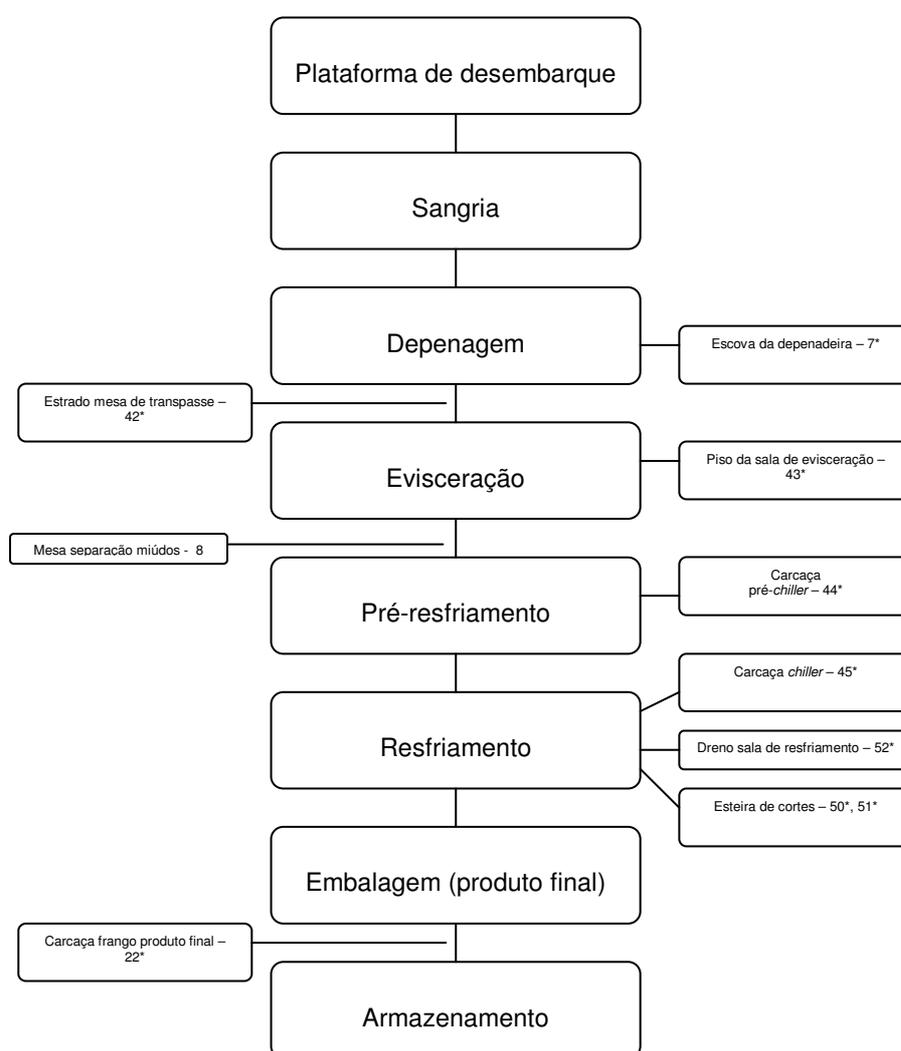


Figura 6 - Representação esquemática da linha de abate e processamento de frangos (Planta B) e pontos de isolamento das cepas de *L. monocytogenes* genotipadas por PFGE. *Representa o número das cepas.

As cepas 22, 42, 43, 44, 45, 50 e 51, foram isoladas em carcaça de frango (produto final - 4ª coleta), estrado da mesa de transpasse (2ª coleta), piso da sala de

evisceração (3ª coleta), carcaça no pré *chiller* (3ª coleta), carcaça no *chiller* (3ª coleta), esteira de cortes antes do início do abate (4ª coleta) e esteira de cortes após final do abate (4ª coleta), respectivamente. Estas cepas, ao serem clivadas com *Ascl*, apresentaram o mesmo perfil genotípico (PDE 14). Porém, quando foram clivadas com *Apal*, as cepas 42, 43 e 45 agruparam-se em perfis distintos em relação as cepas 22, 44, 50 e 51, as quais apresentaram o mesmo perfil genotípico (PDE N) (Tabela 4).

A cepa 42 depois de clivada com a enzima *Apal*, foi agrupada no perfil PDE P, com duas outras cepas do mesmo sorotipo, porém de origens distintas. Já as cepas 43 e 45 depois de clivadas com a endonuclease *Apal*, mantiveram-se novamente agrupadas no mesmo perfil genotípico (PDE Q), sendo portanto consideradas idênticas (tabela 5).

É importante destacar que as coletas realizadas neste frigorífico abatedouro de frangos, se estenderam por um período de seis meses, e que cepas com perfil genotípico idêntico (pulsotipo 14N – cepas 22, 44, 50 e 51), foram isoladas continuamente durante o período de amostragem, o que demonstra sua persistência nesse ambiente. Essas cepas foram isoladas primeiramente na carcaça no pré *chiller*, durante a terceira coleta. Entretanto, cepas com este mesmo perfil foram encontradas na esteira de cortes antes do início das atividades de processamento (após higienização) e no final do abate da quarta coleta, evidenciando sua capacidade de persistência no ambiente dessa indústria.

Essas observações vem ao encontro do que citam Thévenot et al. (2006), de que *L. monocytogenes* é considerada persistente, quando cepas com mesmo perfil genético são isoladas em amostras coletadas em uma mesma indústria e/ou no mesmo equipamento, após um intervalo de no mínimo duas semanas.

López et al. (2008) utilizaram PFGE para avaliar a diversidade genética de cepas de *L. monocytogenes* contaminando o ambiente e os produtos de um frigorífico abatedouro de suínos na Espanha. Observaram que três genótipos predominantes persistiram na planta durante o período de um ano, e que 92% das cepas apresentavam este mesmo perfil genético, indicando que estas cepas de *L. monocytogenes* estavam especialmente adaptadas a determinados nichos do ambiente desta planta de processamento.

A presença de cepas persistentes de *L. monocytogenes* no ambiente da Planta B, associado ao fato da coleta ter sido realizada antes do início das

atividades de abate, porém após os processos de higienização, sugere a possibilidade de contaminação das carcaças de frango a partir do ambiente de processamento. Este fato tem sido descrito por outros pesquisadores, que relatam que a contaminação do produto final, geralmente ocorre durante o processamento, e é resultado da presença de cepas persistentes no ambiente (MIETTINEM et al., 1999; AUTIO et al., 2002; HEIR et al., 2004).

De acordo com Berrang et al. (2005), utensílios e equipamentos contaminados com *L. monocytogenes* são indicativos de limpeza e sanificação ineficientes, o que os torna importantes fontes de contaminação dos produtos, bem como responsáveis pela persistência de cepas desse patógeno dentro da planta de processamento. Além disso, procedimentos ineficazes de higienização podem permitir a formação de biofilmes, outro fator de grande preocupação para a indústria de alimentos. Alguns autores, tais como Lundén (2004), destacam que após a formação do biofilme, a remoção dos microrganismos aderidos à superfície é difícil, já que ficam mais protegidos de agentes sanitizantes, favorecendo, desta forma, o desenvolvimento de resistência aos desinfetantes, pela exposição dos microrganismos a concentrações subletais.

A cepa 52 (sorotipo 1/2b) isolada a partir do dreno da sala de resfriamento (3ª coleta) apresentou o pulsotipo 15M, compartilhando estes perfis com outras cepas sorotipo 1/2b, isoladas a partir de diferentes origens.

As cepas 7 e 8 (sorotipo 4b), foram isoladas na mesma coleta (1ª coleta), a partir da escova da depenadeira e da mesa de separação de miúdos, respectivamente. Quando clivadas com a endonuclease *Apal*, apresentaram o mesmo perfil genotípico (PDE S). Porém, quando clivadas com a enzima *Ascl*, agruparam-se em diferentes perfis genotípicos, com isolados do mesmo sorotipo e de origens distintas (Tabela 5).

4.2.3 Disseminação de *L. monocytogenes* em frigorífico abatedouro de ovinos (Planta C)

As cepas de *L. monocytogenes* isoladas nesta indústria foram obtidas a partir de carcaças de ovinos (cepas 1, 12, 19 e 62), em coletas realizadas durante os meses de novembro de 2000 e janeiro de 2001. O fato desse microrganismo não ter sido isolado do conteúdo intestinal dos ovinos e, posteriormente, ter sido encontrado na carcaça dos mesmos animais amostrados no início do abate, reforça a hipótese

de que a contaminação ambiental seria a principal via pela qual o patógeno estaria contaminando as carcaças na Planta C. Fato semelhante, foi descrito por Fenlon et al. (1996), que mesmo não detectando a presença de *L. monocytogenes* em fezes de frangos antes do abate, isolaram este microrganismo em amostras de frangos ao final do processamento, revelando o grande potencial da contaminação ambiental durante as operações de processamento.

Neste estudo, como só houve isolamento de *L. monocytogenes* nas amostras de carcaça, não foi possível definir qual seria a origem desta contaminação. Entretanto, a diversidade das cepas, determinada por sorotipagem e PFGE, sugere que várias fontes podem estar contaminando as carcaças nesse frigorífico ou que uma única fonte encontra-se contaminada com vários pulsotipos. A cepa 1, sorotipo 1/2a, apresentou pulsotipo 8J; a cepa 12, sorotipo 3a, apresentou pulsotipo 5I; a cepa 19, sorotipo 1/2b, apresentou pulsotipo 16P; e a cepa 62, sorotipo 1/2c, apresentou pulsotipo 2E.

