

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MALLU JAGNOW SERENO

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* EM
AMBIENTE DE ABATE E PROCESSAMENTO DE CARNE SUÍNA**



PALOTINA

2018

MALLU JAGNOW SERENO

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* EM
AMBIENTE DE ABATE E PROCESSAMENTO DE CARNE SUÍNA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Microbiologia Aplicada à Produção Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

PALOTINA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S483 Sereno, Mallu Jagnow
 Isolamento e caracterização de *Listeria monocytogenes* em
 ambiente de abate e processamento de carne suína / Mallu
 Jagnow Sereno. -- Palotina, 2018
 94f.

 Orientador: Luciano dos Santos Bersot
 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
 Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

 1. Biofilme. 2. Carne suína. 3. Esteria. 4. Listeriose.
 5. Sala de cortes. 5. Virulência. I. Bersot, Luciano dos Santos.
 II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDU 636.4



TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MALLU JAGNOW SERENO** intitulada: **Isolamento e caracterização de *Listeria monocytogenes* em ambientes de abate e processamento de carne suína**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APPROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Palotina, 15 de Fevereiro de 2018.

LUCIANO DOS SANTOS BERSOT
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

LUÍS AUGUSTO NERO
Avaliador Externo (UFV)

JULIANO GONÇALVES PEREIRA
Avaliador Externo (UNIPAMPA)

VINICIUS CUNHA BARCELLOS
Avaliador Interno (UFPR)

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Mallu Jagnow Sereno, filha de Tania Marli Jagnow Sereno e Orlei Cosme Sereno, nascida em 27 de maio de 1991 no município de Assis Chateaubriand, estado do Paraná. Médica Veterinária formada no ano de 2014 pela Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina (UFPR). Residente em Inspeção de Produtos de Origem Animal no Programa de Residência em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina (2014-2016). Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina na linha de pesquisa Microbiologia aplicada à Produção Animal.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus pela tranquilização durante meus desabafos, renovando a cada dia minhas forças e disposição para continuar firme e seguindo em frente, mesmo diante de tantas dúvidas e medos.

Aos meus pais, Orlei e Tânia, pela dedicação incondicional na minha educação. Por sempre estarem presentes em minha vida, pelo amor, carinho, colo, zelo, ao longo de todos esses anos, além do apoio, do incentivo e da segurança que sempre me transmitiram para eu vencer as dificuldades.

À minha irmã Vanessa por toda cumplicidade, por fazer tão bem o papel de “irmã mais velha” me cuidando e acreditando em mim. Ao meu namorado Daniel pelo apoio, pela enorme paciência nos momentos de crise, por entender a ausência nos momentos em que foi necessária dedicação exclusiva aos estudos. Obrigada por todo amor, incentivo e compreensão! E a toda minha família, pela união e por torcerem por mim.

Às amigas Isabelle, Karol, Kássia e Shaiely, que mesmo cada uma correndo atrás dos próprios objetivos, sempre estiveram de alguma forma me apoiando. Somos prova de que a amizade verdadeira pode resistir anos, mesmo com distância e falta de tempo.

À minha amiga, psicóloga e conselheira amorosa Cibeli, que sempre tomei como exemplo de caráter e também de sabedoria. Obrigada pela sinceridade, pelo companheirismo, por compartilhar um pouco das minhas “loucuras” e por sempre me fazer ver o lado positivo das coisas ajudando, assim, deixar a vida mais leve. Obrigada por me entender tão bem e sempre acertar nos conselhos.

À minha dupla quase perfeita, Kadigia, que não precisou muito para estar nos entendendo em meio a tanta dedução (“pega o vidro vermelho que está na geladeira mas que na verdade é o pote de plástico azul do armário”). Obrigada pelo companheirismo e amizade dentro e fora do laboratório. Confesso que sentirei falta do nosso convívio diário, da sua ajuda, das nossas discussões científicas, dos nossos almoços.

E não podia faltar um agradecimento em conjunto as duas por toda paciência e compreensão ao longo do nosso agitado “projeto suínos”, que além de ter rendido bons trabalhos, rendeu uma parceria incrível!

Agradeço também à minha técnica preferida Rosana, que muitas vezes me socorreu em meio às loucuras do laboratório, obrigada por toda ajuda e pela amizade, e aos demais colegas de laboratório (estagiários, “ic’s”, residentes, mestrandos... impossível citar nomes, afinal são quase dez anos compartilhando experiência, ajuda, muita lavagem de vidraria, conversas, confraternização, num mesmo laboratório). Ao LACOMA e à Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina pela oportunidade de aprendizagem e crescimento profissional desde 2009.

Um agradecimento especial ao Professor Luciano dos Santos Bersot pela orientação desde o segundo período da faculdade, com estágios e iniciação científica, até a residência e mestrado. Obrigada pela importante contribuição ao longo de todos esses anos para minha formação profissional e construção pessoal.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Professor Luís Augusto Nero, por todo apoio intelectual, pela parceria no projeto e por disponibilizar o laboratório e tudo o que foi necessário para a realização de importantes etapas desse trabalho. Obrigada também por ter aceitado participar da banca. À todos do InsPOA-UFV e laboratórios “anexos”, em especial à Rafa, Danilo, Anderson e ao Professor Ricardo que me ensinaram e auxiliaram nas análises moleculares desse projeto e que aguentaram meus “choros” com o PFGE que não dava certo, e também pela comemoração por tudo ter acabado bem.

Ao professor Vinícius Cunha Barcellos por ter aceitado o convite para participar da banca como membro suplente, participando ativamente na correção da dissertação. Ao professor Juliano Gonçalves Pereira por ter aceitado o convite para participar da banca, além de toda contribuição científica e amizade no tempo em que atuou como professor substituto na UFPR.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG por viabilizar a execução do projeto através do financiamento concedido via chamada conjunta de projetos FAPEMIG/EMBRAPA (CVZ-APQ-03166-13), Edital 11/2013. E a CAPES pelo subsídio da minha bolsa de mestrado.

À todos muito obrigada!

*"O coração do homem pode fazer planos, mas a resposta certa vem do Senhor.
Todos os caminhos do homem são puros aos seus olhos, mas o Senhor pesa o
espírito. Confia ao Senhor as tuas obras, e os teus desígnios serão estabelecidos."*

Provérbios 16:1-3

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo realizar um levantamento da contaminação por *Listeria monocytogenes* na cadeia produtiva de suínos. Amostras de água, ração e piso de pocilga obtidas de granjas de terminação de suínos, e superfícies de carcaças (após sangria, após chamuscamento, após evisceração e após lavagem final), cortes cárneos, utensílios, equipamentos e instalações amostradas de um abatedouro frigorífico de suínos, totalizando 894 amostras, foram coletadas no estado do Paraná (BR) entre setembro de 2016 e fevereiro de 2017. Todas as amostras foram submetidas à pesquisa de *Listeria* spp. de acordo com a ISO 11.290 com modificações. Os isolados suspeitos foram submetidos à identificação bioquímica, sorotipificação molecular e eletroforese em gel em campo pulsado. Isolados confirmados como *L. monocytogenes* foram submetidos à detecção de genes de virulência (*inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *hlyA*, *actA* e *iap*), testes de resistência a antimicrobianos e avaliação da capacidade de adesão em microplaca de poliestireno. Das 894 amostras obtidas, 18 (2,0%) foram positivas para *Listeria* spp. Destas, 16 (1,8%) amostras obtidas de piso da pocilga de espera, ralo da sala de abate e faca, tábua de corte, esteira condutora para embalagem final e ralo da sala de corte foram confirmadas para *L. monocytogenes* e duas (0,2%) para *L. innocua* (uma amostra obtida de piso da pocilga de espera e uma amostra obtida de ralo da sala de corte). Todos os isolados de *L. monocytogenes* foram do sorogrupo molecular IVb e apenas um apresentou pulsotipo diferente. Oitenta e sete isolados de *L. monocytogenes* foram submetidos à pesquisa de genes de virulência, sendo que 93,1% (81/87) apresentaram todos os genes pesquisados. Apenas uma cepa não apresentou os genes *inlA* e *inlC* e seis cepas não apresentaram o gene *inlB*. Esses isolados apresentaram suscetibilidade à maioria dos antimicrobianos testados, no entanto, 100% dos isolados foram resistentes à ampicilina, 18,8% à penicilina e 6,2% à sulfametaxazol-trimetropim. Com relação à capacidade de adesão em superfície, todos os isolados foram classificados como fracamente aderente. *L. monocytogenes* não foi detectada nas amostras obtidas nas granjas de terminação, sendo a maior frequência de isolamento do patógeno encontrada nas etapas finais de manipulação da carne suína no abatedouro frigorífico. Através da determinação do perfil genético, foi constatado uma persistência de clones de *L. monocytogenes* IVb no ambiente industrial, com os principais genes de virulência e com resistência frente aos antimicrobianos de escolha no tratamento de listeriose. A capacidade de adesão verificada pode justificar a manutenção desses microorganismos no estabelecimento, demonstrando assim, a necessidade do controle permanente de *L. monocytogenes* na indústria, sobretudo no ambiente de processamento, visando minimizar a contaminação de produtos finais com um patógeno de importância em saúde pública.

Palavras-chave: biofilme; carne suína; esteira; listeriose; sala de cortes; virulência

ABSTRACT

The purpose of this research was to evaluate *Listeria monocytogenes* contamination in the pork production chain. Samples of water, feed and floor of pork barns from finishing farms, and carcass surfaces (after bleeding, after buckling, after evisceration and after the final washing), meat cuts, utensils, equipment and facilities sampled from pork slaughterhouse, totaling 894 samples, were collected in the state of Paraná (BR) between September/2016 and February/2017. All samples were submitted to *Listeria* spp. detection and confirmation according to ISO 11290 protocol with adaptations. The suspected isolates were submitted to biochemical identification, molecular serotyping and pulsed field gel electrophoresis. Beyond that, confirmed isolates of *L. monocytogenes* were submitted to the detection of virulence genes (*inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *hlyA*, *actA* e *iap*), antimicrobial resistance tests and evaluation of the adhesion capacity in polystyrene microplate. After 894 samples obtained, 18 (2.0%) were positive for *Listeria* spp., 16 (1.8%) samples obtained from floor of lairage, drain of slaughter room and knife, cutting board, conveyor belt that carried the meat cuts to final packaging and drain of cutting room were positive for *L. monocytogenes* and two (0.2%) for *L. innocua* (a sample obtained from the floor of lairage and a sample obtained from the cutting room drain). All isolates of *L. monocytogenes* were from molecular serogroup IVb and only one showed different pulsotypes. Eighty-seven isolates of *L. monocytogenes* were characterized, in which 93,1% of the isolates presented all the genes studied. Only one strain did not present the *inlA* and *inlC* genes and six strains lacked the *inlB* gene. These isolates showed susceptibility to most of the antimicrobials tested, however, 100% of isolates were resistant to ampicillin, 18.8% to penicillin and 6.25% to sulfamethoxazole-trimethoprim. The isolates showed adhesion capacity on surface, and all of them were classified as weakly adherent. *L. monocytogenes* was not detected in the samples obtained in the finishing farms, with the highest frequency of pathogen isolation found in the final stages of handling of pork meat in the slaughterhouse. Through the determination of the genetic profile, it was observed a persistence of clones of *L. monocytogenes* IVb in the industrial environment, with the major virulence genes and with resistance against the antimicrobials used in the treatment of listeriosis. The adhesion capacity verified may justify the maintenance of these microorganisms in the establishment, demonstrating the necessity for permanent control of *L. monocytogenes* in the industry, especially in the processing environment, in order to minimize the contamination of final products with a pathogen, which is important when it comes to public health.

Keywords: biofilm; swine meat; conveyor belt; listeriosis; cutting room; virulence

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

FIGURA 1 – ETAPAS DO CICLO DE INFECÇÃO INTRACELULAR DE <i>Listeria monocytogenes</i>	23
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ORGANIZAÇÃO E CONTROLE DE REGULAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA DE <i>L. monocytogenes</i> AGRUPADOS NO CROMOSSOMO DA BACTÉRIA	26

Capítulo I

FIGURA 1 – PADRÕES DE PFGE APÓS A MACRORRESTRIÇÃO (ENZIMAS APAI E ASCI) DOS ISOLADOS DE <i>Listeria</i> spp. OBTIDOS DAS AMOSTRAS COLETADAS EM UM ABATEDOURO FRIGORÍFICO DE SUÍNOS AO LONGO DE DEZ COLETAS REALIZADAS ENTRE SET/2016 E FEV/2017.....	47
FIGURA 2 – PERSISTÊNCIA DE CLONES DE <i>L. monocytogenes</i> EM UM ABATEDOURO FRIGORÍFICO DE SUÍNOS EM DEZ COLETAS REALIZADAS ENTRE SET/2016 A FEV/2017.....	48

LISTA DE GRÁFICOS

Apêndice 1

GRÁFICO 1 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA **AMPICILINA** SEGUNDO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE DEZESSEIS ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes*86

GRÁFICO 1 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA **AMPICILINA** SEGUNDO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE DEZESSEIS ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* (continuação).....87

GRÁFICO 2 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA **PENICILINA** SEGUNDO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE DEZESSEIS ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes*88

GRÁFICO 2 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA **PENICILINA** SEGUNDO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE DEZESSEIS ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* (continuação).....89

GRÁFICO 3 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA **SULFAMETAXAZOL-TRIMETROPIM** SEGUNDO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE DEZESSEIS ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes*90

GRÁFICO 3 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA **SULFAMETAXAZOL-TRIMETROPIM** SEGUNDO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE DEZESSEIS ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* (continuação).....91

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Listeria</i> DE ACORDO COM SUAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS (WELLER, 2015)	19
---	----

Capítulo I

TABELA 1 – AMOSTRAS COLETADAS EM DEZ GRANJAS DE TERMINAÇÃO DE SUÍNOS E EM UM ABATEDOURO FRIGORÍFICO DE SUÍNOS AO LONGO DE DEZ REPETIÇÕES REALIZADAS ENTRE SET/2016 E FEV/2017	40
TABELA 02 – GENES ALVO E SEQUÊNCIAS DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA SOROTIPIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>L. monocytogenes</i>	42
TABELA 03 – RESULTADO DA PRESENÇA DE <i>Listeria</i> spp., <i>L. monocytogenes</i> E <i>L. innocua</i> EM AMOSTRAS OBTIDAS ENTRE SET/2016 E FEV/2017 DE UM ABATEDOURO FRIGORÍFICO DE SUÍNOS.....	44

Capítulo II

TABELA 01 – IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS DE <i>Listeria monocytogenes</i> OBTIDAS DE UM ABATEDOURO FRIGORÍFICO DE SUÍNOS LOCALIZADO NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL	54
TABELA 02 – GENES ALVO E SEQUÊNCIAS DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL DE VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS DE <i>Listeria monocytogenes</i>	55
TABELA 03 – PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE 87 CEPAS DE <i>L. monocytogenes</i> OBTIDAS DE UM ABATERDOURO FRIGORÍFICO DE SUÍNOS...	59
TABELA 04 – SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>L. monocytogenes</i> SEGUNDO PADRÕES INTERPRETATIVOS DETERMINADOS PELO CLSI (2011).....	60

Apêndice 1

TABELA 01 – CEPAS DE *Listeria monocytogenes* TESTADAS ATRAVÉS DO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA84

TABELA 2 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA **AMPICILINA** SEGUNDO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE DEZESSEIS ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes*86

TABELA 2 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA **AMPICILINA** SEGUNDO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE DEZESSEIS ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* (continuação)87

TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA **PENICILINA** SEGUNDO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE DEZESSEIS ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes*88

TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA **PENICILINA** SEGUNDO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE DEZESSEIS ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* (continuação)89

TABELA 4 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA **SULFAMETAXAZOL-TRIMETROPIM** SEGUNDO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE DEZESSEIS ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes*90

TABELA 4 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA **SULFAMETAXAZOL-TRIMETROPIM** SEGUNDO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE DEZESSEIS ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* (continuação)91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Act	- <i>Actin Nucleating Factor</i>
ALOA	- <i>Chromogenic Listeria Agar</i>
AM	- Aeróbios Mesófilos
APHA	- <i>American Public Health Association</i>
APPCC	- Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BPF	- Boas Práticas de Fabricação
CAMP	- Christie, Atkins e Munch-Petersen
CDC	- Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CFSAN/US	- Centro de Segurança Alimentar e Nutrição Aplicada/Estados Unidos
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CLSI	- <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DO	- Densidade Óptica
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
Hly	- Hemolisina
Hpt	- Transportador de hexoses fosfatadas
IN	- Instrução Normativa
Inl	- Internalina
LEB	- Caldo enriquecimento para <i>Listeria</i>
LIPI-1	- Ilha de patogenicidade de <i>Listeria</i> 1
LLO	- Listeriolisina-O
MAPA	- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MLSB	- Macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B
MLST	- <i>Multilocus Sequence Typing</i>

OXA	- <i>Oxford Listeria Agar</i>
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	- Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
Plc	- Fosfolipase C
PrfA	- <i>Positive Regulatory Factor A</i>
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada
TSA	- Ágar Trypticase de Soja
TSB	- Caldo Trypticase de Soja
UE	- União Européia
UFC	- Unidade Formadora de Colônia
YE	- Extrato de Levedura

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 CARACTERÍSTICAS DE <i>Listeria monocytogenes</i>	18
2.2 PATOGENICIDADE	22
2.2.1 Ciclo intracelular de infecção	23
2.2.2 Genes de virulência	25
2.3 LISTERIOSE ALIMENTAR EM HUMANOS	28
2.4 <i>Listeria monocytogenes</i> EM AMBIENTES INDUSTRIAIS E ALIMENTOS	31
3 OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 CAPÍTULO I - PESQUISA E DETERMINAÇÃO DO PERFIL GENÉTICO DE <i>Listeria monocytogenes</i> EM CADEIA PRODUTIVA E AMBIENTE DE ABATE E PROCESSAMENTO DE SUÍNOS	37
4.1 INTRODUÇÃO	37
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.2.1 Amostragem	39
4.2.2 Pesquisa de <i>Listeria</i> spp.	41
4.2.3 Sorotipificação molecular dos isolados de <i>Listeria</i> spp.	42
4.2.4 PFGE	43
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.4 CONCLUSÃO	49
5 CAPÍTULO II – PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA, PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E CAPACIDADE DE ADESÃO <i>Listeria monocytogenes</i> ISOLADA DE ABATEDOURO FRIGORÍFICO DE SUÍNOS	51
5.1 INTRODUÇÃO	51

5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	54
5.2.1 Isolados de <i>Listeria monocytogenes</i>	54
5.2.2 Detecção dos genes de virulência	55
5.2.3 Suscetibilidade aos antimicrobianos	56
5.2.4 Microdiluição em caldo para teste de suscetibilidade a antimicrobianos	56
5.2.5 Potencial de adesão das cepas de <i>L. monocytogenes</i>	57
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.4 CONCLUSÕES.....	62
6 CONCLUSÕES FINAIS	63
REFERÊNCIAS.....	64
APÊNDICE 1 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA: METODOLOGIA E RESULTADOS DETALHADOS	84

1 INTRODUÇÃO

A alta prevalência de agentes patogênicos em alimentos e a ocorrência de surtos, resultando em hospitalizações e óbitos, fazem com que as doenças causadas pela ingestão de alimentos contaminados sejam, atualmente, um grande problema em saúde pública, além de atrair a atenção do consumidor e gerar preocupações no consumo de alguns produtos. Deste modo, para garantir a produção de alimentos seguros, a implantação de sistemas que melhorem a obtenção de alimentos livres de patógenos tornou-se exigência pelos órgãos oficiais de saúde (WHO, 2012).