4.2.4 Diversidade genética de *L. monocytogenes* em queijo artesanal tipo Minas comercializado em Pelotas

As cepas 2, 3, 4, 14, 16, 17, 66 e 70 foram isoladas de amostras de queijo artesanal tipo Minas, obtidas no comércio do município de Pelotas, no ano de 2006.

As cepas 2, 3 e 4, todas do sorotipo 1/2a, apresentaram o mesmo perfil genotípico (pulsotipo 10K) (Tabela 4), portanto, são um mesmo clone, tendo em vista que não puderam ser distinguidas entre si, quando clivadas pelas duas enzimas de restrição utilizadas neste estudo.

Já as cepas 14, 16 e 17, sorotipo 1/2b, quando digeridas com *Apal*, apresentaram o mesmo perfil genotípico (PDE N), entretanto, após clivagem com a enzima *Ascl*, a cepa 16 apresentou perfil distinto, enquanto as outras duas permaneceram indistinguíveis. A enzima *Ascl* demonstrou, portanto, maior capacidade discriminatória do que a *Apal* para essa cepa. Esse mesmo comportamento foi evidenciado para as cepas 66 e 70, sorotipo 4b, que apresentaram o mesmo perfil genotípico (PDE R), quando clivadas com *Apal* e dois perfis distintos com *Ascl*: PDE 20 e PDE 19, respectivamente.

Segundo Lomonaco et al. (2009), a presença de *Listeria* spp. em queijos pode ocorrer por vários fatores, como por exemplo, um tratamento de pasteurização insatisfatório ou recontaminação após tratamento térmico. Procedimentos de

higienização impróprios ou desenvolvimento de resistência aos produtos químicos utilizados rotineiramente para sanitização, também podem contribuir decisivamente para contaminação do produto final. Além disso, algumas propriedades intrínsecas de *L. monocytogenes*, tais como tolerância a pH baixos e a altas concentrações de sais, aliado a capacidade de crescer em temperaturas de refrigeração, permitem a sobrevivência deste patógeno durante os processos de produção de laticínios. Neste estudo, todos esses fatores podem ter contribuído para a ocorrência do patógeno, tendo em vista que o produto amostrado não possuía procedência sanitária. A presença de distintos sorotipos, destacando-se alguns com grande importância em saúde pública devido a sua associação frequente com surtos/casos de listeriose, juntamente com a diversidade genética observada pelos diferentes perfis de PFGE obtidos, demonstram que vários clones de *L. monocytogenes* estão presentes nos locais de produção desses queijos artesanais, sendo capazes de contaminar e se manterem viáveis nesse tipo de produto.

4.2.5 Diversidade genética de *L. monocytogenes* em frangos refrigerados comercializados em Pelotas

As cepas 5, 6, 9, 10, 23 e 26 foram isoladas de amostras de frango refrigerado, provenientes do comércio da cidade de Pelotas, no período de agosto a outubro de 2006, todas oriundas de indústrias situadas no Estado do Rio Grande do Sul. Com exceção da cepa 5, isolada de produto final da Marca B, todas as demais cepas foram isoladas de produtos da Marca A.

A cepa 5, sorotipo 1/2a, foi isolada em um produto da Marca B e apresentou pulsotipo 9L. A cepa 6, também sorotipo 1/2a, foi isolada de uma amostra da Marca A, e apresentou pulsotipo 8J. A cepa 23, sorotipo 1/2b, isolada em um produto da Marca A, apresentou pulsotipo 14M, enquanto a cepa 26, também sorotipo 1/2b, e com a mesma procedência, apresentou perfil genotípico distinto: pulsotipo 12N. É digno de nota que a Marca A pertence ao mesmo frigorífico abatedouro de frangos (Planta B) onde foram realizadas as coletas e foram isoladas as cepas de *L. monocytogenes* avaliadas neste estudo. Através da PFGE observou-se que as cepas 23 e 26 apresentaram-se com alguns dos mesmos perfis genotípicos (PDE 14 e PDE N) que foram encontrados em outras cepas isoladas na Planta B.

As cepas 9 e 10 (sorotipo 4e) isoladas a partir de frango refrigerado do comércio (Marca A), apresentaram os mesmos perfis genotípicos (pulsotipo 7H) quando clivadas com as endonucleases de restrição (Tabela 4).

4.2.6 *L. monocytogenes* em estabelecimento avícola na região sul do Rio Grande do Sul

Foram amostrados 35 aviários localizados na região sul do Rio Grande do sul, onde isolou-se uma cepa (cepa 11) a partir da cloaca das aves (NALÉRIO, 2007). A cepa 11 pertence ao sorotipo 4e e foi isolada em um estabelecimento avícola cujas aves são abatidas na Planta B. Após clivagem com as endonucleases de restrição, a cepa 11 apresentou pulsotipo 7H, o mesmo apresentado pelas cepas 9 e 10, isoladas em frangos refrigerados, também comercializados pela Planta B.

4.2.7 Diversidade genética de *L. monocytogenes* em alimentos, em indústrias de alimentos e em aviários comerciais, na região sul do Rio Grande do Sul

Neste estudo, cepas de *L. monocytogenes* isoladas em diferentes origens e em épocas distintas, ao serem clivadas com as endonucleases de restrição *Ascl* e *Apal*, compartilharam padrões de restrição idênticos, sendo essa característica observada, pela comparação dos PDEs obtidos para as duas endonucleases.

As cepas 1 e 6, pulsotipo 8J, sorotipo 1/2a, foram isoladas de uma carcaça de ovino no ano de 2001 (Planta C) e de frango refrigerado (marca A) obtida do comércio de Pelotas no ano de 2006. (Tabela 5), respectivamente. Já a cepa 19 (sorotipo 1/2b), também isolada de carcaça de ovino (2001), quando clivada com a enzima *Apal*, apresentou perfil genotípico PDE P, o mesmo de cepas isoladas em linguiça mista frescal (2003 - Planta A), e do estrado da mesa de transpasse (2006 - Planta B), do mesmo sorotipo. Entretanto, ao ser digerida com a enzima *Ascl*, a cepa 19, apresentou perfil genotípico único (PDE 16) (Tabela 5).

As cepas 33, 34, 60 e 62, todas sorotipo 1/2c, apresentaram o mesmo pulsotipo (2E). É interessante destacar que essas cepas foram isoladas de diferentes origens: a cepa 62 foi isolada de uma carcaça de ovino em 2001 (Planta C), enquanto as cepas 33, 34 e 60 (isoladas da planta A), foram obtidas a partir de uma mesa de processamento (2003), do moedor (2002) e do produto final linguiça mista frescal (2003), respectivamente (Tabela 5).

Pode-se verificar que alguns grupos clonais estão amplamente disseminados no ambiente da região avaliada, pois foram encontrados em diferentes alimentos, em distintas plantas de processamento (Plantas A, B e C), e em períodos distintos. Leite et al. (2006) avaliaram *L. monocytogenes* em sete fazendas que produziam queijo de ovelha, em Portugal, e constataram que isolados de indústrias diferentes, partilhavam perfis genotípicos idênticos para o mesmo sorotipo e que o fato de alguns genótipos serem comuns em diferentes fazendas, mesmo distantes umas das outras, e que não compartilham seus rebanhos ou equipamentos, sugeria a ampla disseminação desses genótipos no ambiente.

Além das cepas anteriormente citadas, as cepas 14, 16 e 17, isoladas de queijo artesanal tipo Minas, quando submetidas à clivagem com a enzima *Apal*, foram agrupadas juntas no mesmo perfil genotípico (PDE N), com outras cepas do sorotipo 1/2b, obtidas do alimento e do ambiente da Planta B (cepas 22, 44, 50, 51) e de frango refrigerado adquirido do comércio (cepa 26). Contudo, é interessante observar, que estas cepas adquiridas de diferentes origens e que compartilharam o perfil PDE N, foram todas isoladas no ano de 2006 (Tabela 5). Fato semelhante foi descrito por Filiouis et al. (2009), que pesquisaram *L. monocytogenes* em alimentos na Grécia, e observaram que determinados pulsotipos foram encontrados em diferentes produtos alimentares, tais como queijo, peixe, carne e aves, sugerindo que um clone dominante estava amplamente disseminado, ou que a contaminação poderia ter ocorrido nos mercados locais.

As cepas 7 e 8 (sorotipo 4b), isoladas da Planta B, foram obtidas a partir da escova da depenadeira e da mesa de separação de miúdos no ano de 2005. Quando clivadas com a endonuclease *Apal*, apresentaram o mesmo perfil genotípico, PDE S. Interessantemente, quando foram clivadas com a enzima *Ascl*, agruparam-se em diferentes perfis, com isolados do mesmo sorotipo e de origens distintas. A cepa 7 compartilhou o mesmo perfil (PDE 18) com a cepa 73, isolada a partir de linguiça mista frescal no ano de 2002. Já a cepa 8, juntamente com a cepa 66, isolada de queijo artesanal tipo Minas no ano de 2006, formaram o PDE 20.

Semelhantemente, as cepas 71 e 73, também do sorotipo 4b, porém isoladas na massa pronta para embutir (misturador) e do produto final (linguiça mista frescal), no ano de 2002, apresentaram perfis genotípicos únicos, PDE T e PDE U, respectivamente, com a enzima de restrição *Apal*. No entanto, com a enzima *Ascl*, agruparam-se com isolados de origens distintas, também sorotipo 4b. A cepa 71 e a

cepa 70, isolada de queijo artesanal tipo Minas no ano de 2006, apresentaram-se com o perfil genotípico PDE 19, enquanto a cepa 73, como já citado anteriormente, junto a com a cepa 7, isolada da escova da depenadeira da Planta B em 2005, compartilharam o PDE 18.

A cepa 42, sorotipo 1/2b, isolada do estrado da mesa de transpasse da Planta B no ano de 2006, apresentou perfil PDE 14, semelhantemente a outras cepas também do sorotipo 1/2b, isoladas dessa mesma planta de processamento, ao ser clivada com a endonuclease *Ascl*. Interessantemente, quando clivada com a enzima *Apal*, compartilhou o mesmo perfil genotípico (PDE P) com as cepas 18 e 19, isoladas a partir de linguiça mista frescal em 2002, e de carcaça de ovino no ano de 2001, respectivamente.

Outra cepa que apresentou características semelhantes a essas, foi a cepa 52, sorotipo 1/2b, isolada do dreno da sala de resfriamento da Planta B, em 2006, que apresentou perfil PDE M, o mesmo da cepa 23 isolada de frango refrigerado proveniente do comércio (Marca A), produzido na Planta B, também no ano de 2006. Entretanto, quando clivada com a endonuclease *Ascl*, a cepa 52 compartilhou o perfil genotípico PDE 15, com duas outras cepas sorotipos 1/2b, as cepas 20 e 41, isoladas de linguiça mista frescal produzida na Planta A, em 2003 e 2002.

As cepas 9 e 10 (sorotipo 4e) isoladas de frango refrigerado obtido no comércio de Pelotas (Marca A), e a cepa 11 (sorotipo 4e) isolada de uma amostra de *swab* cloacal de frango, apresentaram o mesmo pulsotipo: 7H (Tabela 4). Esse resultado é bastante interessante, pois demonstra a importância da matéria-prima na introdução de cepas no ambiente dessa indústria, e posterior contaminação do produto final. Apenas essas três cepas pertenciam ao sorotipo 4e e todas foram geneticamente indistinguíveis. É digno de nota, que embora tenham sido coletadas amostras de diferentes marcas comercializadas na região sul, essas cepas foram isoladas do produto final da Planta B, na mesma época em que a cepa 11 foi isolada da cloaca de aves abatidas por essa mesma indústria.

A técnica de PFGE permitiu observar que a grande maioria das cepas de *L. monocytogenes* isoladas na região sul do Brasil apresentou estreita relação clonal, independente da origem e temporalidade, como pode ser observado pelas cepas 1 e 6; 2, 3 e 4; 20 e 41; 22, 44, 50 e 51; 43 e 45; 27 e 39; 33, 34, 60 e 62; 9, 10 e 11 (Tabela 5). As cepas 5, 12, 29, 37 e 40 apresentaram PDEs únicos para ambas as enzimas de restrição, podendo assim, serem consideradas cepas independentes. Já

as cepas 16 e 26 pertenceram ao PDE mais frequente (PDE N) quando clivadas por *Apal*, mas apresentaram-se com PDEs exclusivos (PDEs 11 e 12, respectivamente) quando digeridas por *Ascl*.

A combinação entre os perfis de digestão com as duas endonucleases de restrição utilizadas permitiu a obtenção de 29 Pulsotipos, dos quais, 20 perfis foram exclusivos. Contudo, devido a problemas de degradação do DNA durante a digestão, não foi possível realizar uma adequada visualização das bandas do perfil S, e os perfis P25 e P29, não puderam ser utilizados para a construção do dendrograma (Tabela 5).

Tabela 5. Perfil genotípico e sorológico de 44 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em distintos ambientes de processamento e em alimentos adquiridos a partir da indústria e do comércio, no sul do Rio Grande do Sul.

Cepas	Origem	Ano de isolamento	Sorotipo	Perfil de digestão por endonuclease (PDE)		Perfil combinado (Pulsotipo)	Grupos
				Ascl	Apal		
27/39	Carrinho/Manipulador	2002/2003	1/2c	1	G	P1	I
58	Produto final (linguiça mista)	2003	1/2c	1	C	P2	I
32	Embutideira	2003	1/2c	1	B	P3	I
33/34/60/62	Mesa/Moedor/Produto final (linguiça mista) /Carcaça de ovino	2003/2002/ 2003/2001	1/2c	2	E	P4	III
40	Produto final (linguiça mista)	2003	1/2c	3	D	P5	II
37	Caixa plástica para o transporte de carnes	2002	1/2c	4	F	P6	II
12	Carcaça de ovino	2001	3a	5	I	P7	III
29	Amarrador	2002	1/2c	6	A	P8	V
	Frango refrigerado(*A)/Frango refrigerado(*A)/ Swab cloacal.	2006/2006/ 2006	4e	7	H	P9	III
9/10/11							
1/6	Carcaça de ovino/Frango refrigerado (*A)	2000/2006	1/2a	8	J	P10	I
5	Frango refrigerado (*B)	2006	1/2a	9	L	P11	I
2/ 3/ 4	Queijo artesanal tipo Minas/Queijo artesanal tipo Minas	2006/2006/ 2006	1/2a	10	K	P12	IVb
16	Queijo artesanal tipo Minas	2006	1/2b	11	N	P13	Iva
26	Frango refrigerado (*A)	2006	1/2b	12	N	P14	Iva
18	Produto final (linguiça mista)	2002	1/2b	13	P	P15	Iva
22/44/50/51	Carcaça de frango (*I)Carcaça de frango no pré <i>chiller</i> (*I) / Esteira cortes antes/Esteira cortes final	2006/2006/ 2006/2006	1/2b	14	N	P16	Iva
23	Frango refrigerado (*A)	2006	1/2b	14	M	P17	Iva
42	Estrado mesa transpasse	2006	1/2b	14	P	P18	Iva
43/45	Piso da sala de evisceração/Carcaça de frango no <i>chiller</i> (*I)/ Produto final (linguiça mista)/Produto final (linguiça mista)	2006/2006	1/2b	14	Q	P19	IVa
20/41		2003/2002	1/2b	15	O	P20	IVd
52	Dreno sala resfriamento	2006	1/2b	15	M	P21	IVd
19	Carcaça de ovino	2001	1/2b	16	P	P22	Iva
14/17	Queijo artesanal tipo Minas/Queijo artesanal tipo Minas	2006/2006	1/2b	17	N	P23	IVb
73	Produto final (linguiça mista)	2002	4b	18	U	P24	III
7	Escova da depenadeira	2005	4b	18	S	P25	** _
70	Queijo artesanal tipo Minas	2006	4b	19	R	P26	Ivc
71	Massa linguiça misturador (matéria-prima)	2002	4b	19	T	P27	Ivc
8	Mesa de separação de miúdos	2005	4b	20	S	P28	** _
66	Queijo artesanal tipo Minas	2006	4b	20	R	P29	IVb

**Número de identificação das cepas; **_: Perfil excluído do dendrograma; *A: Frango refrigerado, marca A; *B: Frango refrigerado, marca B; *I: Frango da indústria.

O poder discriminatório da PFGE com o uso conjunto das enzimas *Apal* e *Ascl*, apresentou um valor *D* de 0,98, portanto superior ao obtido com a utilização de cada uma das enzimas em separado (*Ascl* *D*=0,94 e *Apal* *D*=0,95). Esse valor indica que a PFGE com essas duas endonucleases de restrição, apresentou um ótimo poder discriminatório, de acordo com Hunter; Gaston (1988), os quais descrevem que um índice maior que 0,9 é desejável, desde que os resultados sejam interpretados de maneira confiável.

As 15 cepas de *L. monocytogenes* isoladas na Planta A, foram divididas em 11 pulsotipos. Destes, sete (P2, P4, P5, P15, P20, P24 e P27) foram encontrados no alimento, no entanto, somente o P27 foi encontrado no produto ainda não embutido. É interessante frisar que o produto final apresentou seis diferentes pulsotipos, sendo cinco exclusivos, ou seja, que não foram isolados em nenhuma outra amostra. Entre as cepas isoladas no ambiente de processamento, foram identificados 5 pulsotipos (P1, P3, P4, P6 e P8), dos quais o P4 foi o único que agrupou tanto cepas de *L. monocytogenes* encontradas no ambiente, quanto no alimento (Tabela 5).

Seis pulsotipos foram detectados entre as 10 cepas de *L. monocytogenes* isoladas na Planta B. Entre estes, cinco (P18, P19, P21, P25 e P28) foram somente isolados no ambiente de processamento, enquanto o pulsotipo P16 foi isolado no alimento e no ambiente (Tabela 5). É interessante notar que somente 1 pulsotipo foi encontrado no produto final, ou seja, na carcaça de frango, apesar de 5 diferentes pulsotipos terem sido encontrados no ambiente de processamento da Planta B. Isto significa que algumas cepas de *L. monocytogenes*, possuem melhor capacidade de sobrevivência do que outras, principalmente no que diz respeito a sua habilidade em suportar as diversas etapas do processamento industrial.