Acredita-se que a associação de *Listeria monocytogenes* com doenças graves em humanos, esteja relacionada à ingestão de alimentos, sendo esta, portanto, a principal forma de transmissão desse micro-organismo. A listeriose humana ocorre principalmente em gestantes, recém nascidos, idosos e pacientes imunocomprometidos, podendo levar a quadros de bacteremia e infecções do sistema nervoso central. Apesar da baixa incidência, a listeriose representa importante risco à saúde pelo grau da severidade das sequelas, provocando hospitalização em 90% dos casos confirmados, e alto índice de mortalidade com uma taxa que varia entre 20 e 30% (SCALLAN et al., 2011; EFSA, 2015).

Listeria monocytogenes encontra-se em baixas frequências em suínos a serem abatidos, porém devido à sua capacidade de adesão, o patógeno pode persistir por longos períodos em superfícies de utensílios e equipamentos utilizados no ambiente de abate e processamento, sendo esta sua principal relação com a presença em alimentos (BARROS et al., 2007). Neste contexto, a carne suína assume um importante papel epidemiológico na transmissão de *L. monocytogenes* para o homem onde pode veicular o patógeno, atuando como fonte de contaminação cruzada tanto dentro da própria indústria, quanto por contaminação no ponto de distribuição, venda do produto ou no ambiente doméstico (CARPENTIER & CERF, 2011).

Ainda, o uso da carne suína na elaboração de alimentos pronto para o consumo é uma prática comum. Esses alimentos são mais suscetíveis a presença de *L. monocytogenes* devido ao processo tecnológico de elaboração, que nem sempre requer o tratamento térmico como forma de obtenção do produto. e que

pode não ser capaz de inativar totalmente as células bacterianas. Além disso, alguns produtos podem ser submetidos a etapas adicionais como o fatiamento ou nova embalagem antes de sua comercialização, podendo assim, serem expostos a uma contaminação pós-processamento (GIBBONS et al., 2006; MARTINS & GERMANO, 2011).

Com relação ao ambiente de abate e processamento de suínos, a disseminação de *L. monocytogenes* não está bem esclarecida. Desse modo, torna-se relevante avaliar sua presença nas plantas frigoríficas gerando informações que auxiliem no controle da contaminação e assegurem a qualidade dos produtos destinados ao consumo humano.

Além do levantamento desses micro-organismos utilizando metodologias atuais e confiáveis, a determinação de seus perfis genéticos possibilita o melhor entendimento acerca das rotas de contaminação e associação precisa entre isolados obtidos de alimentos e de amostras clínicas. Ainda, a verificação do grau de patogenicidade, capacidade de adesão e determinação do potencial de resistência frente aos antimicrobianos dos isolados são importantes ferramentas para estudos epidemiológicos, auxiliando desta forma no entendimento da disseminação desse agente ao longo da cadeia produtiva.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS DE *Listeria monocytogenes*

Atualmente, o gênero *Listeria* compreende dezessete espécies validadas, cuja classificação se baseia em características bioquímicas (TABELA 01), são elas: *L. monocytogenes* (PIRIE, 1940), *L. grayi* (LARSEN & SEELIGER, 1966), *L. innocua* (SEELIGER, 1981), *L. welshimeri*, *L. seeligeri* (ROCOURT & GRIMONT, 1983), *L. ivanovii* (SEELIGER et al., 1984), *L. marthii* (GRAVES et al., 2010), *L. rocourtiae* (LECLERCQ et al., 2010), *L. fleischmannii* (BERTSCH et al., 2013), *L. weihenstephanensis* (HALTER et al., 2013), *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensis* (DEN BAKKER et al., 2014), *L. booriae* e *L. newyorkensis* (WELLER et al., 2015).

Destas, apenas duas são consideradas patogênicas: *L. monocytogenes*, que pode infectar uma variedade de espécies animais, incluindo a humana e cujo potencial patogênico é evidenciado pela sua relação com importantes surtos decorrentes da ingestão de alimentos contaminados; *L. ivanovii*, que possui importância epidemiológica ligada aos ruminantes (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001; BATZ et al., 2005; JAY, LOESSNER & GOLDEN, 2005; LECLERCQ et al., 2010; PAINTER et al., 2013).

Esses micro-organismos estão amplamente disseminados no meio ambiente e podem ser isolados de vegetação, solo, fezes humanas e de animais, matéria em decomposição, efluente de esgoto e água. Ainda, podem se multiplicar em alimentos, como leite cru, queijos, carnes frescas e congeladas, aves, frutos do mar, frutas e produtos hortícolas, bem como em ambiente e equipamentos de indústrias processadoras de alimentos (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001; BHUNIA, 2008).

O gênero é caracterizado por micro-organismos Gram-positivos, não formadores de esporos, classificado quanto à morfologia em bacilos curtos (0,4 a 0,5 µm de diâmetro e 0,5 a 2 µm de comprimento). São anaeróbios facultativos, multiplicam-se bem em ambientes com baixa quantidade de oxigênio e com aumento na tensão de gás carbônico, como no caso de alimentos embalados a vácuo ou em atmosfera modificada (BREED et al., 1948; HOLT et al., 1994; DOYLE

et al., 1997; NILSSON et al., 2000; JAY, LOESSNER & GOLDEN, 2005; JAY, 2005; FRANCO & LANDGRAF, 2008).

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Listeria* DE ACORDO COM SUAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

CARACTERÍSTICA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-
Redução de nitrato	-	-	-	-	-	-	V	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Motilidade	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vermelho de metila	+	+	+	+	+	+	+	v	v	v	+	V	+	+	+	+	+
Hemólise	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arilamidase	-	+	+	V	v	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Manosidade	+	+	-	-	+	+	V	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
PI-PLC	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitól*	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	V	+	-	-	-	+
D-Xilose*	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Rhamnose*	+	v	-	-	v	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	v	+
α-Metil-D-glicose*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
D-Ribose*	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	v	+	+	+	-	+	v
Glicose-1-fosfato*	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose*	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
D-Manitol*	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	v	-	v	-	-	+	+
Sacarose*	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-
Turanose*	-	v	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-
Glicerol*	V	+	+	+	+	-	V	+	+	v	v	-	+	v	-	+	+
D-Galactose*	V	-	-	V	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
L-Arabinose*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	+	-	-	+	+	+	+
L-Sorbose*	v!	v!	-	v!	-	v!	v!	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-
Inositol*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	v	v	-	-	-
α-Metil-D-Manose*	-	-	ND	-	ND	-	+	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-
Maltose*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Lactose*	+	+	+	+	+	+	+	+	v!	(+)	+	-	+	-	+	+	+
Melibiose*	v!	v	-	-	-	v	-	+	-	-	v	-	v	-	-	-	+
Inulina*	v!	v!	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Melezitose*	V	v	V	V	v	-	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-
D-Lixose*	V	v	-	-	v	-	V	-	-	-	-	-	-	v	+	-	-
D-glicose*	v!	v!	+	v!	+	v!	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Cepas: 1 - *L. monocytogenes*; 2 - *L. innocua*; 3 - *L. seeligeri*; 4 - *L. ivanovii*; 5 - *L. welshimeri*; 6 - *L. marthii*; 7 - *L. grayi*; 8- *L. rocourtiae*; 9 - *L. weihenstephanensis*; 10 - *L. cornellensis*; 11 - *L. riparia*; 12 - *L. grandensis*; 13 - *L. fleischmannii*; 14 - *L. aquatica*; 15 - *L. floridensis*; 16 - *L. newyorkensis*; 17 - *L. booriae*. Todas as espécies são catalase-positiva e positivas para a produção de ácido a partir da esculina citrato férrico, N-acetilglucosamina, amigdalina, arbutina, salicina, celobiose, D-frutose e D-manose. Todos são negativos para a redução de nitrito e produção de ácido a partir de D-arabinose, D-adonitol, metilo β-D-xilopiranosido, rafinose, glicogênio, L-fucose, gluconato de potássio, 2-cetogluconate e de potássio a 5-cetogluconate.*Acidificação através do metabolismo dos compostos; +: Positiva; (+): Fracamente positivo; -: Negativo; v: variável (entre replicados e / ou entre estirpes); v!: variável entre os estudos (possivelmente devido a diferenças nos tempos e temperaturas de incubação entre os estudos); ND: não determinado ou não registrados. PI-PLC: fosfatidilinositol fosfolipase C. FONTE: Weller et al. (2015).

L. monocytogenes pode se multiplicar em uma ampla faixa de pH (4,6 – 9,6) e temperatura (0 a 45°C), sendo reconhecido como psicrotrófico, além de tolerar concentrações salinas elevadas (≥10%), e capacidade de sobreviver em condições

ambientais desfavoráveis (DOYLE et al., 1997; JAY, LOESSNER & GOLDEN, 2005; JAY, 2005; GANDHI & CHIKINDAS, 2007; FRANCO & LANDGRAF, 2008). Essa característica psicrotrófica é possível devido um prolongamento da fase lag em temperaturas de refrigeração e da integridade celular, onde o sistema de transporte energético resistente ao frio estimula o metabolismo sob baixas temperaturas, propiciando altas concentrações de substratos intracelulares (MANTILLA et al., 2007). O congelamento a -18°C e descongelamentos sucessivos não são capazes de inativar essa espécie (COLE et al., 1990; SCHUCHAT et al., 1991; JAY, LOESSNER & GOLDEN, 2005).

L. monocytogenes é capaz de hidrolisar a esculina e se desenvolver na presença de 10% a 40% de bile. As exigências nutricionais para a multiplicação dessa bactéria são praticamente as mesmas das outras bactérias Gram-positivas (JAY, LOESSNER & GOLDEN, 2005). Apresentam motilidade característica (forma de “guarda-chuva”) a temperatura de 25°C devido à presença de flagelos peritríquios. Apesar de apresentar-se morfológicamente semelhante às demais espécies do gênero, possui características bioquímicas específicas, tais como produção de compostos ácidos a partir da fermentação de L-ramnose e α -metil-D-manosídeo. Esse patógeno cresce bem em ágar sangue de equino (7% v/v), produzindo colônias branco-acinzentadas com β -hemólise (hemólise total). Apresenta fator CAMP (Christie, Atkins e Munch-Petersen) positivo com *Staphylococcus aureus*, mas não com *Rhodococcus equi* (MCKELLAR, 1994; SILVA et al., 2007).

L. monocytogenes é normalmente suscetível a vários antimicrobianos, não apresentando resistência frente ao uso de ampicilina ou de penicilina, mas possui uma resistência intrínseca frente às cefalosporinas (CHARPENTIER et al. 1999; POROS-GLUCHOWSKA et al. 2003; CLSI, 2006). Porém, o uso de antimicrobianos na criação de animais de produção, a ocorrência de mutação espontânea em bactérias de origem alimentar e a propagação de bactérias resistentes podem contribuir para o aumento da resistência antimicrobiana (MANTILLA et al. 2007; EFSA, 2008).

A célula de *L. monocytogenes* é composta por estruturas antigênicas expressas em sua superfície, incluindo ácidos lipotecóicos, proteínas de membrana e organelas extracelulares (como flagelos e fímbrias), que contribuem para a caracterização dos sorotipos, frequentemente utilizados em estudos

epidemiológicos. Essa caracterização se baseia na identificação de antígenos somáticos (O) relacionados aos polissacarídeos da parede celular, designado por números, e na identificação dos antígenos flagelares (H) relacionados a proteínas dos flagelos e representado por letras (FRANCO & LANDGRAF, 2005; FERREIRA & KNOBL, 2009). Atualmente, treze sorotipos de *L. monocytogenes* já foram identificados (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7), sendo essa heterogeneidade antigênica relacionada com o grande número de hospedeiros nos quais o agente é capaz de se multiplicar (JAY, LOESSNER & GOLDEN, 2005).

Todos os sorotipos de *L. monocytogenes* possuem potencial de causar listeriose em humanos (LOTFOLLAHI et al., 2017), no entanto, os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b estão envolvidos em mais de 95% dos casos (FARBER & PETERKIN, 1991; ROCOURT, 1996; CHAE & SCHRAFT, 2000; WIEDMANN et al., 2002; DOUMITH et al., 2004a; HAIN et al., 2007; LIU et al., 2007; PORT & FREITAG, 2007; SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007). Entre esses três sorotipos, as cepas do sorotipo 4b são associadas a mais de 50% dos casos da doença em todo o mundo (BORUCKI et al., 2003). Esta predominância sugere uma melhor adaptação aos tecidos dos hospedeiros mamíferos do que o sorotipo 1/2 (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001), que por sua vez é mais relacionado com alimentos e ambientes industriais (BORUCKI et al., 2003).

A identificação dos sorotipos de *Listeria* spp. é rotineiramente realizada pelo método tradicional de sorotipificação por aglutinação. No entanto, a reprodutibilidade desse método nem sempre é satisfatória. Além disso, a execução desse ensaio é limitada pelo custo, disponibilidade e a necessidade de conhecimentos técnicos para realizar o ensaio (DOUMITH et al., 2004a). Uma alternativa para essa classificação foi proposta por Doumith et al. (2005), na qual classifica em sorogrupos moleculares, através da reação em cadeia da polimerase (PCR), os quatro principais sorotipos de *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b) isolados de alimentos e pacientes: **Ila** (1/2a e 3a); **Ilb** (1/2b, 3b e 7); **Ilc** (1/2c e 3c); **Ivb** (4b, 4d e 4e); **L** (*L. monocytogenes* 4a, 4ab, 4c e *Listeria* spp.).

Embora o sorotipo exato não possa ser identificado com este ensaio de PCR multiplex, essa técnica possui várias vantagens em relação à sorotipificação tradicional como a rapidez, reprodutibilidade, menor custo e disponibilidade para qualquer laboratório que atualmente realiza ensaios de PCR. Esse teste também é adequado para rastreio rápido de um grande número de isolados e, portanto, é

valioso para investigações epidemiológicas na identificação rápida das cepas associadas com alimentos durante os surtos de listeriose (DOUMITH et al, 2005).

Ainda, as cepas de *L. monocytogenes* podem ser classificadas de acordo com linhagens evolucionárias diferenciadas por técnicas moleculares como *ribotyping*, eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e *multilocus sequence typing* – MLST, em linhagem I composta pelos sorotipos 4b, 1/2b, 3b e 3c; linhagem II pelos sorotipos 1/2a, 1/2c e 3a (PIFFARETTI et al., 1989); a linhagem III (RASMUSSEN et al., 1995) e a IV (ROBERTS et al., 2006; WARD et al., 2008), pelos sorotipos 4a, 4b e 4c.

2.2 PATOGENICIDADE

Ao longo do seu processo evolutivo, *L. monocytogenes* adquiriu uma variedade de fatores de virulência que lhe permitem viver em diferentes ambientes na forma livre, na forma de biofilmes ou na forma intracelular nas células do hospedeiro (SCORTTI et al., 2007; GIANOTTI et al., 2008; CAMARGO et al., 2016).

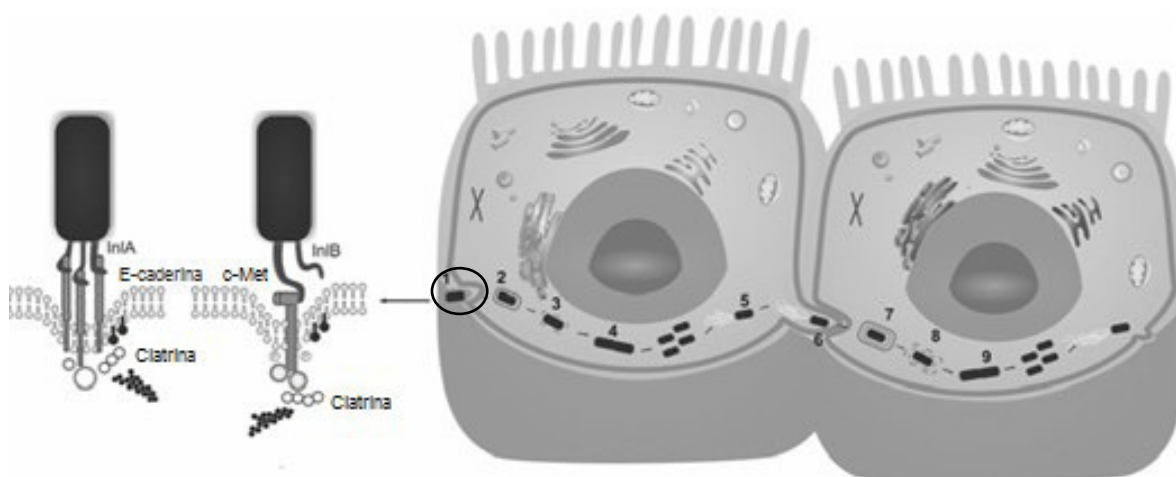
Em humanos, *L. monocytogenes* é considerado um patógeno oportunista uma vez que a ocorrência da infecção depende principalmente das condições imunológicas dos indivíduos afetados, além da capacidade inerente às cepas em sobreviver ao pH ácido do estômago e a presença de sais biliares no intestino, podendo cursar com quadro clínico não invasivo ou invasivo (CRUM, 2002; LIU et al., 2007; SEVEAU et al., 2007; CRUZ, MARTINEZ & DESTRO, 2008).

A listeriose não invasiva é caracterizada por uma infecção limitada ao intestino, cursando com gastroenterite febril acompanhada de vômito e diarreia, acometendo normalmente indivíduos saudáveis (CRUM, 2002; TODD & NOTERMANS, 2011). A listeriose invasiva está geralmente associada a grupos de risco, tais como grávidas, recém-nascidos, indivíduos idosos e em pacientes imunocomprometidos e é determinada pela habilidade do agente invadir as células e se multiplicar evitando o estímulo da resposta do sistema imune humoral. Essa habilidade também permite escapar da resposta imune celular por disseminar-se através da passagem célula-célula (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001; SEVEAU et al., 2007; CHATURONGAKUL et al., 2008; CRUZ, MARTINEZ & DESTRO, 2008; CHATURONGAKUL et al., 2008; TODD & NOTERMANS, 2011).

2.2.1 Ciclo intracelular de infecção

L. monocytogenes pode se proliferar dentro de macrófagos e em outras células não fagocíticas, como células epiteliais, células endoteliais, hepatócitos, fibroblastos e células do sistema nervoso. Em todas as células eucarióticas esse agente desenvolve um ciclo celular semelhante que pode ser dividido em invasão e escape do endossomo após a fagocitose (entrada na célula), multiplicação na célula hospedeira e invasão da célula vizinha (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001; BARBUDDHE et al, 2009) (FIGURA 01).