As 4 cepas de *L. monocytogenes* isoladas a partir de carcaça de ovino na Planta C, foram agrupadas em quatro pulsotipos (P4, P7, P10 e P22), dos quais dois foram exclusivos, P7 e P22. É importante ressaltar que as duas cepas que apresentaram estes pulsotipos exclusivos, cepas 12 (sorotipo 3a) e cepa 19 (sorotipo 1/2b), foram isoladas a partir da mesma carcaça de ovino, o que sugere que fontes diferentes podem estar contaminando as carcaças nesse frigorífico, ou que cepas diferentes ocupavam o mesmo sítio de contaminação.

Onze pulsotipos foram isolados da Planta A, dos quais, sete (P1, P2, P3, P4, P5, P6 e P8) agruparam cepas do sorotipo 1/2c, dois (P15 e P20) do sorotipo 1/2b, e outros dois (P24 e P27) do sorotipo 4b. Entre os seis pulsotipos encontrados na Planta B, quatro (P16, P18, P19 e P21) foram do sorotipo 1/2b e dois (P25 e P28) do sorotipo 4b. Quatro pulsotipos foram detectados na planta C, cada qual relacionado a um sorotipo diferente, sendo que o P4 pertencia ao sorotipo 1/2c, o P7 ao sorotipo 3a, o P10 ao sorotipo 1/2a e o P22 pertencia ao sorotipo 1/2b. O número total de cepas de *L. monocytogenes* em cada pulsotipo, e de acordo com o sorotipo, pode ser visualizado na Tabela 5.

As seis cepas de *L. monocytogenes* isoladas em frangos refrigerados adquiridos do comércio, foram divididas em 5 pulsotipos (P9, P10, P11, P14 e P17), sendo os pulsotipos P11, P14 e P17, exclusivos. Já as 8 cepas isoladas a partir de queijo artesanal tipo Minas, também foram divididas em 5 pulsotipos (P12, P13, P23, P26 e P29), porém, todos exclusivos, e encontrados apenas nesta fonte (Tabela 5)

Três pulsotipos isolados na Planta A: P1 (1ª e 4ª coletas: carrinho e manipulador), P4 (5ª, 1ª e 5ª coletas: mesa, moedor e produto final - linguiça mista frescal) e P20 (5ª e 1ª coletas: produto final - linguiça mista frescal), e o pulsotipo P16 da Planta B (5ª, 4ª, 5ª e 5ª coletas: carcaça de frango, carcaça no *chiller*, esteira cortes antes do abate, esteira cortes ao final do abate), persistiram no ambiente das plantas de processamento avaliadas, tendo em vista que foram isolados em mais de uma coleta, caracterizando-se, portanto, por estarem adaptados ao ambiente e colonizarem as plantas de processamento A e B, tendo grande importância na contaminação do produto final.

A cepa 44, isolada a partir de uma carcaça de frango no *chiller*, compartilhou o pulsotipo P16 juntamente com outras três cepas isoladas de carcaça de frango (cepa 22), esteira de cortes antes do início do abate (cepa 50) e esteira de cortes amostrada ao final do abate (cepa 51). É interessante destacar que essas duas últimas cepas foram isoladas na 5ª coleta, ou seja, em torno de um mês depois do isolamento da cepa 44, isolada na 4ª coleta. Assim, a técnica de PFGE permitiu demonstrar que três clones de diferentes origens estavam presentes e se disseminaram no ambiente de processamento, chegando ao produto final.

Através da análise do dendrograma obtido com o perfil combinado de PFGE pela utilização das duas endonucleases de restrição, *Ascl* e *Apal* (Figura 7), pode-se evidenciar a existência de 5 grupos principais, sendo que o grupo 4 foi subdividido

em grupos IVa, IVb, IVc e IVd, totalizando 8 grupos distintos. O grupo IVa foi o predominante, agrupando 8 pulsotipos e 12 das 44 cepas analisadas (Tabela 5). O pulsotipo P8 foi menos relacionado geneticamente com os demais perfis e acabou formando um grupo isolado, o grupo V.

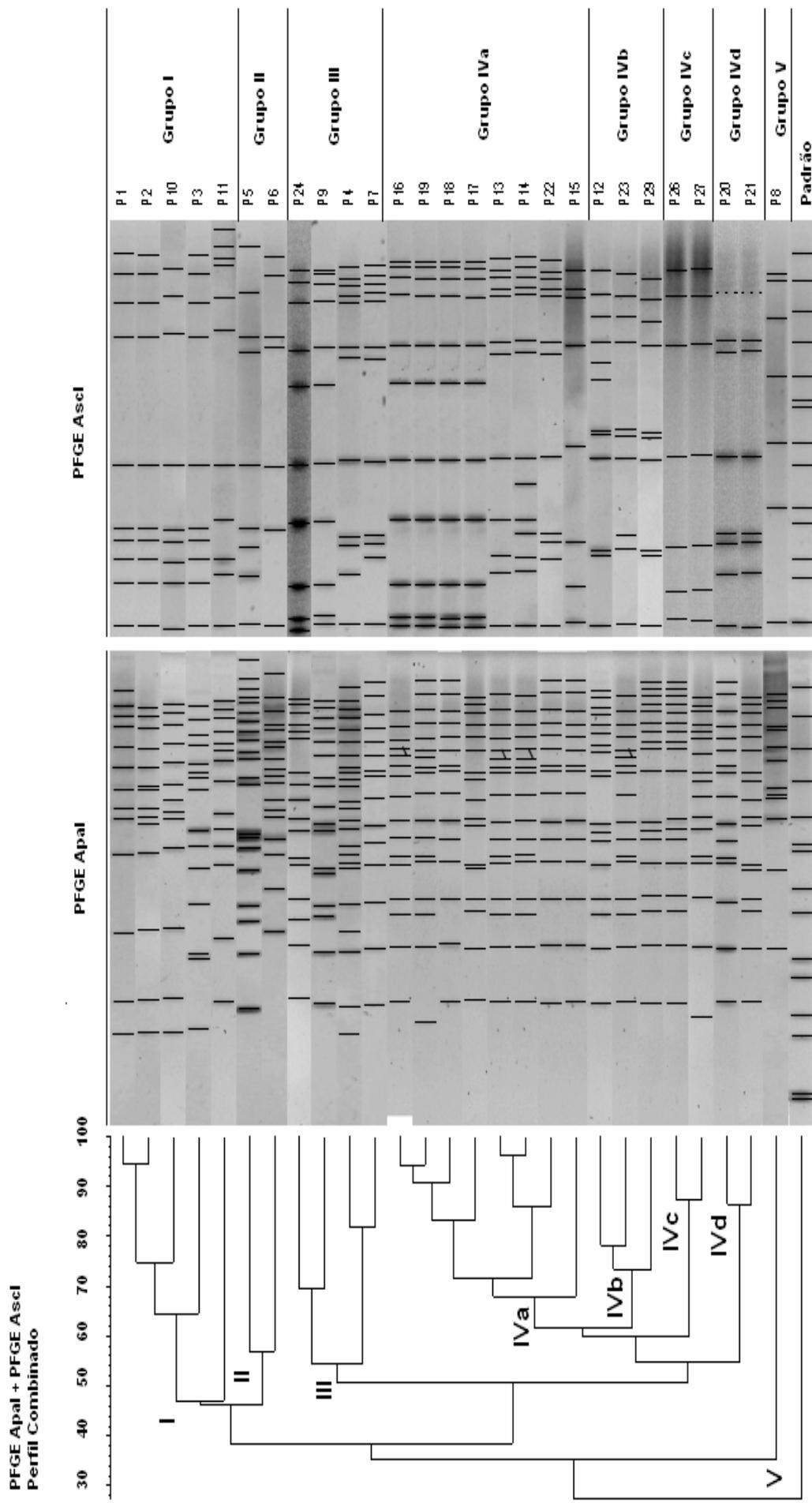


Figura 7. Dendrograma representando a relação genética entre as 44 cepas de *L. monocytogenes* analisadas por PFGE utilizando Apal e Ascl. Cepa padrão: *Salmonella enterica* sorovar Braenderup H9812.

Chasseignaux et al. (2001), na França, monitoraram a disseminação de *L. monocytogenes* em duas plantas de processamento (de aves e suínos), caracterizando as cepas por PFGE, e observaram que as 502 cepas de *L. monocytogenes* foram divididas em 9 grupos, sendo que o grupo principal foi composto por 55,3% (278/502) das cepas. Da mesma forma Cruz et al. (2008), no Brasil, utilizaram PFGE para avaliar a distribuição de *L. monocytogenes* em uma unidade de processamento de salmão, e verificaram que as 179 cepas de *L. monocytogenes*, formaram 6 grupos, sendo que 120 cepas foram agrupadas no grupo predominante, o grupo A.

Tabela 6. Grupos formados a partir da análise visual do dendrograma dos perfis combinados (Pulsotipos) com *Ascl* e *Apal*, por PFGE.