FIGURA 1 – ETAPAS DO CICLO DE INFECÇÃO INTRACELULAR DE *Listeria monocytogenes*



Legenda: (1) Ligação da célula bacteriana à superfície da célula hospedeira e a internalização, através de um mecanismo conhecido como “zíper”, promovido por duas proteínas de superfície listeriais (InlA e InlB) com os seus respectivos receptores da superfície celular (E-caderina e o receptor tirosina cinase c-Met); (2) Absorção do agente por meio da formação de endossomos; (3) Ruptura do endossomo mediada por três fatores: uma toxina formadora de poro (LLO) e duas fosfolipases (PlcA e PlcB); (4) Replicação no citosol celular; (5) Propagação bacteriana através da passagem de célula a célula, mediado pela proteína de superfície ActA (polimerização de actina), proporcionando motilidade de *Listeria* através do citoplasma; (6) Quando atinge a membrana plasmática, induz a formação de estruturas semelhantes a pseudópodes, permitindo a invasão da célula vizinha: esta atividade é mediada pela proteína InlC; (7) Fagocitose e formação de uma vacúolo de membrana dupla; (8) Ruptura do vacúolo; (9) Início de um novo ciclo de replicação e propagação. FONTE: adaptado de Camargo et al. (2016).

Após a ingestão de alimento contaminado, a primeira etapa do processo invasivo ocorre com a adesão bacteriana à superfície das células do intestino do hospedeiro, seguida da invasão através de fagocitose ou pela interação entre moléculas ligante presentes na superfície da bactéria e da célula epitelial intestinal. A invasão também pode ocorrer através das células M, com posterior colonização das placas de Peyer (MARCO, et al., 1992; LIU et al., 2007). A infecção pode se

estender aos tecidos mais profundos, com posterior disseminação via corrente sanguínea ou linfática em direção a órgãos alvos, como baço, fígado, sistema nervoso, placenta (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001; BARBUDDHE et al., 2009).

L. monocytogenes pode reconhecer diferentes receptores, incluindo glicoproteínas transmembranas como a E-caderina, receptor de molécula complemento (gC1qR), receptor de fator de crescimento de hepatócitos (Met), além de componentes da matriz extracelular, como as proteoglicanas (COSSART, 2001; PIZZARRO-CERDA & COSSART, 2006). Os principais ligantes desses receptores são as internalinas (Inl) A e B (codificadas pelos genes *inlA* e *inlB*), que são proteínas de superfície caracterizadas por possuir repetições ricas em leucina, responsáveis por intermediar a ligação com a célula do hospedeiro. Outras proteínas de superfície, como autolisinas (Ami, p60 e Auto), podem estar envolvidas no processo de invasão, porém atuando como adesinas (CABANES et al., 2004; DE LAS HERAS et al., 2011).

Após adesão bacteriana, se inicia uma cascata de reações que leva à internalização progressivamente da bactéria, através de um mecanismo conhecido como “zíper” (JARADAT & BHUNIA, 2002; LIU et al., 2007), resultando na absorção do agente por fagocitose. Em seguida, *L. monocytogenes* escapa do vacúolo fagocítico através da ação conjunta de três fatores: formação de poros pela listeriolisina-O (LLO – codificada pelo gene *hly*) e ação de duas fosfolipases C (Plc) denominadas PlcA e PlcB (codificadas pelos genes *plcA* e *plcB*), que são capazes de promover a degradação dos fosfolipídios presentes na membrana dos fagossomos (GOLDFINE et al., 1992; JARADAT & BHUNIA, 2002; LIU et al., 2007; MERTINS et al., 2007; TÉMOIN et al., 2008; CAMARGO et al., 2016).

A formação de poros ou as lesões da membrana desses fagossomos facilitam o acesso das fosfolipases, onde a PlcA atua de forma específica na degradação do fosfatidilinositol e a PlcB apresenta uma atividade proteolítica a um amplo espectro de substratos (fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletilonamina e esfingomielina), levando a uma total dissolução da barreira física que delimita o compartimento fagossômico. A PlcA, secretada por *L. monocytogenes*, parece atuar como um fator de virulência acessório, colaborando na lise do fagossomo junto com LLO e potencializando a atividade da PlcB. A PlcB é secretada pela bactéria em forma de proenzima inativa, que requer sua maturação citoplasmática pela clivagem

proteolítica, mediada por uma metaloprotease, codificada pelo gene *mpl* (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001; DE LAS HERAS et al., 2011).

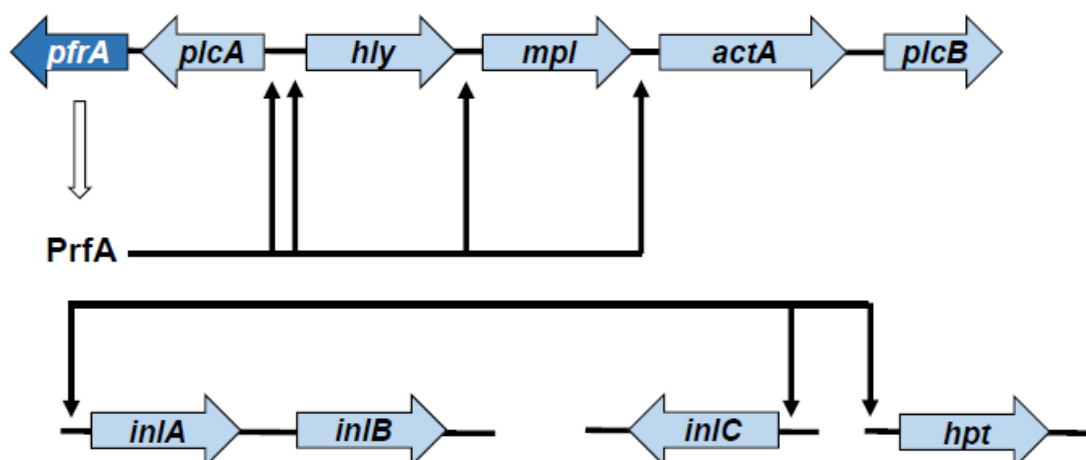
Livre no citosol, *L. monocytogenes* adapta seu metabolismo e inicia a expressão de genes que ativam os processos de multiplicação, tais como o transportador de hexoses fosfatadas (Hpt) e o lipoato-proteína ligase. Em seguida, a propagação dentro da célula e migração para células vizinhas é totalmente dependente da proteína ActA (*Actin Nucleating Factor*), codificada pelo gene *actA*, que garante o movimento através da indução de polimerização de actina. Além disso, a proteína actA também participa da manutenção de agregados de *Listeria* spp. no lúmen intestinal (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001; DE LAS HERAS et al., 2011).

O movimento de *L. monocytogenes* é aleatório e quando a bactéria alcança o limite da periferia celular é empurrada para o exterior dando lugar a uma protrusão similar a um pseudópode (denominada de listeriópode). Essa estrutura penetra na célula vizinha resultando na formação de um vacúolo de dupla membrana (CHAKRABORTY et al., 1996; LASA et al., 1998) iniciando, assim, um novo ciclo intracelular de infecção.

2.2.2 Genes de virulência

O sucesso da infecção de *L. monocytogenes* requer a presença e expressão de genes de virulência, sendo que vários deles têm sido identificados e estudados (JARADAT & BHUNIA, 2002; LIU et al., 2007; MERTINS et al., 2007; TÉMOIN et al., 2008). A maioria dos genes que codificam os fatores de virulência estão localizados no cromossomo (MERTINS et al., 2007), onde são encontrados os seis principais genes de virulência desse patógeno em uma região central de virulência. Essa região é denominada de LIPI-1 (Ilha de patogenicidade de *Listeria* 1) e dela fazem parte os genes *prfA*, *plcA*, *hly*, *actA*, *plcB* e *mpl* (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001; DE LAS HERAS et al., 2011) (FIGURA 02).

FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ORGANIZAÇÃO E CONTROLE DE REGULAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA DE *L. monocytogenes* AGRUPADOS NO CROMOSSOMO DA BACTÉRIA



Legenda: A ilha de patogenicidade de *Listeria* - 1 (LIPI-1) codifica a listeriolisina-O (gene *hly*), ActA, PlcA, PlcB, Mpl e PrfA. O gene *prfA* atua na regulação global dos genes da LIPI-1 além de três loci cromossômicos adicionais: o operon *inlAB*, *inlC* e *hpt*. A direção apontada pelo gene indica o sentido da transcrição. FONTE: adaptado de Cossart & Lecuit (1998).

A LIPI-1 é organizada de forma que o gene *hly* destaca-se em posição central com dois operons em seus extremos, o operon formado pelos genes *mpl*, *actA* e *plcB*, que é transcrito no mesmo sentido do gene *hly*, e o operon *plcA-prfA*, transcrito na direção oposta (FIGURA 02). As internalinas, por sua vez, organizam-se em ilhas compostas por dois ou mais genes que são transcritos na mesma direção. Uma das únicas exceções é o gene *inlC* que encontra-se isolado do restante das internalinas em uma ilha própria. Os genes mais estudados dessa família são o *inlA* e o *inlB* que se organizam em um operon, denominado operon *inlAB*, que é considerado um dos principais marcadores de virulência das cepas de *L. monocytogenes* (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

O gene *prfA* atua na regulação global dos genes de virulência em *L. monocytogenes*. Seu produto, a proteína PrfA (*positive regulatory factor A*), é o principal regulador identificado até o momento diretamente envolvido no controle da expressão de grande parte dos genes de virulência da bactéria, tanto da região LIPI-1 quanto outros genes como das internalinas (*inlAB* e *inlC*) e *hpt* (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001; DE LAS HERAS et al., 2011) (FIGURA 02).

Por sua vez, a regulação da expressão do próprio *prfA* é complexa e envolve a modulação do ambiente a partir de alterações na temperatura, condições de estresse, captura de substâncias químicas do meio extracelular, contato com células eucarióticas e o próprio ambiente citoplasmático da célula hospedeira. Estas

variações ambientais promovem a ativação do PrfA, anteriormente inativo ou com baixa atividade, ocasionando a transcrição dos genes de virulência. Dessa forma, a ativação do *PrfA* transforma *L. monocytogenes* de um micro-organismo saprofítico em um patógeno intracelular (CRUZ, MARTINEZ & DESTRO, 2008; FREITAG et al., 2009).

Além da liberação das células bacterianas no citoplasma celular, por meio da formação de poros na membrana dos vacúolos, as LLO são as proteínas responsáveis pela atividade hemolítica em isolados virulentos, cuja ação pode ser evidenciada ao redor das colônias quando cultivadas em ágar sangue. É uma hemolisina, formadoras de poros colesterol-dependentes, sendo necessária para a sobrevivência e proliferação de *L. monocytogenes* dentro de macrófagos e fagócitos, e é considerada o principal fator de virulência do patógeno (VAZQUEZ-BOLAND et al., 1989; COSSART, 2002).

Codificada pelo gene *mpl*, a metaloprotease contribui indiretamente para a virulência da *L. monocytogenes*, estando envolvida no processo de ativação da PlcB, já que esta é secretada pela bactéria na forma de proenzima inativa (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

As internalinas são proteínas que induzem a internalização em células epiteliais não fagocíticas *in vitro*, codificadas por uma família de múltiplos genes. Duas dessas proteínas são particularmente importantes para a patogenicidade de *L. monocytogenes*: InlA e InlB. Existe também a InlC, que não está envolvida no processo de entrada na célula epitelial, mas pode estar envolvida na virulência, expressada quando a infecção está na fase de espalhamento intercelular ativo, participando da disseminação da infecção (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001; BIERNE et al., 2007).

A inlJ, é codificado por um gene conservado (*inlJ*) no genoma de cepas de *L. monocytogenes* e ausente no restante das espécies do gênero (DOUMITH et al., 2004a), sendo utilizado como marcador na triagem molecular para a caracterização da patogenicidade dos isolados (LIU et al., 2007). Já se tem relato da existência de outras internalinas atuantes no mecanismo de infecção, que são identificadas como: InlC2, InlD, InlE, InlF, InlG e InlH. Porém, estas proteínas podem não estar relacionadas com a virulência (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Para indicar o potencial patogênico de cepas isoladas, protocolos de análises moleculares visam a pesquisa do grupo de genes conhecidos como

internalinas (inlA, inlB e inlC), que estão associados com o ciclo de virulência de *L. monocytogenes*, ou ainda a investigação da presença de diferentes fatores de virulência utilizando *primers* que ligam regiões altamente conservadas como as regiões dos genes *hly*, *iap* (gene que codifica a proteína p60 que está associado a invasão), *actA* e *prfA* (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001; LIU et al. 2007).

2.3 LISTERIOSE ALIMENTAR EM HUMANOS

Vários fatores podem contribuir para o desenvolvimento de listeriose em humanos, como o número de células bacterianas ingeridas, a imunidade do hospedeiro e o potencial de virulência de cada cepa (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001; CAMARGO et al., 2016). A doença pode ser caracterizada por três síndromes: gastroenterite febril; listeriose maternofoetal/neonatal; bacteremia com ou sem acometimento do sistema nervoso central. Outras infecções menos comuns também já foram descritas, como endocardites, miocardites, arterites, pneumonias, pleurites, hepatites, peritonites e abscessos localizados, dentre outros (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001). Ainda, além da ocorrência do quadro assintomático em alguns seres humanos (GRIF et al., 2003), pode se encontrar, em alguns estudos, relatos de que até 21% dos humanos podem ser portadores desta bactéria nos intestinos (SCHUCHAT et al., 1991; MASCOLA et al., 1992; SLUTSKER & SCHUCHAT, 1999).

A maioria dos casos de listeriose em humanos é de origem alimentar, sendo que os alimentos prontos para o consumo representam o alimento de maior risco na transmissão (FAO/WHO, 2004; SCALLAN et. al., 2011). Em adultos saudáveis, as infecções com *L. monocytogenes* são raras e tipicamente causam uma doença gastrointestinal relativamente leve (RYSER & MARTH, 2007), sendo o período médio de incubação de 24 horas. Nestes casos, os sintomas são diarreia, febre, dor abdominal, dor de cabeça e mialgias, entretanto, a maioria dos pacientes recupera-se sem a necessidade de tratamento com antibióticos (SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007).

Já a forma invasiva, que acomete normalmente os indivíduos imunocomprometidos, idosos, gestantes e neonatos, caracteriza-se por uma alta taxa de letalidade, cuja taxa média varia entre 20 a 30% e a mais elevada taxa de internação hospitalar (90%) entre todos os agentes patogênicos de origem alimentar (ZHANG et al., 2004; SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007; SCALLAN et al.,

2011; BEHRAVESH et al., 2011), sendo portanto, o grupo foco dos modelos de estudos de dose-resposta de *L. monocytogenes* (FAO/WHO, 2004; HOELZER et al., 2013). Além da gravidade da doença, esses grupos de indivíduos também apresentam uma maior suscetibilidade no desenvolvimento de listeriose. Os indivíduos com leucemia linfocítica crônica, por exemplo, parecem ter um aumento no risco de adquirir a doença 1.000 vezes mais em comparação com adultos saudáveis (GOULET et al., 2012). Da mesma forma, as gestantes têm um risco 100 vezes maior de adquirir listeriose invasiva em comparação com mulheres não grávidas (GOULET et al., 2012; POUILLOT et al., 2012).

Em gestantes, a infecção geralmente apresenta sintomas de gripe, ocorrendo febre e dor de cabeça e a complicação mais comum é o aborto espontâneo ou natimorto. Já em recém-nascidos existem duas formas de listeriose: a precoce e a tardia. A precoce está associada a problemas no sistema respiratório e bacteremia, enquanto que a tardia ocorre normalmente após duas semanas de vida e está associada à meningite, sendo a listeriose uma das principais causas de meningite em recém-nascidos (SLUTSKER & SCHUCHAT, 1999; RYSER & MARTH, 2007; SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007; LAMONT et al., 2011).

Em adultos mais velhos, geralmente com mais de 50 anos de idade, e indivíduos imunocomprometidos, a listeriose invasiva geralmente apresenta tropismo pelo sistema nervoso central, cursando com septicemia, meningite, meningoencefalite, romboencefalite e abscessos cerebrais (MYLONAKIS, HOHMANN & CALDERWOOD, 1998; BROUWER et al., 2006; RYSER & MARTH, 2007; USDA/FDA, 2011; DISSON & LECUIT, 2012).

O primeiro surto de listeriose de origem alimentar, registrado e documentado, foi na América do Norte em 1981, no Canadá. O surto envolveu a ingestão de salada contendo repolho contaminado pelo adubo utilizado proveniente de ovinos, o que resultou em 41 pessoas acometidas e 11 mortes (SCHLECH III et al., 1983). Em 1983 também ocorreu um surto em Boston, nos Estados Unidos, com 49 casos e 14 mortes, que foi epidemiologicamente ligado ao consumo de leite pasteurizado (FLEMING et al., 1985). Em 1985, um grande surto ocorreu no sul da Califórnia (Estados Unidos) com 142 casos e 48 mortes, e foi causado por um tipo de queijo de massa mole, denominado *Mexican-style* (LINNAN et al., 1988). Entre 1998 e 2015, segundo dados oficiais reportados pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças – CDC do Departamento de Saúde dos Estados Unidos,

ocorreu um total de 61 surtos de listeriose no país, acometendo 722 pessoas com 544 hospitalizações e 118 mortes (EUA, 2013a; EUA, 2013b; CDC, 2014a; CDC, 2014b; CDC, 2015; CDC, 2016; CDC, 2017).

Na UE, 1.763 casos listeriose humana foram confirmados em 2013, cuja taxa de notificação teve um aumento de 8,6% em relação a 2012 (0,44 casos por 100.000 habitantes). De todas as doenças zoonóticas sob vigilância da UE, a listeriose foi a doença mais grave em humanos, com 99,1% dos casos hospitalizados e 191 casos fatais (taxa de letalidade de 15,6%). Nesse mesmo ano, um total de 12 surtos foram relatados entre sete Estados-Membros, onde foi possível determinar fortes evidências de envolvimento de cinco diferentes categorias de alimentos em sete desses surtos [crustáceos, mariscos, moluscos e seus produtos (3); queijo (1); carne bovina e produtos à base de carne (1); carne suína e seus produtos (1); salada mista (1)]. Além disso, a Noruega relatou um surto que foi associado ao consumo de truta semi-fermentada, com três pessoas acometidas, das quais uma pessoa morreu (EFSA, 2015).

No Brasil, as informações sobre as doenças causadas pela ingestão de alimentos contaminados por micro-organismos com potencial patogênico são bastante escassas. Há uma grande deficiência no diagnóstico clínico e na notificação de casos e surtos de listeriose alimentar, o que se reflete na inexistência de relatos oficiais por parte das autoridades sanitárias resultando na falta de dados que ilustrem a magnitude da listeriose no país (CRUZ, MARTINEZ & DESTRO, 2008). Apesar da deficiência na descrição de surtos de listeriose de origem alimentar no país, são frequentes os trabalhos relatando a presença de *L. monocytogenes* em alimentos variados e no ambiente industrial (BARROS et al., 2007; MIYASAKI et al., 2009; ROSSI et al., 2011; FERRONATTO et al., 2012; CAMARGO et al., 2014; BYRNE et al., 2016; SILVA et al., 2016; IGLESIAS et al., 2017; OXARAN et al., 2017; SCHÄFER et al., 2017).