Grupo	Perfil combinado (Pulsotipo)	Número de cepas	Sorotipo
I	P1/P2/P10/P3/ P11	7	1/2a e 1/2c
II	P5/P6	2	1/2c
III	P24/P9/P4/P7	9	1/2c, 3a, 4b e 4e
IVa	P16/P19/P18/P17/ P13/ P14/P15/P22	12	1/2b
IVb	P12/P23/P29	6	1/2a, 1/2b e 4b
IVc	P26/P27	2	4b
IVd	P20/P21	3	1/2b
V	P8	1	1/2c

Entre os 8 grupos formados (Figura 7), três agruparam mais de um sorotipo: o grupo I foi composto por cepas dos sorotipos 1/2a e 1/2c; o grupo III, que constituiu-se no grupo com a maior variedade de sorotipos, sendo formado pelo sorotipos 1/2c, 3a, 4b e 4e; e o grupo IVb, que apresentou os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b (Tabela 6).

As cepas do grupo IVb foram isoladas apenas nas amostras de queijo artesanal tipo Minas, adquiridas no comércio de Pelotas, em 2006 (Tabela 5). Os pulsotipos P12 e P23 apresentaram um grau de similaridade de 78%, enquanto o pulsotipo P29 apresentou uma percentagem de similaridade de 74% em relação aos outros dois perfis que compõem este grupo genômico.

Cepas dos grupos II e V foram isoladas apenas na Planta A, entre os anos 2002-2003, e pertenciam ao sorotipo 1/2c. Ao grupo genômico II pertencem uma cepa isolada de linguiça mista frescal e uma cepa isolada de caixas plásticas utilizadas para o transporte de carne, na Planta A (pulsotipos P5 e P6 respectivamente), os quais apresentaram um grau de similaridade de 58%. O grupo V é composto por apenas uma cepa, isolada do equipamento amarrador, na Planta A (pulsotipo P8), que apresentou um grau de similaridade com os demais grupos genômicos de apenas 36%.

Os grupos IVc e IVd agruparam cepas do mesmo sorotipo, porém de diferentes origens. Ao grupo IVc pertencem duas cepas do sorotipo 4b, isoladas da massa utilizada como matéria-prima para linguiça mista frescal (Planta A) e de queijo artesanal tipo Minas (comércio), isolados em 2002 e 2006, respectivamente. Já o grupo IVd albergou cepas do sorotipo 1/2b, sendo duas isoladas de linguiça mista frescal (Planta A) e uma isolada no dreno da sala de resfriamento (Planta B), em estudos realizados em 2002-2003 e 2006, respectivamente. O grau de similaridade entre os pulsotipos que formaram os grupos genômicos IVc (P26 e P27) e IVd (P20 e P21), foi de 88% e 86%, o que vem ao encontro de Autio et al. (2002) que relatam que cepas semelhantes podem ser encontradas em diferentes tipos de produtos e ambientes, em locais e épocas distintas. A distribuição dos grupos genômicos ao longo dos fluxogramas de ambas as plantas de processamento, pode ser visualizada, nas Figuras 8 e 9.

O grupo IVa, além de agrupar o maior número de cepas (12), todas do sorotipo 1/2b, apresentou-se mais distribuído na Planta B, onde foi isolado em uma carcaça de frango, nas carcaças no pré *chiller* e no *chiller*, na esteira de cortes no início e no final do abate, no piso da sala de evisceração e no estrado da mesa de transpasse. Salienta-se que esse estudo foi conduzido em 2006. Ao grupo IVa também pertenceram uma cepa isolada de queijo artesanal tipo Minas, duas cepas isoladas de frango refrigerado (ambas obtidas do comércio em 2006), uma cepa de carcaça de ovino isolada em 2001, e uma cepa de linguiça mista frescal isolada na planta de processamento A, em 2002. É digno de nota que dentre os pulsotipos que foram agrupados nesse grupo genômico, os perfis P13 e P14, compostos por cepas do mesmo sorotipo (1/2b), no entanto de origens distintas, apresentaram uma percentagem de similaridade de 96%, da mesma forma que os perfis P16 e P19, que também incluíam cepas do sorotipo 1/2b, porém todas isoladas a partir Planta B,

apresentaram um grau de similaridade 94%. O grau de similaridade dos demais pulsotipos em relação aos perfis anteriormente citados (P16 e P19) foi abaixo de 90%, com exceção do perfil P15 que apresentou uma percentagem de similaridade de 68% em relação a todos os demais pulsotipos que compreenderam este grupo.

Os grupos I e III agruparam cepas de diferentes origens e sorotipos. O grupo I abrigou 7 cepas com 2 sorotipos diferentes, enquanto o grupo III foi formado por 9 cepas, apresentando 4 diferentes sorotipos. O grupo I foi composto por sete cepas, sendo quatro do sorotipo 1/2c, isoladas da Planta A nos anos de 2002-2003, a partir do carrinho de aço inox, do manipulador, da embutideira, e do produto final (linguiça mista fresca). As 3 cepas restantes, sorotipo 1/2a, foram isoladas de uma carcaça de ovino (Planta C), em 2001, e de dois frangos refrigerados adquiridos do comércio, em 2006. Entre os cinco pulsotipos do grupo genômico I, P1 e P2 apresentaram uma percentagem de similaridade de 94%, enquanto o grau de similaridade dos demais perfis deste grupo em relação aos perfis genotípicos anteriores foi abaixo de 74%.

No grupo III foram agrupadas nove cepas: uma cepa, sorotipo 4b, foi isolada em 2002 em uma amostra de linguiça mista fresca; 2 cepas sorotipo 4e, foram isoladas em 2006 de frango refrigerado do comércio e uma cepa sorotipo 4e, também isolada em 2006, foi obtida de uma amostra do *swab* cloacal de frango; 3 cepas sorotipo 1/2c isoladas da Planta A em 2002-2003, a partir da mesa de processamento, do moedor e de linguiça mista fresca; uma cepa sorotipo 1/2c, isolada de carcaça de ovino, em 2001; e uma (1) cepa sorotipo 3a também isolada de uma carcaça de ovino em 2001. O grau de similaridade apresentado entre os perfis P4 e P7 (grupo III) foi de 82%, sendo que os demais pulsotipos deste grupo, apresentaram similaridades abaixo de 70% em relação a P4 e P7.

Através dos resultados obtidos pode-se observar que cepas de *L. monocytogenes* com padrões de restrição idênticos, ou seja, com a mesma origem clonal, foram isoladas a partir de alimentos de diferentes origens e em ambientes e épocas distintas, na região sul do Rio Grande do Sul. Uma cepa isolada no produto final (linguiça mista fresca) de uma indústria de processamento de embutidos em 2003 apresentou o mesmo perfil genotípico de uma cepa isolada de carcaça de ovino dois anos antes (2001). A mesma situação pode ser observada entre cepas isoladas de carcaça de ovino e de frango refrigerado do comércio, as quais apresentaram o mesmo perfil genotípico, apesar de terem sido isoladas com cinco anos de intervalo. De acordo com Autio et al. (2002), a recuperação de cepas de *L.*

monocytogenes que compartilham padrões de restrição idênticos em alimentos diferentes, bem como ao longo de diferentes anos, indica que as cepas não são geograficamente ou temporalmente específicas. Em outro estudo, Fugett et al. (2007) caracterizaram por PFGE 495 cepas de *L. monocytogenes* isoladas entre 2001 e 2003 e identificaram que alguns pulsotipos estavam associados com origens específicas, enquanto outros estavam amplamente distribuídos e foram detectados entre isolados de diferentes fontes alimentares.

Neste estudo, 2 dos 29 pulsotipos foram detectados em mais de um tipo de alimento, embora diversos pulsotipos tenham apresentado similaridade superior a 90% (P1, P2, P13, P14, P16, P18 e P19). Além disso, alguns perfis foram encontrados apenas em um determinado alimento, como é o caso dos pulsotipos P12, P13, P23, P26 e P29, que foram isolados somente em queijo artesanal tipo Minas. Todavia, este resultado deve ser avaliado com cuidado, haja vista que pode ser uma coincidência, entretanto, pode indicar que estes pulsotipos de *L. monocytogenes* são associados ao queijo ou a sua matéria-prima, ou então, ao seu ambiente de processamento ou venda. Porém, para comprovar essa hipótese mais estudos são necessários de forma a revelar se estas cepas estão mais adaptadas a essa fonte ou não. É de destacar, ainda, que as cepas pertencentes a estes pulsotipos isolados nos queijos, não demonstraram alta similaridade genética entre si, como pode ser visualizado pelo dendrograma (Figura 7).

Filioussis et al. (2009) analisaram por PFGE cepas de *L. monocytogenes* isoladas em alimentos comercializados em mercados localizados ao ar livre na Grécia, e constataram que clones idênticos foram encontrados em diferentes alimentos, o que levou estes pesquisadores a inferir que um clone dominante estava amplamente disseminado naquele país, ou que a contaminação poderia ter ocorrido nos mercados locais, através de utensílios ou pela utilização de tábuas de cortes contaminadas com *L. monocytogenes*.

Verificou-se, neste estudo, que determinados genótipos foram detectados após as operações de limpeza e desinfecção, o que indica que os processos de higienização utilizados por essas unidades produtoras de alimentos, foram ineficientes para a eliminação de cepas de *L. monocytogenes*, permitindo a permanência dessas bactérias no ambiente dessas indústrias (Plantas A, B e C). Fato semelhante foi também observado por Chasseignaux et al. (2001), que concluíram que a presença de determinados pulsotipos na área de processamento

de alimentos após a limpeza e desinfecção, demonstravam a ineficiência dos procedimentos adotados.

Através dos resultados obtidos nesta pesquisa, demonstrou-se que algumas cepas de *L. monocytogenes* foram periodicamente isoladas a partir do mesmo tipo de produto ou ambiente de processamento, sugerindo uma eventual persistência destas cepas, nestas fontes. De acordo com Autio et al. (2002), determinadas cepas de *L. monocytogenes* podem ser amplamente distribuídas na natureza e, portanto, serem mais facilmente introduzidas e reintroduzidas em plantas de processamento por meio de matérias-primas cruas, com apenas algumas cepas causando contaminações persistentes. Segundo López et al. (2008) essas cepas possuem características específicas, tais como melhor aderência a superfícies de contatos dos alimentos e maior resistência a desinfetantes, o que lhes permite sobreviver e se adaptar no ambiente de processamento, causando assim contaminação persistente e levando a contaminação dos produtos.

Nesse mesmo sentido, Lúnden et al. (2003) avaliaram *L. monocytogenes* em quatro plantas processadoras de alimentos na Finlândia, e concluíram que em todas as indústrias havia um ou mais clones que persistiram no ambiente, além de vários outros, que foram encontrados esporadicamente. Para esses autores, equipamentos e superfícies de contato com o alimento, desempenham um importante papel na disseminação da contaminação por *L. monocytogenes*.

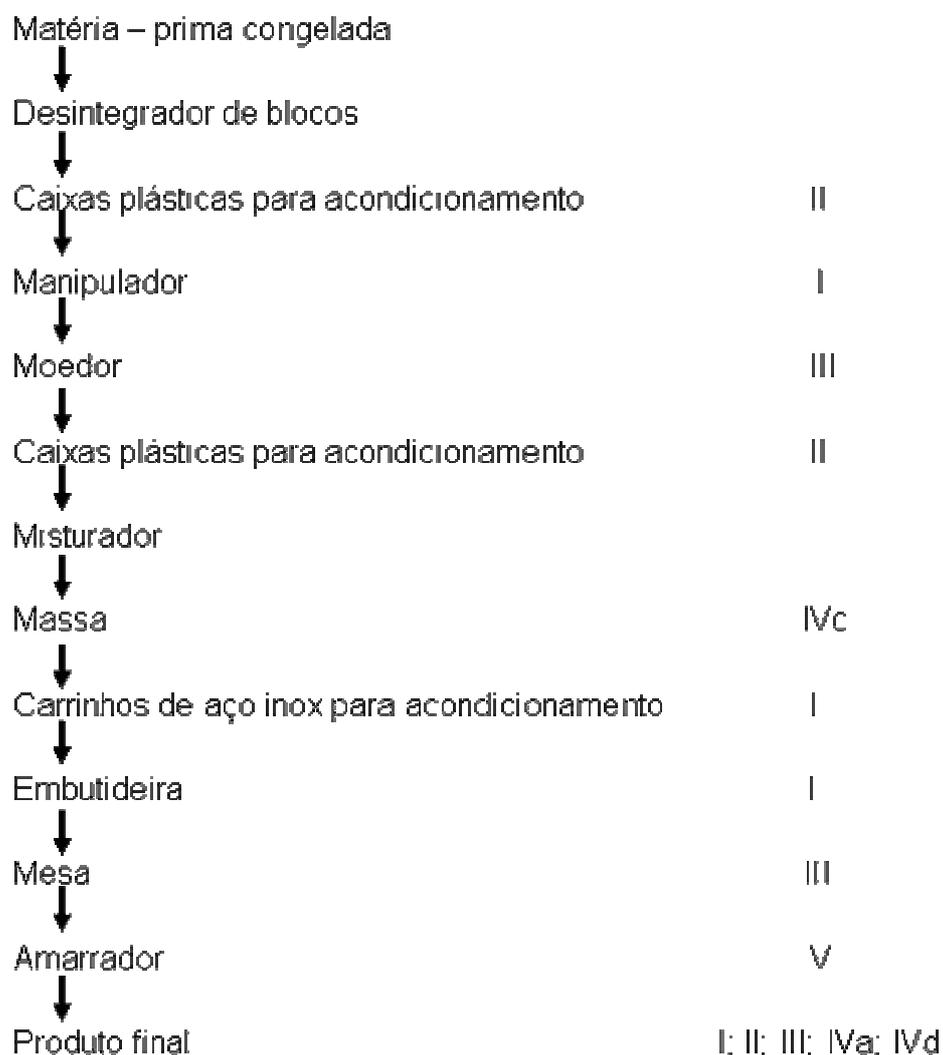


Figura 8 - Distribuição dos grupos de *L. monocytogenes* de acordo com os pontos de amostragens da linha de processamento de linguiça mista fresca (Planta A).

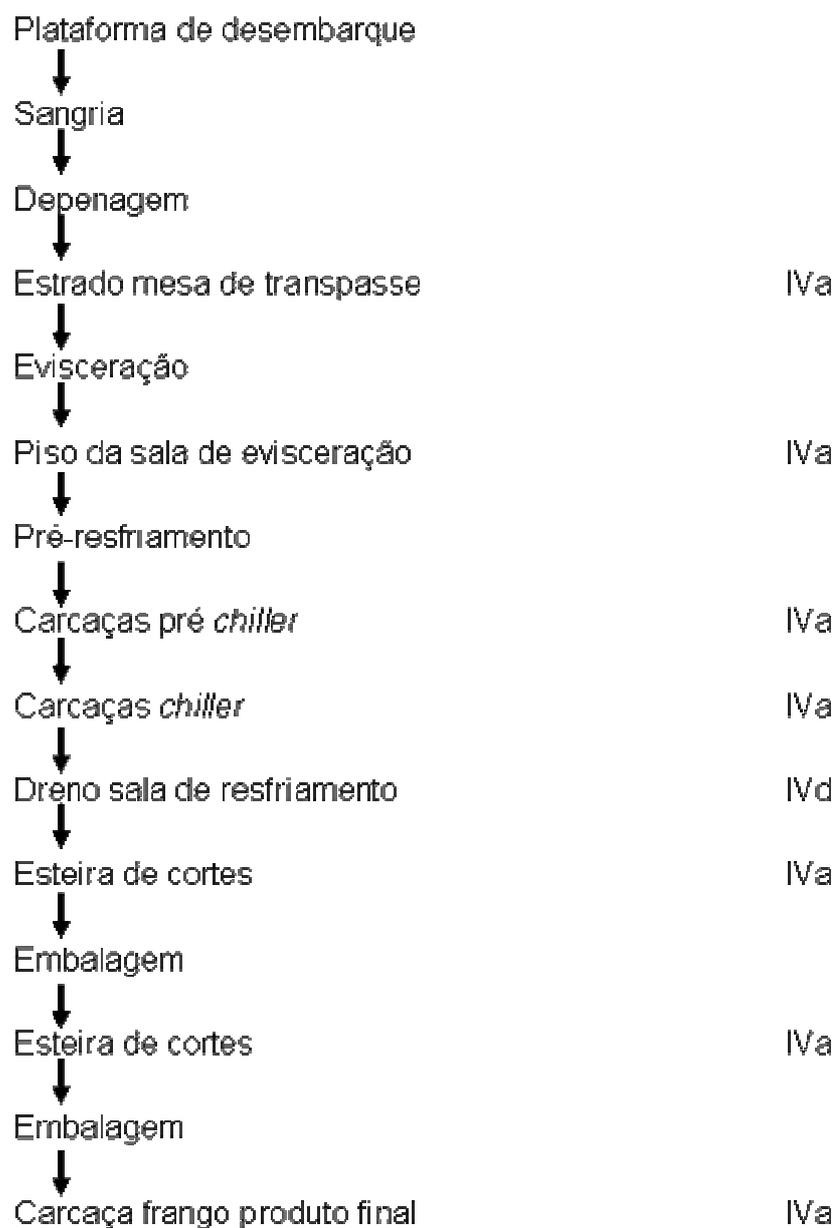


Figura 9 - Distribuição dos grupos de *L. monocytogenes* de acordo com os pontos de amostragens da linha de abate e processamento de frangos (Planta B).

5 Conclusões

- A contaminação do produto final nas indústrias avaliadas ocorreu através de contaminação cruzada, por meio de equipamentos e superfícies que entravam em contato com os produtos;

- A presença de determinados pulsotipos nas plantas de processamento após os procedimentos de limpeza e sanitização, indica a ineficácia dos procedimentos de higienização adotados por aquelas indústrias de alimentos, permitindo a presença de cepas persistentes que se difundem no ambiente de processamento;

- Cepas com o mesmo perfil genotípico foram isoladas a partir de diferentes alimentos, em três plantas de processamento e em aviários comerciais em épocas distintas, o que sugere a ampla disseminação destes perfis genotípicos na região sul do Rio Grande do Sul;

- Oito grupos genéticos distintos de *L. monocytogenes* foram encontrados em alimentos, indústrias de alimentos e aviários comerciais na região sul do Rio Grande do Sul, entretanto, um deles (grupo IVa) foi predominante, agrupando cepas com origem e temporalidade de isolamento distintas.