2.4 *Listeria monocytogenes* EM AMBIENTES INDUSTRIAIS E ALIMENTOS

Devido à sua natureza ubíqua, *L. monocytogenes* pode se estabelecer em ambientes variados, tendo sido recuperada inclusive em ambiente doméstico, como superfícies de cozinhas e refrigeradores (AZEVEDO et al., 2005). A capacidade de aderir e formar biofilme em superfícies, principalmente nas áreas de difícil limpeza e desinfecção e que frequentemente entram em contato com alimentos, é o principal determinante para sua persistência e disseminação (MØRETRØ & LANGSRUD, 2004; BONAVENTURA et al. 2008; BONSAGLIA et al. 2014).

Os biofilmes são definidos como comunidades microbianas complexas envolvidas em uma matriz polimérica extracelular que se liga às superfícies como uma forma de autoproteção bacteriana frente a fatores ambientais adversos, sendo esse o modo predominante de crescimento microbiano na natureza (SHI & ZHU, 2009; STEENACKERS et al., 2012; SREY et al., 2013). Situações de estresse, como baixa disponibilidade de nutrientes, baixas temperaturas e contato com sanitizantes, são consideradas importantes no estímulo para o desenvolvimento de biofilmes pelas células bacterianas (JEFFERSON, 2004).

Os mecanismos de formação de biofilmes por *L. monocytogenes* são basicamente os mesmos usualmente encontrados em outros micro-organismos (GANDHI & CHIKINDAS, 2007; MØRETRØ & LANGSRUD, 2004). De forma simplificada, ocorre uma adesão inicial de bactérias em superfícies, seguida do desenvolvimento de micro-colônias com produção de exopolissacarídeos e maturação dos biofilmes (CHMIELEWSKI & FRANK, 2003). Persistem aderidas às superfícies por meses ou até anos e, após maturação, se desprendem de forma intermitente podendo contaminar alimentos ou se dispersar pelo ambiente (MARKKULA et al., 2005).

A capacidade de adesão por cepas de *L. monocytogenes* já foi evidenciada em diferentes materiais frequentemente utilizados em superfícies de manipulação de alimentos, como borracha, plástico, vidro e aço inoxidável (BERESFORD et al., 2001; CHMIELEWSKI & FRANK, 2006; PAN et al., 2006; BERRANG et al., 2005; GANDHI & CHIKINDAS, 2007; ZHAO et al., 2013; REIS-TEIXEIRA et al., 2017). Além disso, cepas de *L. monocytogenes* aderidas são mais resistentes à limpeza e à desinfecção do que as bactérias em suspensão (células planctônicas) (PAN et al., 2006; SIMÕES, SIMÕES & VIEIRA, 2010; VAN DER VEEN & ABEE, 2011).

Assim, a sobrevivência facilitada de *L. monocytogenes* em planta de abate, processamento e manipulação de alimentos, é a principal razão pela qual a bactéria é considerada um desafio sério tanto aos padrões de higiene como frente ao risco de contaminação dos alimentos (OLIVEIRA et al., 2010; SIMÕES, SIMÕES & VIEIRA, 2010).

Quando ocorre a contaminação dos alimentos, *L. monocytogenes* pode ser destruída por tratamentos térmicos, assim, a contaminação pós-processamento é a causa mais frequente envolvida na ocorrência de surtos. A contaminação de produtos finais, principalmente alimentos prontos para consumo, assume um importante papel epidemiológico na transmissão de *L. monocytogenes* para os seres humanos, uma vez que durante as diferentes etapas de processamento agentes podem facilmente contaminar os produtos manipulados, que não sofrerão nenhum tratamento térmico adicional até o consumo (MARTINS & GERMANO, 2011; YANG et al., 2016).

Usualmente, esse patógeno encontra-se em baixas frequências nos suínos a serem abatidos, sendo conteúdo gastrointestinal e tonsilas elencados como as principais fontes de contaminação da carcaça por *L. monocytogenes* (HELLSTRÖM et al., 2010; FERRONATTO et al., 2012). No entanto, a capacidade de persistir por longos períodos em utensílios e equipamentos representa a principal relação da presença de *L. monocytogenes* nos produtos cárneos (BARROS et al., 2007).

Em virtude da ampla distribuição e sobrevivência no ambiente, carcaças e cortes cárneos podem ser contaminados em qualquer fase do abate e processamento. No entanto, o nível de contaminação pode aumentar ao longo da cadeia, sendo a etapa de cortes um importante ponto pós-abate, que influencia no aumento da frequência de *Listeria* spp. nas amostras de carne suína destinadas ao processamento ou à comercialização em comparação com as carcaças imediatamente abatidas (KANUGANTI et al., 2002; LOPEZ et al., 2008; GAMBOA-MARIN et al., 2012; PRENCIPE et al., 2012). A contaminação da carne *in natura* representa uma importante fonte de transferência de *L. monocytogenes* ao homem, tanto por contaminação cruzada que pode ocorrer dentro da própria indústria, quanto por contaminação no ponto de distribuição, venda do produto ou no ambiente doméstico (CARPENTIER & CERF, 2011).

Os surtos envolvendo carne suína normalmente estão relacionados com contaminação pós-processamento. Na Inglaterra, entre 2010 e 2012, ocorreu um

surto envolvendo 14 pessoas com mais de 55 anos associado ao consumo de torta de carne suína (AWOFISAYO-OKUYELU et al., 2016). Na Áustria, um surto a partir do consumo de *jellied pork* (prato preparado com carne suína e gelatina) envolveu 19 indivíduos (PICHLER et al., 2009). Nesse contexto, a alta adaptação de *L. monocytogenes* no ambiente, evidencia sua importância como contaminante ambiental e atribui aos alimentos produzidos com carne suína um importante papel epidemiológico na transmissão do patógeno para os seres humanos (GIBBONS et al., 2006; MARTINS & GERMANO, 2011; MELONI et al., 2013; SIMMONS et al., 2014; LARIVIÈRE-GAUTHIER et al., 2014).

O uso da carne suína na elaboração de alimentos pronto para o consumo é uma prática comum, cuja tecnologia de produção nem sempre requer o tratamento térmico como forma de obtenção do produto, como é o caso da fabricação dos embutidos fermentados. As etapas de fermentação e secagem empregados na elaboração desses produtos tendem a reduzir substancialmente a carga microbiana devido ao conjunto de obstáculos: diminuição do pH e da atividade de água e elevada concentração cloreto de sódio (THÉVENOT et al., 2005). No entanto, os obstáculos presentes nos produtos cárneos fermentados não são suficientes para eliminar *L. monocytogenes*, ressaltando a importância de se utilizar produtos cárneos de qualidade na produção desses tipos de alimentos. Além disso, alguns produtos elaborados com carne suína podem ser submetidos a etapas adicionais como o fatiamento ou nova embalagem antes de sua comercialização, podendo assim, serem expostos a outras fontes de contaminação pós-processamento (JOHNSON et al., 1988; TYÖPPÖNEN et al., 2003; DROSINOS et al., 2006; GIBBONS et al., 2006; COLAK et al., 2007; MARTINS & GERMANO, 2011; MELONI et al., 2014).

Os países diferem em sua legislação em relação a presença de *L. monocytogenes* em alimentos. Alguns deles, como os Estados Unidos, segue uma política de tolerância zero sobre a presença desse patógeno em alimentos prontos para consumo (GELBÍCOVÁ & KARPÍSKOVÁ, 2009). No entanto, em 2008, a *Food and Drug Administration* (FDA) publicou um Guia de Política de Conformidade que propõe uma tolerância de 100 Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/g em alimentos prontos para o consumo que não suportam a multiplicação de *Listeria* spp. (FDA, 2008). Nos Estados-Membros da União Europeia (UE), o Regulamento nº

2073/2005 permite uma contagem de até 100 UFC/g nos alimentos prontos para o consumo, sendo este limite considerado seguro para os consumidores (UE, 2005).

No entanto, em 2011, foi levantada uma discussão sobre a necessidade de incorporar novos dados e modelos dose-resposta de *L. monocytogenes* através de análises de risco (HOELZER et al., 2013). Em 2015, um trabalho de modelo de dose-resposta de *Listeria* spp., realizado com auxílio do Centro de Segurança Alimentar e Nutrição Aplicada nos Estados Unidos – CFSAN/US, resultou em uma previsão de 3,5% de casos esperados (55 de 1.591 indivíduos expostos) ligados ao consumo de 10.000 UFC ou menos (100g de um alimento contendo 100 UFC/g) (POUILLOT et al., 2015). Esse percentual gera incerteza sobre o padrão de 100 UFC/g sugerido pelos órgãos de saúde, levantando preocupações quanto à proteção dos indivíduos suscetíveis. Assim, o principal modo de proteção de grupos de risco ainda é evitar a exposição aos alimentos e condições de alto risco para presença *L. monocytogenes* (KOCOT & OLSZEWSKA, 2017; FDA, 2017; CDC, 2018; FSA, 2018).

As regulamentações e as ações implementadas na indústria entre 1998 e 2008, nos Estados Unidos, reduziram os surtos envolvendo alimentos prontos para o consumo à base de carnes vermelhas e aves. Em contraste, não houve redução dos surtos de listeriose associados ao consumo de produtos lácteos (CARTWRIGHT et al., 2013). Desde 2010, o país foi acometido por uma série de surtos de listeriose atribuídos a alimentos classificados como risco moderado ou baixo pelas avaliações de risco existentes (BUCHANAN et al., 2017), incluindo surto envolvendo alface em 2010 (GAUL et al., 2013), melão em 2011 (CDC, 2011), brotos em 2014 (CDC, 2015b), frutas como nectarina e ameixas em 2014 (BUCHANAN et al., 2017), maçãs carameladas envolvendo notificações entre 2014 e 2015 (CDC, 2015c), e sorvete com um surto o qual teve notificação de casos entre 2010 e 2015 (CDC, 2015a; POUILLOT et al., 2016).

No Brasil, apenas um único tipo de alimento possui padrão em relação *L. monocytogenes*. A Portaria 146/1996 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 1996) e a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001) estabelece os requisitos microbiológicos para queijos e determina que os produtos de umidade acima de 46% devem ser isentos desse patógeno.

Outra forma de fiscalização e controle pelo MAPA é realizada através da Instrução Normativa (IN) 09/2009, que estabelece os procedimentos de controle de *L. monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo suscetíveis, ou seja, produtos com pH superior a 4,4 ou que apresentem atividade de água maior que 0,92 ou concentração de cloreto de sódio inferior a 10%, como forma de monitorar e assegurar o consumo desses alimentos. Essa regulamentação determina que os estabelecimentos fabricantes desse tipo de alimento, devem incluir em seus programas de autocontrole os riscos inerentes à contaminação por *L. monocytogenes* bem como as medidas de prevenção da contaminação (BRASIL, 2009).

Além disso, a IN 09/2009 estabelece um controle oficial, que é baseado na coleta rotineira de amostras para a avaliação microbiológica, inspeção e verificação das instalações no que diz respeito à contaminação cruzada, facilidade de limpeza e sanitização, avaliação da matéria-prima e a avaliação dos métodos aplicados pela indústria como forma de evitar a multiplicação bacteriana ao longo do processo de produção de alimentos (BRASIL, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Rastrear a contaminação de *L. monocytogenes* em cadeia produtiva de suínos e em utensílios, equipamentos e instalações de estabelecimento de abate e processamento de suínos localizado no estado do Paraná.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar, confirmar e sorotipificar *L. monocytogenes* isoladas de diferentes pontos de coleta;
- Determinar os perfis genéticos e pesquisar a presença dos genes de virulência *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *hlyA*, *actA* e *iap* nos isolados de *L. monocytogenes*;
- Caracterizar o perfil de resistência dos isolados a antimicrobianos;
- Avaliar a capacidade de adesão dos isolados de *L. monocytogenes*.

4 CAPÍTULO I - PESQUISA E DETERMINAÇÃO DO PERFIL GENÉTICO DE *Listeria monocytogenes* EM CADEIA PRODUTIVA E AMBIENTE DE ABATE E PROCESSAMENTO DE SUÍNOS

RESUMO: O potencial patogênico de *Listeria monocytogenes* pode ser evidenciado pela sua relação com surtos decorrentes da ingestão de alimentos contaminados. Nos animais a serem abatidos, esse patógeno encontra-se em baixas frequências, porém, devido à capacidade de persistir aderidos à utensílios, equipamentos e instalações do ambiente industrial, pode ser transferido aos produtos cárneos, podendo carrear o patógeno até o consumidor. O objetivo deste estudo foi fazer um levantamento da contaminação de *L. monocytogenes* na cadeia produtiva de suínos e em utensílios, equipamentos e instalações do ambiente de abate e processamento de um abatedouro frigorífico de suínos, bem como identificar a diversidade de sorotipos e pulsotipos entre os isolados. As amostras foram submetidas à pesquisa de *Listeria* spp. de acordo com o protocolo ISO 11.290 modificado. Os isolados suspeitos de *Listeria* spp. foram identificados por testes bioquímicos e sorotipificados por PCR multiplex. Todos os isolados confirmados para *Listeria* spp. foram submetidos à eletroforese em gel de campo pulsado. Das 894 amostras obtidas, 18 (2,0%) foram positivas para *Listeria* spp. Destas, 16 (1,8%) amostras obtidas de piso da pocilga de espera, ralo da sala de abate e faca, tábua de corte, esteira condutora para embalagem final e ralo da sala de corte foram confirmadas para *L. monocytogenes* e duas (0,2%) para *L. innocua* (uma amostra obtida de piso da pocilga de espera e uma amostra obtida de ralo da sala de corte). Todos os isolados de *L. monocytogenes* foram do sorogrupo molecular IVb e apenas um apresentou pulsotipo diferente. *L. monocytogenes* não foi detectada nas amostra obtida nas granjas de terminação e, no abatedouro frigorífico, a maior frequência de isolamento do patógeno ocorreu nas etapas finais de manipulação da carne suína. Através da determinação do perfil genético, foi possível constatar uma persistência de clones desses isolados no ambiente industrial, demonstrando assim, a necessidade do controle permanente de *L. monocytogenes* na indústria, sobretudo no ambiente de processamento, visando minimizar a contaminação de produtos finais com um patógeno de importância em saúde pública.

Palavras-chave: esteira; higienização; PFGE; sala de corte; sorotipificação molecular.

4.1 INTRODUÇÃO

Usualmente, *Listeria monocytogenes* encontra-se em baixas frequências nos suínos a serem abatidos, no entanto, esse patógeno apresenta um perfil eficiente de sobrevivência no ambiente industrial, podendo contaminar as carcaças e os cortes suínos em qualquer fase do abate e processamento (BARROS et al., 2007). Uma

vez contaminada, a carne *in natura* representa uma importante fonte de veiculação de *L. monocytogenes* por atuar como fonte de contaminação cruzada para outros ambientes e alimentos (CARPENTIER & CERF, 2011).

Ainda, o uso da carne suína na elaboração de alimentos pronto para o consumo como embutidos e presuntos é uma prática comum, assumindo um importante papel epidemiológico na transmissão de patógenos alimentares para os seres humanos. A tecnologia de produção desses alimentos nem sempre requer o tratamento térmico como forma de obtenção do produto, podendo não ser suficiente para eliminar *L. monocytogenes*. Além disso, alguns produtos elaborados com carne suína podem ser submetidos a etapas adicionais como o fatiamento ou nova embalagem antes de sua comercialização, podendo assim, serem expostos a outras fontes de contaminação pós-processamento (JOHNSON et al., 1988; TYÖPPÖNEN et al., 2003; DROSINOS et al., 2006; GIBBONS et al., 2006; COLAK et al., 2007; MARTINS & GERMANO, 2011; MELONI et al., 2014).

L. monocytogenes se destaca como agente patogênico devido ao seu potencial de causar quadros graves da doença principalmente envolvendo indivíduos idosos, imunocomprometidos, gestantes e neonatos. Embora sejam descritos 13 sorotipos para *L. monocytogenes*, 95% das cepas isoladas de alimentos e humanos são pertencentes aos sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b (ALLERBERGER et al., 2003; BORUCKI & CALL, 2003; SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007). A listeriose se caracteriza por distúrbios gastrointestinais e septicemia, podendo ocasionar infecções do sistema nervoso central e provocar aborto. A taxa de mortalidade média envolvendo *L. monocytogenes* varia de 20 a 30%, principalmente quando o quadro cursa com encefalite e meningite (LATORRE et al., 2007; BEHRAVESH et al., 2011).

O principal determinante para persistência e disseminação de *L. monocytogenes* é a capacidade em aderir e formar biofilme em superfícies, principalmente nas áreas de difícil limpeza e desinfecção, e devido ao seu potencial de sobreviver em ambientes variados (LEE WONG, 1998; MØRETRØ & LANGSRUD, 2004; BONAVENTURA et al. 2008; BONSAGLIA et al. 2014). Desse modo, torna-se relevante a realização do monitoramento ao longo da cadeia produtiva bem como de utensílios, equipamentos e instalações de plantas frigoríficas para identificar as fontes de contaminações de *L. monocytogenes*, gerando

informações que auxiliem no controle da contaminação e assegurem a qualidade dos produtos destinados ao consumo humano.

Assim, este trabalho teve como objetivo fazer o levantamento da contaminação de *L. monocytogenes* na cadeia produtiva de suínos e em utensílios, equipamentos e instalações do ambiente de abate e processamento de um abatedouro frigorífico de suínos, bem como identificar a diversidade de sorotipos e pulsotipos entre os isolados.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Amostragem

Para o desenvolvimento do estudo foram selecionadas dez granjas de terminação de suínos e um abatedouro frigorífico de suínos fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Federal, localizado no estado do Paraná (Brasil), onde foram realizadas dez repetições entre setembro de 2016 e fevereiro de 2017.

Em cada coleta realizada na granja foram obtidas amostras de água, ração e piso das pocilgas. No abatedouro frigorífico, foram amostradas aleatoriamente dez carcaças pertencentes ao mesmo lote de suínos (correspondente ao lote da coleta da granja de terminação) em quatro pontos distintos ao longo do abate: após sangria, após chamuscamento, após evisceração e após lavagem final. Para assegurar que a mesma carcaça fosse coletada nos quatros pontos estabelecidos, os dez animais eram separados aleatoriamente na chegada do estabelecimento, onde se procedia a marcação de zero a nove com tatuagem na região dorsal anterior esquerda dos animais (TABELA 01).