6 Referências Bibliográficas

AARNISALO, K.; AUTIO, T.; SJÖBERG, A-M.; LUNDÉN, J.; KORKEALA, H.; SUIHKO, M-L. Typing of *Listeria monocytogenes* isolates originating from the food processing industry with automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 2, p. 249-255, 2003.

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

ANTONIOLLO, P. C. *Listeria* spp. em ovinos e carcaças ovinas em nível de abatedouro. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial/ UFPel, 2001.

AUTIO, T.; HIELM, S.; MIETTINEN, M.; SJÖBERG, A. M.; AARNISALO, K.; BJÖRKROTH, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. and KORKEALA, H. Sources of *Listeria monocytogenes* Contamination in a Cold-Smoked Rainbow Trout Processing Plant Detected by Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 150–155, 1999.

AUTIO, T.; LUNDÉN, J.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; BJÖRKROTH, J.; SJOBERG, A. M.; KORKEALA, H. Similar *Listeria monocytogenes* pulsotypes detected in several foods originating from different sources. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 83–90, 2002.

AUTIO, T.; KETO-TIMONEN, R.; LUNDÉN, J.; BJÖRKROTH, J. and KORKEALA, H. Characterisation of Persistent and Sporadic *Listeria monocytogenes* Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). **Systematic Applied Microbiology**, v.26, p. 539–545, 2003.

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

BELL, C., KYRIAKIDES, A. *Listeria*. **A practical approach the organism an it control in foods**. London, UK, Blakwell Publishing, p.288, 2005.

BERSOT, L. A importância de *Listeria monocytogenes* para a saúde pública. In: **Congresso Brasileiro de Especialidades em Medicina Veterinária**, 2004.

BERRANG, M. E.; MEINERSMANN, R. J.; FRANK, J. F.; SMITH, D. P. and GENZLINGER, L. L. Distribution of *Listeria monocytogenes* Subtypes within a Poultry Further Processing Plant. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 5, p. 980–985, 2005.

BESSA, M. C. Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium isolada de suínos no Rio Grande do Sul. **Tese de doutorado**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias/UFRGS, 2006.

BORUCKI, M.K. AND CALL, D.R. *Listeria monocytogenes* Serotype Identification by PCR. **Journal Of Clinical Microbiology**, Vol. 41, n. 12, p. 5537–5540, 2003.

BORUCKI, M. K.; KIM, S. H.; CALL, D. R.; SMOLE, S. C. and PAGOTTO, F. Selective Discrimination of *Listeria monocytogenes* Epidemic Strains by a Mixed-Genome DNA Microarray Compared to Discrimination by Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Ribotyping, and Multilocus Sequence Typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5270–5276, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Brasil nº 7-E, p. 46-53 Jan, seção. 2001.

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

CAI, S.; KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y.; CARGIOLI, ; CHUNG, M. S.; NIELSEN, R. and WIEDMANN, M. Rational design of DNA sequence-based strategies for subtyping *Listeria monocytogenes*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3319–3325. 2002.

CAPITA, R.; PRIETO, M.; MEREGHETTI L. AND ALONSO-CALLEJA, C. Characterisation of *Listeria monocytogenes* Isolates from Poultry by Serotyping and Phage Typing International. **Food Science and Technology**, v. 11, p. 55-65, 2005.

CHASSEIGNAUX, E.; TOQUIN, M. T.; RAGIMBEAU, C.; SALVAT, G.; COLIN, P. and ERMEL, G. 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**, n. 91, p. 888-899, 2001.

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

COSSART, P. Molecular and cellular basis of the infection by *Listeria monocytogenes*: an overview. **International Journal Medical Microbiology**, v. 291, p. 401-409, 2002.

COSSART, P. & TOLEDO-ARANA, A. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. **Microbes and Infection**, v. 10, p 1041- 1050, 2008.

CRUZ, C.D.; SILVESTRE, F.A.; KINOSHITA, E.M.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T. Epidemiological Survey Of *Listeria Monocytogenes* in a Gravlox Salmon Processing Line. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 39, p. 375-383, 2008.

DAUPHIN, G.; RAGIMBEAU, C.; MALLE, P. Use of PFGE typing for tracing contamination with *Listeria monocytogenes* in three cold-smoked salmon processing plants. **International Journal of Food Microbiology**, n. 64, p. 51–61, 2001.

DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes* em camarão (*Penaeus brasiliensis*): marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação em uma unidade processadora de pescado. **Tese de Doutorado**. Curso de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, Área de Bromotologia/USP, 1995.

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

DUSSURGET, O.; PIZARRO-CERDA, J.; and COSSART, P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. **Revista de Microbiologia**, v 58, p 587–610. 2004.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. **Microbiological Reviews**. v. 55, n. 3, p. 476-511, 1991.

FILIOUSIS, G.; JOHANSSON, A.; FREY, J.; PERRETEN, V. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from open-air food markets in Greece. **Food Control**, v. 20, p. 314–317, 2009.

FUGETT, E. B.; SCHOONMAKER-BOPP, D.; DUMAS, N. B.; CORBY, J. and MARTIN WIEDMANN. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Analysis of Temporally atched *Listeria monocytogenes* Isolates from Human Clinical Cases, Foods, Ruminant Farms, and Urban and Natural Environments Reveals Source-Associated as Well as Widely Distributed PFGE Types. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 865–873, 2007.

GASANOV, U., HUGHES, D., HANSBRO, P. M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 29, p. 851-875, 2005.

GANDHI, M., CHIKINDAS, M. *Listeria*: a foodborne pathogen that know to survive. **International Journal of Food Microbiology**. v. 113, p. 1-15, 2007.

GRAVES, L. and SWAMINATHAN, B. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, v 65, p 55 – 62, 2001.

GRAVES, L. M; HUNTER, S. B.; ONG, A. R.; SCHOONMAKER-BOPP, D.; HISE, K.; LAURA KORNSTEIN, L.; DEWITT, W. E.; HAYES, P. S.; DUNNE, E.; MEAD, P. AND SWAMINATHAN, B. Microbiological Aspects of the Investigation That Traced the 1998 Outbreak of Listeriosis in the United States to Contaminated Hot Dogs and Establishment of Molecular Subtyping-Based Surveillance for *Listeria monocytogenes* in the PulseNet Network. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 2350–2355, 2005.

GRAVESEN, A.; JACOBSEN, T.; MØLLER, P. L.; HANSEN, F.; LARSEN, A. G.; KNØCHEL, S.; Genotyping of *Listeria monocytogenes*: comparison of RAPD, ITS, and PFGE. **International Journal of Food Microbiology**, v. 57, p. 43–51, 2000.

GRAY, M. L., AND KILLINGER, A. H. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. **Bacteriol. Rev.**, v.30, p. 309-382, 1966.

GUDMUNDSDÓTTIR, S.; GUDBJFRNSDÓTTIR, B.; LAUZON, H. L.; EINARSSON, H.; KRISTINSSON, K. G.; KRISTJÁNSSON, M. Tracing *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon and its processing environment in Iceland using pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 10, p. 41-51, 2005.

HAIN, T.; CHATTERJEEA, S.S.; GHAIA, R.; KUENNEA, C.T.; BILLION, A.; STEINWEG, C.; DOMANN, E.; KÄRST, U.; JÄNSCH, L.; WEHLAND, J.; EISENREICH, W.; BACHER, A.; JOSEPH, B.; SCHÄR, J.; KREFT, J.; KLUMPP, J.; LOESSNER, M.J.; DORSCHT, J.; NEUHAUS, K.; FUCHS, T. M.; SCHERER, S.; DOUMITH, M.; JACQUET, C.; MARTIN, P.; COSSART, P.; RUSNIOCK, C.; GLASER, P.; BUCHRIESER, C.; GOEBEL, W.; CHAKRABORTY, T. Pathogenomics of *Listeria* spp. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, p. 541-557, 2007.

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

HERSCHLEB, J.; ANANIEV, G. & SCHWARTZ, D. C. Pulsed-field gel electroforesis. **Nature Protocols**, v. 2, n. 3, 2007.

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

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

HOFER, E.; REIS, C. M. F.; HOFER, C. B. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas, isoladas de material clínico humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39(1), p. 32-37, 2006.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical Index oh the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's Index of Diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 2465-2466, 1998.

HUNTER, S. B.; VAUTERIN, P.; LAMBERT-FAIR, M. A.; M. DUYNE, S.V.; KUBOTA, K.; GRAVES, L.; WRIGLEY, D.; BARRETT, T. and RIBOT, E. Establishment of a Universal Size Standard Strain for Use with the PulseNet

Standardized Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols: Converting the National Databases to the New Size Standard. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1045–1050, 2005.

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

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

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

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

KEROUANTON, A.; BRISABOIS, A.; DENOYER, E.; DILASSER, F.; GROUT, J.; SALVATD, G.; PICARD, B. Comparison of five typing methods for the epidemiological study of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 61–71, 1998.