TABELA 1 – AMOSTRAS COLETADAS EM DEZ GRANJAS DE TERMINAÇÃO DE SUÍNOS E EM UM ABATEDOURO FRIGORÍFICO DE SUÍNOS AO LONGO DE DEZ REPETIÇÕES REALIZADAS ENTRE SET/2016 E FEV/2017

Local	Amostra	Unidade amostral	Total amostra
Granja de Terminação	Instalação	Piso de pocilga	<i>Overshoes</i> 10
	Água	-	500ml 10
	Ração	-	500gr 10
Pocilga de espera	Instalação	Piso	<i>Overshoes</i> 10
Abate	Carcaça	Após sangria	400cm ² 100
		Após chamuscamento	400cm ² 100
		Após evisceração	400cm ² 100
		Após lavagem	400cm ² 100
	Utensílio	Luva de aço	4 unidade ^b 18 ^d
		Faca	4 unidades ^b 20 ^d
	Equipamento	Mesa de evisceração	400cm ² 20 ^d
	Instalação	Parede	400cm ² 20 ^d
		Ralo	1 unidade ^c 20 ^d
Câmara Fria	Instalação	Parede	400cm ² 20 ^d
		Piso	400cm ² 20 ^d
Sala de Cortes	Utensílio	Luva de aço	4 unidades ^b 40 ^d
		Faca	4 unidades ^b 40 ^d
		Tábuas de corte	400cm ² 20 ^d
		Caixas plásticas	400cm ² 20 ^d
	Equipamento	Mesa de corte primário (Mezanino)	400cm ² 20 ^d
		Mesa/Esteira de desossa	400cm ² 40 ^d
		Esteira condutora para embalagem	400cm ² 20 ^d
	Instalação	Parede	400cm ² 20 ^d
		Ralo	1 unidade ^c 20 ^d
	Cortes	Primários	400cm ² 36
		Finais ^a	400cm ² 40
TOTAL	-	-	894

^aCortes finais: coletados antes da embalagem final; ^bCada amostra foi composta por um “pool” de quatro unidades; ^cCada amostra de ralo sifonado foi composta pela amostragem da área total interna; ^dMetade das amostras foram coletadas antes do início das atividades e metade coletadas durante as atividades. FONTE: a autora (2018).

Ainda no abatedouro frigorífico, foram coletadas amostras de piso das pocilgas com os animais já descarregados; equipamentos, utensílios e instalações

do ambiente de abate e processamento em dois momentos: antes do início das atividades e durante as atividades; cortes cárneos primários e antes da embalagem final (TABELA 01).

As amostras obtidas de carcaças, cortes e superfícies foram coletadas com esponjas estéreis pré-umedecidas (10 ml de NaCl 0.85% por esponja) em quatro áreas delimitadas por moldes estéreis de 10 x 10 cm (100 cm²) totalizando 400 cm². Cada amostra superficial de utensílio foi composta por um “pool” de quatro unidades, também coletada com esponjas estéreis pré-umedecidas. A coleta dos ralos sifonados foi realizado com esponja estéril pré-umedecida, onde cada amostra foi composta pela área total interna do ralo. O material foi devidamente acondicionado em recipientes isotérmicos e mantido sob refrigeração até o momento das análises laboratoriais.

4.2.2 Pesquisa de *Listeria* spp.

A pesquisa de *Listeria* spp. foi realizada conforme o protocolo da ISO 11.290-1 (ISO, 1996; ISO, 2004) modificado. Amostras superficiais de carcaças foram adicionados 90 ml de NaCl 0.85% peptonada 0,01% por esponja seguido de homogeneização por um minuto (230rpm) em *Stomacher Seward 400®*. Após a homogeneização, 40ml foram transferidos para um tubo tipo falcon 50ml e submetido a uma centrifugação por 15 minutos a 2000 g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido com 10ml de caldo de enriquecimento para *Listeria* (LEB, Difco™) e incubado a 30°C/24h. Após incubação, 0,1ml de enriquecimento foi transferido para o caldo Fraser (Oxoid), que foi incubado a 37°C/48h. A partir dos tubos com caldo Fraser que apresentaram hidrólise da esculina (escurecimento do caldo) realizou-se semeadura em placas de *Chromogenic Listeria Agar* (ALOA, Oxoid) e *Oxford Listeria agar* (OXA, Oxoid), seguido de incubação a 37°C/48h. As colônias características foram selecionadas e submetidas à confirmação e identificação bioquímica (provas de produção de catalase, fermentação de carboidratos – dextrose, xilose, ramnose e manitol, produção de β-hemólise, motilidade e coloração de Gram).

Para as amostras de água e ração, 25 ml ou gr foram incubados com 225ml de LEB a 30°C/24h. Para as demais amostras, as esponjas foram submetidas à uma

incubação direta com 90ml de caldo LEB (Difco™) a 30°C por 24h. Após incubação, a sequência analítica foi idêntica ao descrito para as amostras de carcaças.

4.2.3 Sorotipificação molecular dos isolados de *Listeria* spp.

Os isolados confirmados de *Listeria* spp. foram submetidos ao protocolo de reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex para confirmação e sorotipificação molecular como descrito por Doumith et al. (2004b).

Primeiramente, as culturas foram submetidas à extração de DNA total utilizando-se lisozima (Sigma) e o *kit Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega). Após extração, o DNA das cepas foi submetido à PCR multiplex para diferenciação dos sorogrupos. As reações compreenderam um volume final de 25 µl compreendendo 12,5 µl de *GoTaq Green Master Mix* (Promega), 2,0 µl do DNA extraído, 8,4 µl dos cinco pares de primers (1pmol) (TABELA 02) e 2,1 µl de água ultra pura para PCR (Promega). As condições das reações foram: 94°C/3 min; 35 ciclos de 94°C/0,4 min, 53°C/1,15 min, 72°C/1,15 min; e 72°C/7 min. Para observação dos resultados das amplificações, 5 µl da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% (g/v) diluído em tampão de 0,5X Tris/Ácido Bórico/EDTA, revelados com GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) em transiluminador.

TABELA 02 – GENES ALVO E SEQUÊNCIAS DOS *PRIMERS* UTILIZADOS PARA SOROTIPIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes*

Gene alvo	Sequência (5'→3')*	Tamanho do produto (bp)
<i>Imo0737</i>	F: AGGGCTTCAAGGACTTACCC R: ACGATTTCTGCTTGCCATTC	691
<i>Imo1118</i>	F: AGGGGTCTTAAATCCTGGAA R: CGGCTTGTTCCGGCATACTTA	906
ORF2819	F: AGCAAAATGCCAAACTCGT R: CATCACTAAAGCCTCCCATTG	471
ORF2110	F: AGTGGACAATTGATTGGTGAA R: ATCCATCCCTTACTTTGGAC	597
<i>Prs</i>	F: GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG R: CAA AGA AAC CTT GGA TTT GCG G	370

FONTE: a autora (2018).

4.2.4 PFGE

Foram selecionados isolados de cada amostra positiva para *Listeria* spp., com exceção a amostra de pocilga de espera, obtida no dia 11 de janeiro de 2017, na qual foi possível obter apenas um isolado. A extração de DNA cromossomal foi realizado de acordo com o protocolo descrito Graves e Swaminathan (2001) recomendado pelo *Center for Diseases Control and Prevention* - CDC (PulseNet) para subtipagem de *Listeria* spp. e a digestão enzimática foi feita utilizando as enzimas *Ascl* e *Apal* (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EUA). Os produtos da macrorrestrição foram separados por eletroforese em gel de agarose (Agarose Seakem Gold 1% em tampão TE 0,5X), utilizando o equipamento CHEF-DR II (BioRad, Philadelphia, NY, EUA) com os seguintes parâmetros: gradiente de 6 V/cm; *switch time* inicial, 4s; *switch time* final, 40s; tempo de corrida de 20 horas. Os géis obtidos foram corados em banhos com GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) e as imagens analisadas pelo software BioNumerics (version 6.6 Applied Maths, Gand Belgium). Foi utilizada como referência para normalização das imagens uma cepa de *Salmonella* Braenderup (H9812) digerida com *XbaI* (Promega Corp., Madison, WI, EUA) e foi aplicada uma otimização de 1,5% e Dice de 5% para posição das bandas.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 894 amostras obtidas nas 10 repetições, 18 (2,0%) foram positivas para *Listeria* spp. Destas, 16 (1,8%) amostras, obtidas de piso da pocilga de espera e ralo da sala de abate e faca, tábua de corte, esteira condutora para embalagem final e ralo da sala de corte, foram confirmadas para *L. monocytogenes* e duas (0,2%) para *L. innocua* (uma amostra obtida de piso da pocilga de espera e uma amostra obtida de ralo da sala de corte) (TABELA 03). Não foi encontrada mais de uma espécie em uma mesma amostra simultaneamente.

TABELA 3 – RESULTADO DA PRESENÇA DE *Listeria* spp., *L. monocytogenes* E *L. innocua* EM AMOSTRAS OBTIDAS ENTRE SET/2016 E FEV/2017 DE UM ABATEDOURO FRIGORÍFICO DE SUÍNOS

Local	Amostra	Momento da coleta	N	<i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>
Pocilga de Espera	Piso	Durante as atividades	10	02 (20,0%)	01 (10,0%)	01 (10,0%)
Abate	Ralo	Antes das atividades	10	02 (20,0%)	02 (20,0%)	-
Sala de Cortes	Faca	Durante as atividades	20	01 (5,0%)	01 (5,0%)	-
	Tábuas de corte	Antes das atividades	10	01 (10,0%)	01 (10,0%)	-
	Esteira condutora para embalagem	Antes das atividades	10	05 (50,0%)	05 (50,0%)	-
	Esteira condutora para embalagem	Durante as atividades	10	06 (60,0%)	06 (60,0%)	-
	Ralo	Antes das atividades	10	01 (10,0%)	-	01 (10,0%)
-	Demais amostras	-	814	0	0	0
Total	-	-	894	18 (2,0%)	16 (1,8%)	02 (0,2%)

FONTE: a autora (2018).

Nenhuma das amostras de água, ração e piso de pocilga obtidas das dez granjas distintas de terminação de suínos apresentaram *L. monocytogenes* e apenas uma amostra de piso da pocilga de espera, no abatedouro frigorífico, foi positiva para o patógeno. Os suínos podem excretar esses micro-organismos em suas fezes podendo contaminar o ambiente na granja e carrear esse patógeno para dentro do ambiente industrial (BOSCHER, HOUARD & DENIS, 2012). No entanto, a baixa taxa de contaminação das pocilgas indica que o animal não é o principal determinante para a detecção de *L. monocytogenes* em plantas frigoríficas.

Não foi detectado *L. monocytogenes* nas amostras de superfícies de carcaça em nenhum dos quatro pontos amostrados (após sangria, após chamuscamento, após evisceração e após lavagem final). Uma baixa taxa de isolamento em carcaças suínas também foi encontrada por Prencipe et al. (2012), onde encontraram uma positividade de 3% (23/774) em superfícies de carcaças suínas coletadas antes da refrigeração.

Em virtude da ampla distribuição e sobrevivência desse patógeno no ambiente, as carcaças podem ser contaminadas em qualquer fase do abate. No entanto, o nível de contaminação tende a aumentar ao longo da cadeia devido ao aumento da manipulação dos cortes, envolvendo mais utensílios e tendo contato direto com equipamentos distintos, encontrando percentuais mais elevados na carne suína no final das etapas de processamento do que nas carcaças imediatamente após as etapas de abate (KANUGANTI et al., 2002; LOPEZ et al., 2008; GAMBOA-MARIN et al., 2012; PRENCIPE et al., 2012).

Na sala de abate, nenhuma amostra analisada de utensílio e equipamento foi positiva para *L. monocytogenes* e duas amostras de ralo foram positivas para o patógeno. As instalações como piso, parede e ralo, mesmo que não entram em contato direto com o alimento, podem constituir pontos importantes na manutenção de cepas de *L. monocytogenes* no ambiente industrial, devido à sua capacidade de aderir e formar biofilme sob condições adversas. Uma vez aderida nesses locais, *L. monocytogenes* pode se desprender e contaminar utensílios e equipamento que posteriormente poderão entrar em contato com o produto, principalmente através da formação de aerossóis produzidos durante as etapas de higienização (GUDBJÖRNSDÓTTIR et al., 2004; ZHAO et al., 2006; BERRANG et al., 2010).

Já na sala de corte, duas amostras de utensílio (faca e tábua de corte) de 120 analisadas (1,6%) e 11 amostras de equipamento (esteira condutora para

embalagem) de 80 analisadas (13,8%) apresentaram *L. monocytogenes*. No entanto, não foi possível isolar o patógeno nas amostras obtidas dos cortes cárneos, cujo resultado pode ser explicado pela forma de obtenção das amostras que era por fricção da esponja dentro da área delimitada pelo molde, diferente do que acontecia com o produto que era apenas levemente depositado na esteira condutora.

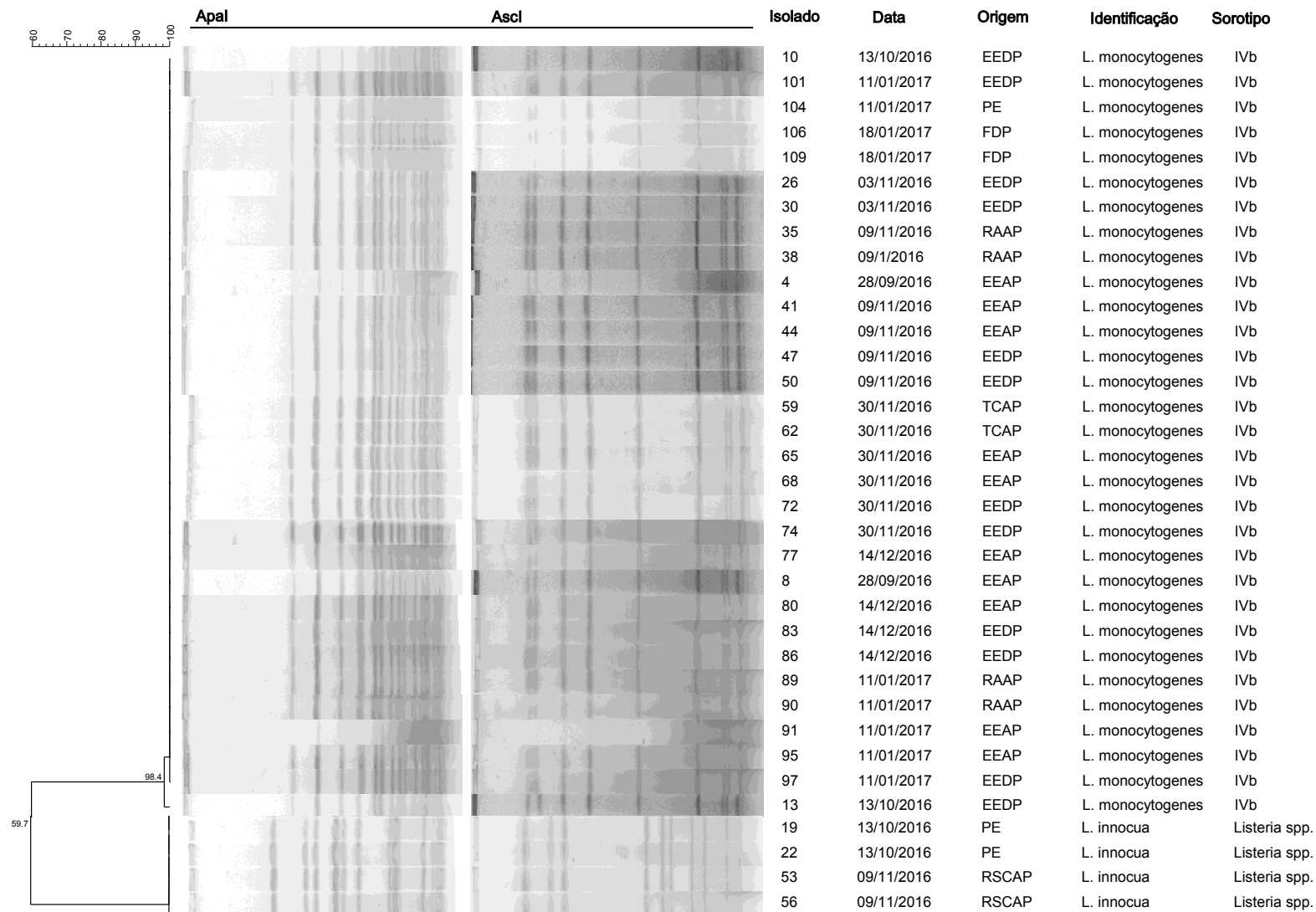
Essas frequências de isolamento no ambiente industrial foram menores do que em outros trabalhos de levantamento da presença de *L. monocytogenes* em plantas de abate e processamento de produtos cárneos. Meloni et al. (2013) avaliaram a disseminação desse patógeno em cinco plantas de processamento de carne suína da Itália durante três anos, onde encontraram uma positividade de 23% em amostras de equipamentos, utensílios e superfícies de contato. Larivière-Gauthier et al. (2014) fizeram um levantamento de *L. monocytogenes* em uma planta de abate e processamento de carne suína na província de Quebec, Canadá, e obtiveram 43,9% (18/41) das amostras positivas para este patógeno em equipamentos e 66,7% (20/30) em superfícies do ambiente da sala de desossa.

Já Simmons et al. (2014), em um estudo que avaliou os padrões de contaminação por *L. monocytogenes* em 121 estabelecimentos que produziam embutidos cárneos nos Estados Unidos, detectaram uma positividade para esse patógeno em 4,5% das superfícies que entraram em contato com os alimentos. Esse resultado foi semelhante ao encontrado neste estudo, onde se encontrou uma positividade de 6,5% (13/200) nas amostras de utensílios e equipamentos que entraram em contato direto com a carne suína na sala de corte.

Apesar das amostras de carcaça e carne suína não apresentarem o *L. monocytogenes*, a presença deste patógeno em ambiente industrial representa risco de contaminação aos produtos cárneos, já que o agente pode contaminar o alimento em qualquer fase do processo. Ainda, com base nos resultados obtidos, deve-se destacar a maior taxa de isolamento do patógeno nas etapas finais de manipulação da carne suína, representando um importante papel epidemiológico na transmissão de *L. monocytogenes* para os consumidores.

Dos 31 isolados de *L. monocytogenes* submetidos à análise de macrorrestrição por PFGE, apenas um apresentou um pulsotipo diferente com 98,4% de similaridade com os demais isolados (FIGURA 01). Todos os isolados de *L. innocua* analisados apresentaram o mesmo pulsotipo.

FIGURA 1 – PADRÕES DE PFGE APÓS A MACRORRESTRIÇÃO (ENZIMAS APAI E ASCI) DOS ISOLADOS DE *Listeria* spp. OBTIDOS DAS AMOSTRAS COLETADAS EM UM ABATEDOURO FRIORÍFICO DE SUÍNOS AO LONGO DE DEZ COLETAS REALIZADAS ENTRE SET/2016 E FEV/2017



Legenda: EEDP - Esteira condutora para embalagem da sala de cortes durante processamento; PE – Pocilga de espera; FDP – Faca da sala de cortes durante processamento; RAAP – Ralo da sala de abate antes do processamento; EEAP - Esteira condutora para embalagem da sala de cortes antes processamento; TCAP – Tábua de corte da sala de cortes antes do processamento; RSCAP – Ralo da sala de cortes antes do processamento. Nota: As similaridades entre os pulsotipos de PFGE identificados foram estimadas usando o coeficiente de Dice (5% de tolerância). FONTE: a autora (2018).

É comum encontrar trabalhos com baixa diversidade genética entre os isolados de *L. monocytogenes*. Meloni et al. (2013), na Itália, e Lopez et al. (2008), na Espanha, obtiveram seis e nove pulsotipos diferentes, respectivamente, entre os isolados obtidos em abatedouro frigorífico de suínos. Camargo et al. (2014) encontraram 100% dos isolados *L. monocytogenes* obtidos de ambientes de abate e processamento de bovinos, no Brasil, com o mesmo perfil genético. Essa baixa diversidade encontrada entre os isolados pode ser decorrente da capacidade do patógeno persistir nos mesmos nichos ecológicos por meses ou anos, tornando-se endêmicos e específicos da planta frigorífica.

Esses resultados obtidos da análise do perfil genético evidenciaram uma persistência de isolados de *L. monocytogenes* durante as coletas realizadas no ambiente de abate e processamento num mesmo abatedouro frigorífico em momentos distintos, sobretudo, na esteira condutora dos cortes para embalagem final. Nesse local foi possível recuperar o agente antes das atividades em cinco coletas e durante as atividades em seis coletas (FIGURA 02).

FIGURA 02 – PERSISTÊNCIA DE CLONES DE *L. monocytogenes* EM UM ABATEDOURO FRIGORÍFICO DE SUÍNOS EM DEZ COLETAS REALIZADAS ENTRE SET/2016 A FEV/2017

Amostras Positivas										
PE							X			
RAAP				X			X			
FDP								X		
TCAP					X					
EEAP	X			X	X	X	X			
EEDP		X	X	X	X	X	X			
	C01	C02	C03	C04	C05	C06	C07	C08	C09	C10
	<u>28/set</u>	<u>13/out</u>	<u>01/nov</u>	<u>09/nov</u>	<u>30/nov</u>	<u>14/dez</u>	<u>11/jan</u>	<u>18/jan</u>	<u>25/jan</u>	<u>01/fev</u>
	2016	2016	2016	2016	2016	2016	2017	2017	2017	2017

Legenda – PE – Pocilga de espera; RAAP – Ralo da sala de abate antes do processamento; FDP – Faca da sala de cortes durante processamento; TCAP – Tábua de corte da sala de cortes antes do processamento; EEAP - Esteira condutora para embalagem da sala de cortes antes processamento; EEDP - Esteira condutora para embalagem da sala de cortes durante processamento. X – presença de *L. monocytogenes*. C – coleta. FONTE: a autora (2018).

Uma série de fatores de risco diferentes podem contribuir com essa persistência, desde características relacionadas com o próprio micro-organismo (potencial de adesão e formação de biofilmes, tolerância ao “estresse ambiental”

causado pelas oscilações de temperatura, pela falta de nutriente ou pela ação de desinfetantes) até características dos utensílios, equipamentos e instalações (presença de locais de que favoreçam a adesão e o alojamento das células bacterianas) que podem facilitar a permanência de *L. monocytogenes* em plantas frigoríficas por longos períodos de tempo (LOPEZ et al., 2008; CARPENTIER & CERF, 2011; CAMARGO et al., 2014).

Todos os isolados de *L. monocytogenes* sorotipificados foram do sorogrupo molecular IVb, segundo a classificação proposta por Doumith et al. (2005), que inclui os sorotipos 4b, 4d e 4e. Embora o sorotipo exato não possa ser identificado com esse ensaio, pode-se verificar uma predominância diferente de sorotipos quando comparados com os resultados da sorotipificação tradicional de isolados obtidos de ambientes de processamento de suínos descritos por Ochiai et al. (2010) e Meloni et al. (2013), e com os resultados dos isolados obtidos de ambientes de abate e processamento de bovinos descrito por Camargo et al. (2015). Nos três estudos, o sorotipo predominante foi o 1/2c, pertencente ao sorogrupo molecular IIc, diferente ao observado com os isolados obtidos neste trabalho.

O sorotipo 1/2c também faz parte dos quatro principais sorotipos de *L. monocytogenes* isolados de alimentos e pacientes, no entanto, geralmente são reconhecidas por possuir baixo potencial de virulência (RAGON et al., 2008; LÓPEZ et al., 2013). Os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b são os principais responsáveis por causar listeriose e o sorotipo 4b geralmente está associado a sintomas clínicos graves (SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007).

4.4 CONCLUSÃO

Através da determinação do perfil genético, foi possível constatar uma persistência de clones de *L. monocytogenes* IVb no estabelecimento em amostras obtidas na sala de abate e processamento de suínos. Apesar de nenhuma amostra de carcaça e carne suína ter sido positiva para o patógeno, a sua manutenção em vários momentos distintos, expõe os produtos manipulados a uma possível contaminação, demonstrando assim, a necessidade do controle permanente de *L. monocytogenes* na indústria, sobretudo no ambiente de processamento.

Não foi detectada *L. monocytogenes* nas amostras obtidas nas granjas de terminação, sugerindo que os animais não constituem o principal disseminador do

patógeno às plantas frigoríficas. A maior frequência de isolamento do patógeno no ambiente industrial ocorreu nas etapas finais de manipulação da carne suína, tanto em utensílios (faca e tábua de cortes) como em equipamento (esteira condutora de corte para embalagem final).

5 CAPÍTULO II – PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA, PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E CAPACIDADE DE ADESÃO *Listeria monocytogenes* ISOLADA DE ABATEDOURO FRIGORÍFICO DE SUÍNOS

RESUMO: A listeriose é uma grave doença de interesse global cujo patógeno pode ser transmitido por alimentos. O desenvolvimento desse quadro é possível devido *Listeria monocytogenes* possuir uma variedade de fatores de virulência, onde cada fator desempenha um papel importante e estão envolvidos em diferentes estágios de sua patogênese. As cepas de *L. monocytogenes* são consideradas relativamente suscetíveis a uma ampla gama de antimicrobianos, embora tenha sido relatado um aumento da resistência frente a importantes antimicrobianos utilizados no tratamento de listeriose em humanos. Ainda, a capacidade de aderir e formar biofilmes em superfícies representa importante risco à saúde, por auxiliar na persistência e disseminação de cepas com potencial patogênico em ambientes de processamento de alimentos, podendo contaminar os produtos principalmente por contaminação cruzada. Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar a patogenicidade das cepas de *L. monocytogenes* quanto à presença dos principais genes de virulência, quanto ao perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e quanto à capacidade de adesão em superfície. Um total de 87 cepas de *L. monocytogenes*, isolados de ambiente de abate e processamento de suínos, foram submetidos à caracterização quanto a presença de genes de virulência (*inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *hlyA*, *actA*, *iap*, *plcA*) através da PCR. Para determinação do perfil de resistência a antimicrobianos foram utilizados as metodologias de disco-difusão e ao teste de microdiluição em caldo e a capacidade de adesão em superfície de poliestireno foi avaliada pela metodologia descrita por Stepanović et al. (2000) e Lee et al. (2017) com modificações. Das 87 cepas avaliadas quanto a presença de genes de virulência, 93,1% (81/87) apresentaram todos os genes pesquisados. Apenas uma cepa não apresentou os genes *inlA* e *inlC* e seis cepas não apresentaram o gene *inlB*. Essas cepas apresentaram suscetibilidade à maioria dos antimicrobianos testados, no entanto, foi detectado 100% de resistência à ampicilina, 18,8% à penicilina e 6,25% à sulfametaxazol-trimetropim. Todos os isolados foram classificados como fracamente aderente. Este estudo verificou que as cepas de *L. monocytogenes* de ambiente de abate e processamento de suínos apresentaram os principais genes de virulência e com resistência frente aos antimicrobianos de escolha no tratamento de listeriose. A capacidade de adesão, detectada nas cepas testadas, contribui para a manutenção desses micro-organismos no ambiente da indústria podendo contaminar os alimentos processados constituindo uma situação alarmante aos consumidores.

Palavras-chave: adesão; gene de virulência; listeriose; resistência antimicrobiana.

5.1 INTRODUÇÃO

L. monocytogenes é um importante patógeno transmitido por alimentos que causa gastroenterite febril em pessoas saudáveis e listeriose invasiva em populações de alto risco, como gestantes, idosos e pacientes imunocomprometidos,

podendo cursar com aborto espontâneo ou natimorto, septicemia, meningite, meningoencefalite e abscessos cerebrais (BROUWER et al., 2006; SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007; RYSER & MARTH, 2007; LAMONT et al., 2011). Apesar de não apresentar alta incidência, a listeriose representa importante risco à saúde pública pela severidade da doença, provocando hospitalização em 90% dos casos confirmados e alto índice de mortalidade com uma taxa que varia entre 20 e 30% (SCALLAN et al., 2011; EFSA, 2015).

Ao longo da evolução de *L. monocytogenes* houve a aquisição de uma variedade de fatores de virulência, possibilitando a ocorrência desses quadros de listeriose que se caracterizam por invasão e sobrevivência nas células hospedeiras, além de possuir uma maneira característica de colonização usando células fagocíticas para serem distribuídas pelo corpo, evadindo-se da resposta imune do hospedeiro (CHATURONGAKUL et al., 2008; CAMARGO et al., 2016).

Entre os fatores de virulência, as internalinas (inl) são proteínas que participam da interiorização de *L. monocytogenes* nas células do hospedeiro. Duas dessas são particularmente importantes para a sua patogenicidade: InlA e InlB. Além disso, outras internalinas como inlC e inlJ, que não estão envolvidas no processo de entrada na célula, também são considerados marcadores de virulência, podendo ser usados para diferenciar estirpes virulentas de não virulentas (BIERNE et al., 2007; LIU et al. 2007; DE LAS HERAS et al. 2011; PIZARRO-CERDÁ, KUHBACHER & COSSART, 2012). Outros fatores-chave de virulência, como a hemolisina (hlyA), fosfatidilinositol fosfolipase C (plcA), proteína de polimerização de actina (actA) e proteína p60 também participam na patogênese de *L. monocytogenes* (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001; CAMARGO et al., 2016).

Devido à gravidade da doença, sobretudo da listeriose invasiva, é comum a indicação de antibioticoterapia. As cepas de *L. monocytogenes* são normalmente sensíveis aos antimicrobianos como penicilina, ampicilina, amoxicilina, gentamicina, eritromicina, tetraciclina, rifampicina, sulfametaxazol com trimetropim, vancomicina e imipenem, entretanto a maioria das cepas apresenta uma resistência intrínseca frente às cefalosporinas, especialmente de terceira e quarta geração, como cefotaxima e cefepima (CHARPENTIER & COURVALIN, 1999; POROS-GLUCHOWSKA et al. 2003; CLSI, 2006).

Embora as cepas de *L. monocytogenes* sejam consideradas relativamente suscetíveis, à medida que os antimicrobianos vão sendo utilizados na criação de

animais de produção ou em tratamento de humanos, a ocorrência de mutação espontânea em patógenos de importância em alimentos e a propagação de agentes resistentes podem contribuir para o aumento da resistência antimicrobiana (MANTILLA et al. 2007; EFSA, 2008; CONTER et al. 2009; GRANIER et al., 2011; KOVACEVIC et al. 2013). Em consideração às implicações em saúde e à alta taxa de mortalidade causada pela listeriose, é importante garantir a eficácia da antibioticoterapia e determinar e monitorar os perfis de resistência antimicrobiana dos isolados (GÓMEZ et al., 2014).

O principal determinante para sua persistência e disseminação é a grande capacidade que *L. monocytogenes* tem em aderir e formar biofilme em superfícies que entram em contato com alimentos, principalmente nas áreas de difícil limpeza e desinfecção (LEE WONG, 1998; MØRETRØ & LANGSRUD, 2004; BONAVENTURA et al. 2008; BONSAGLIA et al. 2014). Esse patógeno já foi observado em vários pontos do ambiente de abate e processamento de suínos nos diferentes estágios de produção, levando a maiores chances de contaminação da carne *in natura* e derivados (BARROS et al., 2007; MELONI et al., 2013; SIMMONS et al., 2014; LARIVIÈRE-GAUTHIER et al., 2014).

A contaminação da carne suína *in natura* representa uma importante fonte de transferência de *L. monocytogenes*, tanto por contaminação cruzada que pode ocorrer dentro da própria indústria, quanto por contaminação no ponto de distribuição, venda do produto ou no ambiente doméstico (CARPENTIER & CERF, 2011). Dessa forma, a facilidade de sobrevivência de *L. monocytogenes* em plantas de abate e processamento favorece a transmissão aos alimentos, assumindo um importante papel epidemiológico na transmissão desse agente para os humanos (OLIVEIRA et al., 2010; SIMÕES, SIMÕES & VIEIRA, 2010).

Assim, para uma melhor avaliação das cepas de *L. monocytogenes* circulantes em ambiente de abate e processamento, os objetivos deste trabalho foi caracterizar cepas isoladas de um abatedouro frigorífico de suínos, quanto à presença dos principais genes de virulência, resistência a antimicrobianos e potencial de adesão em superfície.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Isolados de *Listeria monocytogenes*

Foram analisadas 87 cepas de *L. monocytogenes* pertencente ao sorogrupo IVb, segundo classificação feita por Doumith et al. (2005). Estas cepas foram isoladas de diversas fontes de um abatedouro frigorífico de suínos no estado do Paraná (BR), entre setembro de 2016 e janeiro de 2017. Os isolados foram identificados aleatoriamente como L01 a L87 conforme suas origens e data de coleta (TABELA 01).

TABELA 01 – IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS DE *Listeria monocytogenes* OBTIDOS DE UM ABATEDOURO FRIGORÍFICO DE SUÍNOS LOCALIZADO NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL

ORIGEM	DATA COLETA	N.	IDENTIFICAÇÃO
Esteira condutora para Embalagem Limpa	28/09/16	06	L01 – L06
Esteira condutora para Embalagem Em Uso	13/10/16	06	L07 – L12
Esteira condutora para Embalagem Em Uso	01/11/16	06	L13 – L18
Ralo Limpo	09/11/16	06	L19 – L24
Esteira condutora para Embalagem Limpa	09/11/16	06	L25 – L30
Esteira condutora para Embalagem Em Uso	09/11/16	06	L31 – L36
Tábua de corte Limpa	30/11/16	06	L37 – L42
Esteira condutora para Embalagem Limpa	30/11/16	06	L43 – L48
Esteira condutora para Embalagem Em Uso	30/11/16	06	L49 – L54
Esteira condutora para Embalagem Limpa	14/12/16	06	L55 – L60
Esteira condutora para Embalagem Em Uso	14/12/16	06	L61 – L66
Ralo Limpo	11/01/17	02	L67 – L68
Esteira condutora para Embalagem Limpa	11/01/17	06	L69 – L74
Esteira condutora para Embalagem Em Uso	11/01/17	06	L75 – L80
Piso Em Uso	11/01/17	01	L81
Faca Em Uso	18/01/17	06	L82 – L87

FONTE: a autora (2018).

Todas as cepas foram mantidas congeladas em caldo tripticase de soja (TSB, Difco™) suplementados com glicerol a 20% (v/v). Para realização das análises, as culturas foram semeadas em ágar tripticase de soja (TSA, Difco™) e incubadas a 35°C/24h para obtenção de colônias isoladas.

5.2.2 Detecção dos genes de virulência

Primeiramente, as cepas foram submetidas à extração de DNA total utilizando-se lisoizima (Sigma) e o *kit Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega). Após extração, o DNA foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção dos genes de virulência: *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *hlyA*, *actA* e *iap*. Os protocolos para cada ensaio de PCR foram realizados de acordo com Liu et al. (2007) para detecção dos genes *inlA*, *inlB*, *inlC* e *inlJ* e Rawool et al. (2007) para os genes *plcA*, *hlyA*, *actA* e *iap*. Em todos os protocolos, as reações compreenderam um volume final de 25µl compreendendo 12,5µl de *GoTaq Green Master Mix* (Promega), 2,0µl do DNA extraído, 400 nMol de cada *primer* e água ultrapura livre de nucleases (Promega) para completar o volume final. As sequências dos *primers* e os tamanhos de fragmentos esperados foram previamente descritos por Furrer et al. (1991), Notermans et al. (1991), Paziak-Domanska et al. (1999), Suárez e Vazquez-Boland (2001) e Liu et al. (2007) e utilizados nesta pesquisa (TABELA 02).

TABELA 02 – GENES ALVO E SEQUÊNCIAS DOS *PRIMERS* UTILIZADOS PARA CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL DE VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes*

PCR	Gene alvo	Sequência dos <i>primers</i> (5'→3')	Produto (pb)	Referência
Multiplex	<i>inlA</i>	F: ACGAGTAACGGGACAAATGC R: CCCGACAGTGGTGCTAGATT	800	Liu et al. (2007)
	<i>inlC</i>	F: AATTCCACAGGACACAACC R: CGGGAATGCAATTTTCACTA	517	Liu et al. (2007)
	<i>inlJ</i>	F: TGTAACCCCGCTTACACAGTT R: AGCGGCTTGGCAGTCTAATA	238	Liu et al. (2007)
Simplex	<i>inlB</i>	F: TGGGAGAGTAACCCAACCAC R: GTTGACCTTCGATGGTTGCT	884	Liu et al. 2007
Simplex	<i>plcA</i>	F: CTGCTTGAGCGTTCATGTCTC ATCCCCC R: ATGGGTTTCACTCTCCTTCTAC	1484	Notermans et al. (1991)
Multiplex	<i>hlyA</i>	F: GCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA R: GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG	456	Paziak-Domanska et al. (1999)
	<i>actA</i>	F: CGCCGCGGAAATTAATAAAGA R: ACGAAGGAACCGGGCTGCTAG	839	Suarez & Vazquez-Boland (2001)
	<i>iap</i>	F: ACAAGCTGCACCTGTTGCAG R: TGACAGCGTGTGTAGTAGCA	131	Furrer et al. (1991)

FONTE: a autora (2018).

Alíquotas de 10µL dos produtos amplificados foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% (m/v) e tampão de 0,5X Tris/Ácido Bórico/EDTA, revelados com GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) em

transiluminador e analisados comparativamente com um controle positivo (*L. monocytogenes* ATCC 7644), um controle negativo (substituição da amostra por água ultrapura) e um marcador de DNA de 100 pares de bases (bp).

5.2.3 Suscetibilidade aos antimicrobianos

A suscetibilidade aos antimicrobianos foi determinada pelo método de disco-difusão de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2017). Foram testados 12 antimicrobianos pertencente a nove classes: (1) aminoglicosídeos: gentamicina (10µg), canamicina (30µg) e tobramicina (10µg); (2) ansamicinas: rifampicina (5µg); (3) carbapenema: meropenem (10µg); (4) fenicóis: cloranfenicol (30µg); (5) lincosamidas: clindamicina (2µg); (6) fluorquinolonas: ciprofloxacina (5µg); (7) tetraciclinas: minociclina (30µg) e tetraciclina (30µg); (8) glicopeptídeos: vancomicina (30µg); (9) macrolídeos: eritromicina (15µg). Atualmente não há critérios interpretativos de disco-difusão para *L. monocytogenes*, sendo assim, foram aplicados os critérios determinados para outros micro-organismos Gram-positivos. Para vancomicina foi utilizado o padrão de referência para *Enterococcus* spp. e para os demais antimicrobianos foram utilizado os padrões para *Staphylococcus* spp., onde os isolados testados foram classificados como sensíveis, intermediários e resistentes. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizado como uma cepa controle.

5.2.4 Microdiluição em caldo para teste de suscetibilidade a antimicrobianos

Para cada origem de isolamento (esteira condutora para embalagem, ralo, tábua de corte, piso e faca) (TABELA 01) foi selecionada uma cepa, totalizando 16 cepas, para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para ampicilina, penicilina e para a associação de sulfametoxazol com trimetoprim, conforme determinado para *L. monocytogenes* (CLSI, 2006), através do método de microdiluição em caldo para testes de suscetibilidade antimicrobiana (CLSI, 2012). Os resultados da CIM foram interpretados de acordo com os *breakpoints* definidos no CLSI como sensíveis e resistentes.