VON LAER, A. E. Mapeamento da contaminação por *Listeria monocytogenes* em uma planta de processamento de lingüiça frescal através de sorologia e PFGE. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial/ UFPel, 2004.

LAWRENCE, L. M.; GILMOUR, A. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from poultry products and from poultry-processing environmental by random amplification of polymorphic DNA and multilocus enzyme electroforesis. **Applied and environmental Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 2139-2144, 1995.

LEITE, P.; RODRIGUES, R.; FERREIRA, M.; RIBEIRO, G.; CHRISTINE JACQUET, C.; MARTIN, P.; BRITO, L. Comparative characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from Portuguese farmhouse ewe's cheese and from humans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 111 – 121, 2006.

LEMES-MARQUES, E. G.; CRUZ, C. D; MARIA TERESA DESTRO, M. T. Pheno- and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates from the southwestern region of the state of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 287-292, 2007.

LIMA, A.S. Disseminação de *Listeria monocytogenes* no processamento de lingüiça mista frescal avaliada por sorologia e RAPD. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial/ UFPel, 2004.

LINDSTEDT, B. A.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M. L.; VARDUND, T.; HELMERSSON, S.; KAPPERUD, G. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Listeria monocytogenes* using multicolour capillary electrophoresis and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, p. 141–148, 2008.

LIU, D.; LAWRENCE, M. L.; GORSKI, L.; MANDRELL, R. E.; AINSWORTH, A. J.; and AUSTIN, F.W. *Listeria monocytogenes* Serotype 4b Strains Belonging to Lineages I and III Possess Distinct Molecular Features. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 214–217, 2006.

LÓPEZ, V.; VILLATORO, D.; ORTIZ, S.; LÓPEZ, P.; NAVAS, J.; J. DÁVILA, C.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, J. V. Molecular tracking of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig abattoir and processing plant. **Meat Science**, v. 78, p. 130–134, 2008.

LOMONACO, S.; LUCIA DECASTELLI, L.; NUCERA, D.; GALLINA, S.; BIANCHI, D. M.; CIVERA, T. *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola: Subtypes, diversity and persistence over time. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 516–520, 2009.

LOW, J. C.; DONACHIE, W. A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. **The Veterinarian Journal**. v. 153, p. 9-29, 1997.

LUDÉN, J. M.; AUTIO, T. J.; SJÖBERG, A. M.; KORKEALA, H. J. Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 11, p. 2062-2069, 2003.

LUDÉN, JANNE. **Persistent *Listeria monocytogenes* contamination in food processing plants**. 2004. 68p. Department of Food and Environmental Hygiene Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki, Finland.

LUKINMAA, S.; MIETTINEN, M.; NAKARI, U-M.; KORKEALA, H. and SIITONEN, A. *Listeria monocytogenes* Isolates from Invasive Infections: Variation of Sero- and Genotypes during an 11-Year Period in Finland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1694–1700, 2003.

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

MEDRALA, D.; DABROWSKI, W.; CZEKAJO-KOODZIEJ, U.; DACZKOWSKA-KOZON, E.; KORONKIEWICZ, A.; AUGUSTYNOWICZ, E.; MANZANO, M. Persistence of *Listeria monocytogenes* strains isolated from products in a Polish fish-processing plant over a 1-year period. **Food Microbiology**, v. 20, p.715–724, 2003.

MIETTINEN, M. K.; SIITONEN, A.; HEISKANEN, P.; HAAJANEN, H.; BJORKROTH, K. J.; KORKEALA, H. J. Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 2849-2857, 2002.

MONTEVILLE, T. J. AND MATHEWS, K. Food Microbiology: an introduction. ASM Press, American Society for Microbiology, 2005.

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

NAKAMURA, H.; HATANAKA, M.; OCHI, K.; NAGAO, M.; OGASAWARA, J.; HASE, A.; KITASE, T.; HARUKI, K.; NISHIKAWA, Y. *Listeria monocytogenes* isolated from cold-smoked fish products in Osaka City, Japan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 323– 328, 2004.

NADON, C.A.; WOODWARD, D.L.; YOUNG, C.; RODGERS, F.G. AND WIEDMANN, M. Correlations between Molecular Subtyping and Serotyping of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2704-2707. 2001.

NALÉRIO, É. S. Aspectos epidemiológicos e moleculares de *Listeria* spp. e de *Listeria monocytogenes* na cadeia produtiva de frango do sul do Rio Grande do Sul. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial/ UFPel, 2007.

NEVES, E.; LOURENÇO, A.; SILVA, A. N.; COUTINHO, R.; BRITO, L. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from different sources and geographical origins and representative of the twelve serovars. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 31, p. 387-392, 2008.

NILSSON, L.; CHEN, Y.; CHIKINDAS, M. L.; HUSS, H. H.; GRAM, L.; MONTVILLE, T. J. Carbon Dioxide and Nisin Act Synergistically on *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 769–774, 2002.

PECCIO, A.; AUTIO, T.; KORKEALA, H.; ROSMINI R. AND TREVISANI, M. *Listeria monocytogenes* occurrence and characterization in meat-producing plants. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 234–238, 2003.

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

RAGON, M.; WIRTH, T.; HOLLANDT, F.; LAVENIR, R.; LECUIT, M.; LE MONNIER, BRISSE, A. S. A New Perspective on *Listeria monocytogenes* Evolution. **PLoS Pathogens**, www.plospathogens.org, v. 4, 2008.

RAMASWAMY, R.; CRESENCE, V. M.; REJITHA, J. S.; LEKSHMI, M. U.; DHARSANA, K. S.; PRASAD, S. P.; VIJILA, H. M. *Listeria* – review of epidemiology and pathogenesis. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 40, p. 4-13, 2007.

REVAZISHVILI, T.; KOTETISHVILI, M.; STINE, O. C.; KREGER, A. S.; MORRIS JR., J. G. and SULAKVELIDZE, A. Comparative Analysis of Multilocus Sequence Typing and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Characterizing *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Environmental and Clinical Sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 276–285, 2004.

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

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

ROCOURT, J. BUCHIESER, C. The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic Position, Taxonomy, and Identification, p. 1-20. In: E. T. RYSER, E. T., MARTH, E. H. *Listeria*, Listeriosis and Food Safety, 3rd ed. CRC PRESS, New York, 2007. Disponível em: <http://books.google.com.br/books>. Acesso em 02/2008.

SEELIGER, H. P. R. & JONES, D. Genus *Listeria*. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 9^a ed. Baltimore: Williams e Wilkins. v. 2, p 1235-1245, 1986.

SILVA, W. P.; LAER, A. E. von; LIMA, A. S. ; TECHERA, S. B. C. ; MATA, M. M. ; JANTZEN, M. M. . Status higiênico-sanitário de queijos do tipo Minas produzidos de forma artesanal e comercializados em Pelotas, RS. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Belo Horizonte, v. 61, n. 349, p. 37-42, 2006.

SCHWARZ, S. and LIEBISCH, B. Pulsed-field gel electrophoretic identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium live vaccine strain Zoosaloral H. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, p. 469-472, 1994.

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

SPERRY, K. E. V.; SOPHIA KATHARIOU, S.; EDWARDS, J. S. and WOLF, L. A. Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis as a Tool for Subtyping *Listeria monocytogenes* Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1435–1450, 2008.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 1236-1243, 2007.

TAKAHASHI H.; HANDA-MIYA, S.; KIMURA, B.; SATO, M.; YOKOI A.; GOTO S.; WATANABE, I.; KODA, T.; HISA, K.; FUJII, T. 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**., v. 118, p. 274–284, 2007.

TASARA, T. and STEPHAN, R. Cold stress tolerance of *Listeria monocytogenes*: a review of molecular adaptive mechanisms and food safety implications. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 6, p. 1473–1484. 2006.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. M.; PERSING, D. H. and SWAMINATHAN, B. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233–2239, 1995.

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

TORRES, K; SIERRA, S.; POUTOU, R.; CARRASCAL, A.; MERCADO, M. Patogenesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonotico emergente. **MVZ-Córdoba**, 10 : (1), 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.

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

VELA, A. I.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J. F.; VAZQUEZ, J. A.; LATRE, M. V.; BLANCO, M. M.; MORENO, M. A.; FUENTE, L. DE LA; J. MARCO, J.; FRANCO, C.; CEPEDA, A.; RODRIGUEZ MOURE, A. A.; SUAREZ, G. AND DOMINGUEZ, L. Molecular Typing by Pulsed-Field Gel Electrophoresis of Spanish Animal and Human *Listeria monocytogenes* Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 5840–5843, 2001.

WIEDMANN, M. Molecular Subtyping Methods for *Listeria monocytogenes*. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 2, 2002.

WHO/FAO. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. **Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods**. Technical report. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety>, 2004.

WHO/FAO. Proposed draft guidelines on the application of general principles of food hygiene to the [control] of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME CODEX COMMITTEE ON FOOD HYGIENE. Thirty-Seventh Session Buenos Aires, Argentina, March 14 – 19, 2005.

ZHANG, W.; JAYARAO, B. dM. an KNABEL, S. J. Multi-Virulence-Locus Sequence Typing of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 913–920, 2004.

ZHANG, Y.; YEH. E.; HALL, G.; CRIPE, J.; BHAGWAT, A.A.; MENG, J. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p. 47-53, 2007.