5.2.5 Potencial de adesão das cepas de *L. monocytogenes*

Todos os isolados foram submetidos ao teste de adesão em microplaca de poliestireno segundo metodologia descrita por Stepanović et al. (2000) e Lee et al. (2017), com modificações. A partir de cada cepa diluída a 10^8 UFC/mL (escala 0,5 de MacFarland) utilizando caldo TSB suplementado com extrato de levedura a 0,6% (TSB-YE, Difco™), 200µL foram semeados, em triplicata, nos poços da microplaca de poliestireno de 96 poços com fundo chato (Nest®) e incubados a 35°C/48h. Em cada placa, três poços foram preenchidos com 200µL de caldo TSB-YE (Difco™) não inoculado, utilizados como controle negativo. Após a incubação, as microplacas foram lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS, pH 7,2) (250µL/poço). As cepas que permaneceram aderidas após lavagem, foram fixadas com 200µL de metanol 99% por 15 min e submetidas à secagem em temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram corados com 200µL de violeta cristal 1% por 15 minutos. Para remoção do corante, foram lavados três vezes com água destilada e mantidos até secagem em temperatura ambiente. Para leitura, foram adicionados 160µL/poço de ácido acético glacial 33% (v/v) e a absorbância foi verificada em uma leitora de microplacas *Anthos* 2010 (Bichrom®) a 595nm.

A classificação dos isolados foi realizada de acordo com Stepanović et al. (2000), onde a avaliação dos resultados de absorbância do valor da densidade óptica de cada amostra (DOa) foi comparado com a média da absorbância dos controles negativos acrescido de três vezes o desvio padrão (DOcn). Para determinar o grau de adesão foi utilizada a seguinte classificação: não aderente ($DOa \leq DOcn$), fracamente aderente ($DOcn < DOa \leq 2 \cdot DOcn$), moderadamente aderente ($2 \cdot DOcn < DOa \leq 4 \cdot DOcn$) e fortemente aderente ($4 \cdot DOcn < DOa$). Todos os testes foram realizados três vezes e os resultados foram calculados em média.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 87 cepas avaliadas quanto a presença de genes de virulência, 93,1% (81/87) apresentaram todos os genes pesquisados. A cepa L04 não apresentou os genes *inlA*, *inlB* e *inlC* e as cepas L16, L30, L32, L72 e L84 não apresentaram o gene *inlB*. Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores, onde esses genes estiveram presentes em quase todos os isolados pesquisados em *L.*

monocytogenes obtidos de diferentes categorias de alimentos e ambientes (GELBÍCOVÁ & KARPÍSKOVÁ, 2012; LOMONACO et al. 2012; JAMALI, RADMEHR & THONG, 2013; HAUBERT et al., 2015; CAMARGO et al., 2015; SILVA et al., 2016).

O sucesso da infecção causada por *L. monocytogenes* requer a presença e a expressão de genes de virulência. Para indicar o potencial patogênico das cepas, protocolos de análises moleculares visam pesquisar o grupo de genes das internalinas (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001; LIU et al. 2007). O gene *inlA* codifica a proteína de superfície InlA que desempenha um papel essencial no mecanismo de penetração nas células hospedeiras (TORRES et al., 2005). A presença do gene *inlB* aumenta a afinidade do patógeno pelos tecidos do fígado e do baço (BIERNE et al., 2007), enquanto *inlC* promove a disseminação intracelular da infecção, atuando após os estágios intestinais da infecção. A função exata de *inlJ* ainda é desconhecida, mas tem sido relacionado com a passagem de *L. monocytogenes* através da barreira intestinal (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001; BIERNE et al., 2007; LIU et al., 2007).

Ainda, a investigação da presença de diferentes fatores de virulência utilizando *primers* que se ligam em regiões altamente conservadas, como as regiões dos genes *hly*, *iap* e *actA*, auxiliam na avaliação do potencial patogênico das cepas. O gene *hlyA*, está envolvido com a codificação da listeriolisina O (LLO), uma hemolisina necessária para a sobrevivência e proliferação dentro de macrófagos e fagócitos (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001; COSSART, 2002); *PlcA*, que codifica uma fosfolipase C, que associada à LLO, atua na lise do fagossomo formado pela invasão do agente à célula do hospedeiro; *actA* necessária para a polimerização da actina e, assim, permitir o movimento intracitoplasmático; *iap*, participa da invasão e sobrevivência nas células intestinais através da codificação da proteína p60 (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001; DE LAS HERAS et al., 2011). Assim, a presença desses genes indica o potencial de virulência das cepas de *L. monocytogenes* testadas, pois cada gene desempenha um papel importante nos mecanismos de patogenicidade que estão envolvidos em seus diferentes estágios.

Frente aos antimicrobianos testados pelo método de disco-difusão, 100% das cepas foram sensíveis a gentamicina, tobramicina, rifampicina, cloranfenicol, vancomicina e minociclina. Canamicina, meropenem, tetraciclina e eritromicina apresentaram 98,9%, 95,4%, 98,9% e 97,8%, respectivamente, entre as cepas. No

entanto, nenhuma cepa foi sensível à clindamicina (TABELA 03). Apenas uma cepa (cepa L81) apresentou resistência a quatro classes (canamicina, clindamicina, eritromicina e tetraciclina), sendo assim, classificada como multirresistente, entretanto essa cepa não diferiu das demais cepas quanto à presença dos genes de virulência. Essa cepa foi isolada do piso da pocilga de espera, podendo ter ocorrido maior interação com outros micro-organismos carregados pelos suínos levando a aquisição de elementos genéticos móveis de resistência.

TABELA 03 – PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE 87 CEPAS DE *L. monocytogenes* OBTIDAS DE UM ABATERDOURO FRIGORÍFICO DE SUÍNOS

Antimicrobiano	Sensível n (%)	Intermediário n (%)	Resistente n (%)
Gentamicina	87 (100)	-	-
Canamicina	86 (98,9)	-	1 (1,1)
Tobramicina	87 (100)	-	-
Rifampicina	87 (100)	-	-
Meropenem	83 (95,4)	-	4 (4,6)
Cloranfenicol	87 (100)	-	-
Clindamicina	-	63 (72,4)	24(27,6)
Ciprofloxacina	77 (88,5)	10 (11,5)	-
Minociclina	87 (100)	-	-
Tetraciclina	86 (98,9)	-	1(1,1)
Vancomicina	87 (100)	-	-
Eritromicina	85 (97,8)	1 (1,1)	1 (1,1)
Resistente a 1 antimicrobiano	-	-	23 (26,4)
Resistente a 2 antimicrobianos	-	-	2 (2,3)
Resistente a ≥ 3 antimicrobianos	-	-	1 (1,1)

FONTE: a autora (2018).

No geral, a ocorrência de resistência aos antimicrobianos testados foi baixa, assim como observado em outros trabalhos (RUIZ-BOLIVAR et al., 2011; KORSACK et al., 2012; CAMARGO et al., 2014; HAUBERT et al., 2015; LOTFOLLAHI et al., 2017). A alta quantidade de cepas com resistência intermediária à clindamicina já foi relatada por Lotfollahi et al. (2017), onde 100% apresentaram esse perfil. Já Chen et al. (2010), Ruiz-Bolivar et al. (2011) e Wieczorek et al. (2012) obtiveram 69%, 65% e 37% dos isolados resistentes, respectivamente. O principal mecanismo de resistência à clindamicina é a chamada resistência MLSB, codificada pelo gene *ermA* ou *ermC* (*erythromycin ribosomal methylase*), que torna os micro-organismos resistentes à classes antimicrobianas: macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B (Spížek & Řezanka, 2017). Porém, neste estudo, o baixo percentual de resistência à eritromicina (1,1%) sugere que a resistência à clindamicina possa ser atribuída por

ação enzimática que modifica a estrutura desse antimicrobiano, inativando-o (BRISSENO-NOEL et al., 1988; CHEN et al., 2010).

Teste de suscetibilidade utilizando distintas classes antimicrobianas é amplamente utilizado para determinar e monitorar os perfis de resistência antimicrobiana dos isolados, no entanto, somente ampicilina, penicilina e sulfametaxazol-trimetropim apresentam valores de referência específicos para *L. monocytogenes* determinados pelo CLSI. Todas as cepas testadas foram resistentes a ampicilina, 18,8% foram resistentes à penicilina, e somente 6,2% foram resistentes à sulfametaxazol-trimetropim (TABELA 04).

TABELA 04 – SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *L. monocytogenes* SEGUNDO PADRÕES INTERPRETATIVOS DETERMINADOS PELO CLSI (2011)

Antimicrobiano	Breakpoint (µg/ml)	Variação CIM*	NR** (%)
Ampicilina	>2	≥16	16 (100)
Penicilina	>2	0,5 - ≥16	3 (18,8)
Sufametaxazol/Trimetropim	≥4/76	1/19 – 4/76	1 (6,2)

*CIM: Concentração Inibitória; **NR: Número de cepas resistentes. FONTE: a autora (2018).

É cada vez mais comum encontrar trabalhos com resultados de resistência entre isolados de *L. monocytogenes* frente a esses antimicrobianos. Para ampicilina, o número de isolados resistentes, em alguns estudos, variaram entre 60 e 83,3% e para penicilina, entre 27,2 e 43,4%. Frente à associação de sulfametaxazol com trimetropim, autores encontraram resistência de 10 e 33% entre os isolados testados (HARAKEH et al., 2009; JAMALI, RADMEHR & THONG, 2013; HAUBERT et al., 2015; OLANIRAN, NZIMANDE & MKIZE, 2015; DU et al., 2017; LOTFOLLAHI et al., 2017).

Apesar das cepas de *L. monocytogenes* terem apresentado suscetibilidade à maioria dos antimicrobianos testados, a presença de resistência frente aos antimicrobianos de eleição no tratamento de listeriose invasiva se constitui uma preocupação importante para a saúde pública (LOBER, 1997; CHARPENTIER & COURVALIN, 1999; POROS-GLUCHOWSKA et al. 2003; HANSEN, GERNER-SMIDT & BRUUN. 2005; CLSI, 2006).

Vancomicina também é uma alternativa de tratamento quando os pacientes são alérgicos aos antimicrobianos da classe das penicilinas ou que cursam com

bacteremia, e eritromicina é utilizado no tratamento de gestantes, porém não há padrões específicos determinados pelo CLSI para *L. monocytogenes*. Sendo assim, a avaliação da suscetibilidade desse agente é feita de forma indireta, utilizando os padrões determinados a outros micro-organismos (JONES & MACGOWAN, 1995; LORBER, 1997; HANSEN, GERNER-SMIDT & BRUUN. 2005). Neste estudo, não houve resistência frente à vancomicina e apenas um isolado apresentou resistência a eritromicina (TABELA 03).

Estudos revelaram um aumento na resistência de *L. monocytogenes* a muitos antimicrobianos, reforçando a necessidade de se estudar constantemente as alterações do comportamento da resistência, o que pode estar relacionado ao uso excessivo destas moléculas em tratamentos humanos e na produção animal, em paralelo a habilidade inata das bactérias em evolui. Além do meio ambiente que desempenha um papel importante permitindo interações com outras bactérias e consequente transferência de genes ou plasmídeos (CHARPENTIER & COURVALIN, 1999; LUNGU et al., 2011; KOVACEVIC et al., 2013). A aquisição desses elementos genéticos móveis pode ser considera como a causa mais provável de desenvolvimento de resistência entre *L. monocytogenes*, visto que a maioria dos genes envolvidos nos mecanismos de resistência nesses micro-organismos se encontram em plasmídeos e *transposons* (BIAVASCO et al., 1996; CHARPENTIER & COUVALIN, 1999; BERTRAND et al., 2005; BERTSCH et al., 2013; HAUBERT et al., 2015; BERTSCH et al., 2014; SHARMA et al., 2017).

Neste estudo, as cepas apresentaram capacidade de adesão em superfície, sendo todos classificados como fracamente aderente, segundo classificação sugerida por Stepanović et al. (2000). Esse perfil de adesão chama atenção para uma possível capacidade de formação de biofilme por essas cepas, já que essa é a primeira etapa para essa formação. Uma vez estabelecido, o biofilme pode se desprender de forma intermitente, podendo atuar como fonte crônica de contaminação aos alimentos ou se dispersar pelo ambiente devido ao aumento da ocorrência da contaminação cruzada (MARKKULA et al., 2005). Além disso, cepas de *L. monocytogenes* aderidas são mais resistentes à limpeza e à desinfecção do que as bactérias em suspensão (PAN et al., 2006; SIMÕES, SIMÕES & VIEIRA, 2010; VAN DER VEEN & ABEE, 2011).

Silva et al. (2016) também obtiveram um maior percentual das cepas classificadas como fracamente aderente (65%), seguido de 30% e 5% das cepas

com moderada e forte capacidade de adesão, respectivamente. A intensidade do potencial de adesão e formação de biofilme *in vitro* de *L. monocytogenes* varia entre os trabalhos, devido aos vários fatores que podem interferir nessa habilidade, como a superfície aderente (propriedades e características físico-químicas), ambiente (pH, temperatura, resíduos orgânicos) e o próprio micro-organismo (hidrofobicidade, motilidade e produção de exopolissacarídeos) (Moltz & Martin, 2005).

5.4 CONCLUSÕES

As maioria das cepas de *L. monocytogenes* caracterizadas apresentaram os principais genes de virulência (*inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *hlyA*, *actA* e *iap*). Assim, com esses resultados, sugere-se a potencial virulência dessas cepas, que somada a resistência detectada a importantes antimicrobianos comumente usados para tratar listeriose em humanos (ampicilina, penicilina e sulfametaxazol com trimetropim), constituem uma situação alarmante à saúde pública.

Foi detectado o potencial de adesão de todas as cepas testadas, mas estudos adicionais são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos na adesão das cepas *L. monocytogenes* em superfícies de interesse nas indústrias de alimentos. Contudo, a capacidade de adesão detectada nas cepas contribui para a persistência desses micro-organismos no ambiente da indústria.

6 CONCLUSÕES FINAIS

L. monocytogenes foi isolada de ambiente de abate e processamento de suínos, porém não foi detectada nas amostra obtida nas granjas de terminação, sugerindo que os animais não constituem o principal disseminador do patógeno às plantas frigoríficas. A maior frequência de isolamento do patógeno no ambiente industrial ocorreu nas etapas finais de manipulação da carne suína, tanto em utensílios (faca e tábua de cortes) como em equipamento (esteira condutora de corte para embalagem final).

Todas as cepas de *L. monocytogenes* foram pertencentes ao sorogrupo Vlb e através da determinação do perfil genético, pelo PFGE, foi possível constatar uma persistência de clones dessas cepas no ambiente industrial, com destaque à esteira que conduzia os cortes para embalagem final, ponto com maior taxa de isolamento do patógeno tanto antes como durante as atividades. A detecção nesse local assume um importante papel na rota de transmissão de *L. monocytogenes*, visto que é a última etapa de manipulação da carne na sala de cortes, podendo facilmente contaminar o produto que posteriormente pode carrear o agente até o consumidor.

Este estudo confirmou a presença dos principais genes de virulência entre a maioria das cepas de *L. monocytogenes*. Além da potencial virulência das cepas testadas, foi detectado um perfil de resistência alarmante frente à ampicilina, penicilina e sulfametaxazol-trimetropim, importantes antimicrobianos de eleição no tratamento de listeriose invasiva.

Foi detectado o potencial de adesão em todas as cepas testadas, sendo classificadas como fracamente aderente. Essa capacidade de adesão pode justificar a persistência desses micro-organismos tanto numa mesma superfície quanto no mesmo abatedouro frigorífico, além de ser uma fonte constante de contaminação aos alimentos devido principalmente ao aumento da possibilidade de contaminação cruzada. Essas evidências reforçam a importância do controle e monitoramento de *L. monocytogenes* em abatedouro frigorífico de suínos, sobretudo no ambiente de processamento, visando minimizar a contaminação de produtos finais com um patógeno de importância em saúde pública.

REFERÊNCIAS

- ALLERBERGER, F. *Listeria*: Growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 35, p. 183–189, 2003.
- AWOFISAYO-OKUYELU, A.; ARUNACHALAM, N.; DALLMAN, T.; GRANT, K. A.; AIRD, H.; MCLAUCHLIN, J.; PAINSET, A.; AMAR, C. An Outbreak of Human Listeriosis in England between 2010 and 2012 Associated with the Consumption of Pork Pies. **Journal of Food Protection**, v. 79, n.5, p. 732–740, 2016.
- AZEVEDO, I.; REGALO, M.; MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; GIBBS, P.A.; HOGG, T. Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal. **Journal of Food Control**, v. 16, p. 121–124, 2005.
- BARBUDDHE, S.B.; CHAKRABORTY, T. *Listeria* as an enteroinvasive gastrointestinal pathogen. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 337, p. 173–195, 2009.
- BARROS, M.A.; NERO, L.A.; SILVA, L.C.; D'OVIDIO, L.; MONTEIRO, F.A.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; HOFER, E.; BELOTI, V. *Listeria monocytogenes*: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. **Meat Sci**, v.76, p. 591–596, 2007.
- BATZ, M. B.; DOYLE, M. P.; MORRIS, G. Jr.; PAINTER, J.; SINGH, R.; TAUXE, R. V.; TAYLOR, M. R.; LO FO WONG, D. M.; FOOD ATTRIBUTION WORKING GROUP. Attributing illness to food. **Emerg Infect Dis**, v. 11, p. 993–999, 2005.
- BEHRAVESH, C.B.; JONES, T.F.; VUGIA, D.J.; LONG, C.; MARCUS, R.; SMITH, K.; THOMAS, S.; ZANSKY, S.; FULLERTON, K.E.; HENAO, O.L. Deaths associated with bacterial pathogens transmitted commonly through food: foodborne diseases active surveillance network (FoodNet), 1996–2005. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, p. 263–267, 2011.
- BERESFORD, M.R.; ANDREW, P.W.; SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 1000–1005, 2001.
- BERRANG, M. E.; MEINERSMANN, R. J.; FRANK, J. F.; SMITH, D. P.; 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.
- BERRANG, M.E.; MEINERSMANN, R.J.; FRANK, J.F.; LADELY, S.R. Colonization of a newly constructed commercial chicken further processing plant with *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.**, v. 73, p. 286–291, 2010.
- BERTRAND, S.; HUYS, G.; YDE, M.; D'HAENE, K.; TARDY, F.; VRINTS, M.; SWINGS, J.; COLLARD, J.-M. Detection and characterization of tet(M) in tetracycline-resistant *Listeria* strains from human and food-processing origins in Belgium and France. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, p. 1151–1156, 2005.

BERTSCH, D.; RAU, J.; EUGSTER, M. R.; HAUG, M. C.; LAWSON, P. A.; LACROIX, C.; MEILE, L. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 63, p. 526–532, 2013.

BERTSCH, D.; MUELLI, M.; WELLER, M.; URUTY, A.; LACROIX, C.; MEILE, L. Antimicrobial susceptibility and antibiotic resistance gene transfer analysis of foodborne, clinical, and environmental *Listeria* spp. isolates including *Listeria monocytogenes*. **MicrobiologyOpen**, v. 3, p. 118–127, 2014.

BHUNIA, A.K. **Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis**, New York, NY: Springer, p. 165-182, 2008.

BIAVASCO, F.; GIOVANETTI, E.; MIELE, A.; VIGNAROLI, C.; FACINELLI, B.; VARALDO, P. In vitro conjugative transfer of VanA vancomycin resistance between Enterococci and *Listeriae* of different species. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15, p. 50–59, 1996.

BIERNE, H.; SABET, C.; PERSONNIC, N.; COSSART, P. Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. **Microbes Infect**, v. 9, p. 1156-1166, 2007.

BONAVENTURA, G.; PICCOLOMINI, R.; PALUDI, D.; D'ORIO, V.; VERGARA, A.; CONTER, M. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1552-1561, 2008.

BONSAGLIA, E.C.R.; SILVA, N.C.C.; JÚNIOR, A.F.; JÚNIOR, J.A.; TSUNEMI, M.H.; RALL, V.L.M. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. **Journal of Food Control**, v. 35, p. 386-391, 2014.

BORUCKI, M.K.; CALL, D.R. *Listeria monocytogenes* Serotype Identification by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p. 5537-5540, 2003.

BOSCHER, E.; HOUARD, E.; DENIS, M. Prevalence and distribution of *Listeria monocytogenes* serotypes and pulsotypes in sows and fattening pigs in farrow-to-finish farms (France, 2008). **J. Food Prot.**, v. 75, p. 889-895, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n.146, de 07 de março de 1996. Regulamento técnico geral para a fixação dos requisitos microbiológicos de queijos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.9, de 08 de abril de 2009. Procedimentos de controle da *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2009.

BREED, R. S.; MURRAY, E. G. D.; HITCHENS, A. P. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: The William and Wilkins Co. 1948, 60p.

BRISSEON-NOEL, A.; DELRIEU, P.; SAMAIN, D.; COURVALIN, P. Inactivation of lincosamide antibiotics in *Staphylococcus*: identification of Incosaminide o-nucleotidyltransferases and comparison of the corresponding resistance genes. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 15880–15887, 1988.

BROUWER, M.C.; VAN DE BEEK, D.; HECKENBERG, S.G.B.; SPANJAARD, L.; DE GANS, J. Community-acquired *Listeria monocytogenes* meningitis in adults. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 1233–1238, 2006.

BUCHANAN, R.L.; GORRIS, L.G.M.; HAYMAN, M.M.; JACKSON, T.C.; WHITING, R.C. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. **Food Control**, v. 75, p. 1-13, 2017.

BYRNE, V.V.; HOFER, E.; VALLIM, D.C.; ALMEIDA, R.C.C. Occurrence and antimicrobial resistance patterns of *Listeria monocytogenes* isolated from vegetables. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 438-443, 2016.

CABANES, D.; DUSSURGET, O.; DEHOUX, P.; COSSART, P. Auto, a surface associated autolysin of *Listeria monocytogenes* required for entry into eukaryotic cells and virulence. **Mol. Microbiol.**, v. 51, n. 6, p. 1601-1614, 2004.

CAMARGO, A. C.; LAFISCA, A.; COSSI, M. V. C.; LANNA, F. G. P. A.; DIAS, M. R.; PINTO, P. S. A.; NERO, L. A. Low Occurrence of *Listeria monocytogenes* on Bovine Hides and Carcasses in Minas Gerais State, Brazil: Molecular Characterization and Antimicrobial Resistance. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 7, p. 1148-1152, 2014.

CAMARGO, A.C.; DIAS, M.R.; COSSI, M.V.C.; LANNA, F.G.P.A.; CAVICCHIOLI, V.Q.; VALIM, D.C.; PINTO, P.S.A.; HOFER, E.; NERO, L.A. Serotypes and Pulsotypes Diversity of *Listeria monocytogenes* in a Beef-Processing Environment. **Foodborne Pathog Dis.**, v. 12, n. 4, p. 323-326, 2015.

CAMARGO, A.C.; WOODWARD, J.J.; NERO, L.A. The Continuous Challenge of Characterizing the Foodborne Pathogen *Listeria monocytogenes*. **Foodborne Pathog Dis.**, v. 13, n.8, p. 405-416, 2016.

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

CARTWRIGHT, E.J.; JACKSON, K.A.; JOHNSON, S.D.; GRAVES, L.M.; SILK, B.J.; MAHON, B.E. Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008. **Emerging and infectious Diseases**, v. 19, p. 1-9, 2013.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Multistate outbreak of listeriosis linked to whole canteloupes from jenson farms, colarado (final update)** (2011). Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupesjensen-farms>>. Acesso em: 03 de novembro de 2017.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2011, Annual Report**. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2014a.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2012, Annual Report**. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2014b.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2013, Annual Report**. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2015.

CDC – Center for Disease Control and Prevention. **Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Blue Bell Creameries Products (Final Update)** (2015a).

Disponível em: <<http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/ice-cream-03-15/>>. Acesso em: 17 de novembro de 2017.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Sprouts and investigation of human listeriosis cases (final update)** (2015b). Disponível

em: <<http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bean-sprouts-11-14/index.html>>. Acesso: 30 de novembro de 2017.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Multistate outbreak of listeriosis linked to commercially produced, prepackaged caramel apples made from bidart bros. Apples (final update)** (2015c). Disponível em:

<<http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/caramel-apples-12-14/index.html>>. Acesso: 30 de novembro de 2017.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2014, Annual Report**. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2016.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2015, Annual Report**. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2017.

CDC – Center for Disease Control and Prevention. **Listeria (listeriosis) – Prevention**. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/listeria/prevention.html>>. Acesso em: 31 de janeiro de 2018.

CHAE, M. S.; SCHRAFT, H. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of difeferent *Listeria monocytogenes* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 103-111, 2000.

CHAKRABORTY, T. The molecular mechanisms of actin-based intracellular motility by *Listeria monocytogenes*. **Microbiologia**, v.12, n.2, p.237-244, 1996.

CHARPENTIER, E.; COURVALIN, P. Minireview: Antibiotic resistance in *Listeria* spp. **Antimicrob. Agents Chemoter**, v. 43, n. 9, p. 2103-2108, 1999.

CHATURONGAKUL, S.; RAENGPRADUB, S.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. **Trends in microbiology**, v.16, p. 388-396, 2008.

CHEN, B.-Y.; PYLA, R.; KIM T.-J.; SILVA, J.L.; JUNG, Y.-S. Antibiotic resistance in *Listeria* species isolated from catfish fillets and processing environment. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, p. 626–632, 2010.

CHMIELEWSKI, R.; FRANK, J. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, p. 22-32, 2003.

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. A predictive model for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilm on buna-N rubber. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, p.11-19, 2006.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria**. CLSI document M45-A, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically – Ninth Edition**. CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 27th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

COLAK, H.; HAMPIKYAN, H.; ULUSOY, B.; BINGOL, E.B. Presence of *Listeria monocytogenes* in Turkish style fermented sausage (sucuk). **Food Control**, v. 18, p. 30-32, 2007.

COLE, M.; JONES, M.; HOLYOAK, C. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 69, p. 63-72, 1990.

CONTER, M.; PALUDI, D.; ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; VERGARA, A.; IANIERI, A. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 497–500, 2009.

COSSART, P.; LECUIT, M. Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement. Bacterial factors, cellular ligands and signaling. **The Embo Journal**, v. 17, p. 3797–3806, 1998.

COSSART, P. Met, the HGF-SF receptor: another receptor for *Listeria monocytogenes*. **Trends Microbiol.**, v. 9, n. 3, p. 105-107, 2001.

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

CRUM, N.F. Update on *Listeria monocytogenes* infection. **Current Gastroenterology Reports**, v.4, p. 287–296, 2002.

CRUZ, C. D.; MARTINEZ, M. B.; DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alim. Nutr.**, v.19, n.2, p. 195-206, 2008.

DE LAS HERAS, A.; CAIN, R.J.; BIELECKA, M.K.; VÁZQUEZ-BOLAND, J. Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, p. 118–127, 2011.

DEN BAKKER, H. C.; WARCHOCKI, S.; WRIGHT, E. M.; ALLRED, A. F.; AHLSTROM, C.; MANUEL, C. S.; STASIEWICZ, M. J.; BURRELL, A.; ROOF, S.; STRAWN, L.K.; FORTES, E.; NIGHTINGALE, K.K.; KEPHART, D.; WIEDMANN, M. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 64, p. 1882–1889, 2014.

DISSON, O.; LECUIT, M. Targeting of the central nervous system by *Listeria monocytogenes*. **Virulence**, v. 3, p. 213-221, 2012.

DOUMITH, M.; CAZALET, C.; SIMOES, N.; FRANGEUL, L.; JACQUET, C.; KUNST, F.; MARTIN, P.; COSSART, P.; GLASER, P.; BUCHRIESER, C. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 1072-1083, 2004a.

DOUMITH, M.; BUCHRIESER, C.; GLASER, P.; JACQUET, C.; MARTIN, P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 3819-3822, 2004b.

DOUMITH, M.; JACQUET, C.; GERNER-SMIDT, P.; GRAVES, L.M.; LONCAREVIC, S.; MATHISEN, T.; MORVAN, A.; SALCEDO, C.; TORPDAHL, M.; VAZQUEZ, J.A.; MARTIN, P. Multicenter Validation of a Multiplex PCR Assay for Differentiating the Major *Listeria monocytogenes* Serovars 1/2a, 1/2b, 1/2c, and 4b: Toward an International Standard. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 2648-2650, 2005.

DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 1997.

DROSINOS, E.H.; MATARAGAS, M.; VESKOVIC-MORACANIN, S.; GASPARIK-REICHARDT, J.; HADZIOSMANOVIC, M.; ALAGIC, D. Quantifying non-thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in European fermented sausages using bacteriocinogenic lactic acid bacteria or their bacteriocins: A case study for risk assessment. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 2648–2663, 2006.

DU, X.J; ZHANG, X.; WANG, X.; SU, Y.-I.; LI, P.; WANG, S. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* in Chinese food obtained from the central area of China. **Food Control**, v. 74, p. 9-16, 2017.

EFSA – European Food Safety Authority. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the Health and Consumer Protection, Directorate General, European Commission on Microbiological Risk Assessment in feedingstuffs for foodproducing animals. **The EFSA Journal**, p. 1–84. 2008.

EFSA – European Food Safety Authority. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010-2011 Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. **EFSA Journal**, v.11, p.1-75, 2013.

EFSA – European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. **EFSA Journal**, v.13, p. 165, 2015.

FAO/WHO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization*. **Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods (Technical Report)**. Microbiological risk assessment series 5, 2004. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/mra_listeria/en/>. Acesso em: 18 de novembro de 2017.

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

FDA – Food and Drug Administration. ***Listeria monocytogenes*: Contains nonbinding recommendations draft - not for implementation compliance policy Guide guidance for FDA staff sec. 555.320 (2008)**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm136694.htm>>. Acesso em: 17 de novembro de 2017.

FDA – Food and Drug Administration. **Preventing *Listeria* Infections: What You Need to Know (2017)**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Food/ResourcesForYou/Consumers/ucm079667.htm>>. Acesso em: 31 de janeiro de 2018.

FERREIRA, A.J.P.; KNOBL, T. Colibacilose. In: BERCHIERI, J.R.A.; SILVA, E.N.; FABIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.Z. **Doença das Aves**. Campinas: FACTA, cap. 4.2, p. 457-482, 2009.

FERRONATTO, A.I.; PELLEGRINI, D.C.P.; GUERRA, P.; CARDOSO, M.R.I. Distribuição de grupos clonais de *Listeria monocytogenes* em carcaças e no ambiente de matadouros frigoríficos de suínos. **Archives of Veterinary Science**, v.17, n. 3, p. 42-49, 2012.

FLEMING, D.W.; COCHI, S.L.; MACDONALD, K.L.; BRONDUM, J.; HAYES, P.S.; PLIKAYTIS, B.D.; HOLMES, M.B.; AUDURIER, A.; BROOME, C.V.; REINGOLD, A.L. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. **New England Journal of Medicine**, v. 312, p. 404-407, 1985.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: ATHENEU, 2008.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005.

FREITAG, N. E.; PORT, G. C.; MINER, M. D. *Listeria monocytogenes* - from saprophyte to intracellular pathogen. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, p. 623-628, 2009.

FSA – Food Standards Agency. **Eating while you are pregnant**. Dispon'ível em: < <https://www.food.gov.uk/sites/default/files/multimedia/pdfs/publication/eatingwhilepregnant1209.pdf>>. Acesso em: 31 de janeiro de 2018.

FURRER, B.; CANDRIAN, U.; HOEFELEIN, Ch.; LUETHY, J. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by *in vitro* amplification of haemolysin gene fragments. **Journal Applied Microbiology**, v. 70, p. 372-379, 1991.

GAMBOA-MARIN, A.; BUITRAGO, S.; PEREZ-PEREZ, K.; MERCADO, M.; POUTOU-PINALES, R.; CARRASCAL-CAMACHO, A. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in pork-meat and other processed products from the Colombian swine industry. **Rev. MVZ Cordoba**, v. 17, p. 2827-2833, 2012.

GANDHI, M.; Chikindas, M.L. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p. 1-15, 2007.

GAUL, L.K.; FARAG, N.H.; SHIM, T.; KINGSLEY, M.A.; SILK, B.J.; HYYTIA-TREES, E. Hospital-acquired listeriosis outbreak caused by contaminated diced CelerydTexas, 2010. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, p. 20-26, 2013.

GELBÍCOVÁ, T.; KARPÍSKOVÁ, R. Occurrence and characteristics of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food from retail market in the Czech Republic. **Czech Journal of Food Science**, v. 27, p. S2-3eS2-7, 2009.

GELBÍCOVÁ, T.; KARPÍSKOVÁ, R. Outdoor environment as a source of *Listeria monocytogenes* in food chain. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 30, p. 83-88, 2012.

GIANOTTI, A.; SERRAZANETTI, D.; KAMDEM, S.S.; GUERZONI, M.E. Involvement of cell fatty acid composition and lipid metabolism in adhesion mechanism of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p. 9-17, 2008.

GIBBONS, I.S.; ADESIYUN, A.; SEEPERSADSINGH, N.; RAHAMAN, S. Investigation for possible source(s) of contamination of ready-to-eat meat products with *Listeria* spp. and other pathogens in a meat processing plant in Trinidad. **Food Microbiology**, v. 23, p. 359-366, 2006.

GOLDFINE, H.; KNOB, C. Purification and characterization of *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C. **Infect. Immun.**, v. 60, n. 10, p. 4059-4067, 1992.

GÓMEZ, D.; AZÓN, E.; MARCO, N.; CARRAMIÑANA, J. J.; ROTA, C.; ARIÑO, A.; YANGÜELA, J. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. **Food Microbiology**, v. 42, p. 61-65, 2014.

GOULET, V.; HEBERT, M.; HEDBERG, C.; LAURENT, E.; VAILLANT, V.; DEVALK, H.; DESENCLOS, J.C. Incidence of listeriosis and related mortality among groups at risk of acquiring listeriosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, p. 652–660, 2012.

GRANIER, S.A.; MOUBARECK, C.; COLANERI, C.; LEMIRE, A.; ROUSSEL, S.; DAO, T.-T.; COURVALIN, P.; BRISABOIS, A. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 2788–2790, 2011.

GRAVES, L.M.; 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.; HELSEL, L.O.; STEIGERWALT, A.G.; MOREY, R.E.; DANESHVAR, M.I.; ROOF, S.E.; ORSI, R.H.; FORTES, E.D.; MILILLO, S.R.; DEN BAKKER, H.C.; WIEDMANN, M.; SWAMINATHAN, B.; SAUDERS, B.D. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 60, p. 1280–1288, 2010.

GRIF, K.; PATSCHEIDER, G.; DIERICH, M.; ALLERBERGER, F. Incidence of fecal carriage of *Listeria monocytogenes* in three healthy volunteers: a one-year prospective stool survey. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 22, p. 16-20, 2003.

GUDBÖRNSDÓTTIR, B.; SUIHKO, M.L.; GUSTAVSSON, P.; THORKELSSON, G.; SALO, S.; SJÖBERG, A.M.; NICLASSEN, O.; BREDHOLT, S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. **Food Microbiol.**, v. 21, p. 217–225, 2004.

HAIN, T.; CHATTERJEE, S.S.; GHAI, R.; KUENNE, T.; BILLION, A.; STEINWEG, C.; DOMANN, E.; KARST, U.; JANSCH, L.; WEHLAND, J.; EISENREICH, W.; BACHER, A.; JOSEFH, B.; SCHAR, J.; KREFT, J.; KLUMPP, J.; LOESSNER, M.J.; DORSCHT, J.; NEUHAUS, K.; FUNCHS, T.M.; SCHERER, S.; DOUMITH, M.; JACQUET, C.; MARTIN, P.; GOEBEL, W.; CHAKRABORTY, T. Pathogenomics of *Listeria* spp. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, p. 541-557, 2007.

HALTER, E.L.; NEUHAUS, K.; SCHERER, S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 63, p. 641–647, 2013.

HANSEN, J. M.; GERNER-SMIDT, P.; BRUUN, B. Antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* in Denmark 1958–2001. **APMIS**, v. 113, p. 31–36, 2005.

HARAKEH, S.; SALEH, I.; ZOUHAIRI, O.; BAYDOUN, E.; BARBOUR, E.; ALWAN, N. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy-based food products. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 4022-4027, 2009.

HAUBERT, L.; MENDONÇA, M.; LOPES, G.V.; DE ITAPEMA CARDOSO, M.R.; DA SILVA, W.P. *Listeria monocytogenes* isolates from food and food environment harbouring tetM and ermB resistance genes. **Applied Microbiology**, v. 62, p. 23-29, 2015.

HELLSTROM S., LAUKKANEN R., SIEKKINEN K.-M., RANTA J., MAIJALA R., KORKEALA H. *Listeria monocytogenes* contamination in pork can originate from farms. **J. Food Prot.**, v. 73, p. 641–648, 2010.

HOELZER, K.; CHEN, Y.; DENNIS, S.; EVANS, P.; POUILLLOT, R.; SILK, B.J.; WALLS, L. New Data, Strategies, and Insights for *Listeria monocytogenes* Dose-Response Models: Summary of an Interagency Workshop, 2011. **Risk Analysis**, v. 33, n.9, p. 1568-1581, 2013

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 9 ed., 1994.

IGLESIAS, M.A.; KRONING, I.S.; DECOL, L.T.; FRANCO, B.D.G.M.; SILVA, W.P. Occurrence and phenotypic and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in slaughterhouses in southern Brazil. **Food Res Int.** v. 100, p. 96-101, 2017.

ISO. **Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 1: Detection method** – ISO 11290-1, 1996.

ISO. **Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data** – ISO 11290-1/Amd 1, 2004.

JAMALI, H.; RADMEHR, B.; THONG, K.L. Prevalence, characterisation, and antimicrobial resistance of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk in farm bulk tanks. **Food Control**, v. 34, p. 121–125, 2013.

JARADAT, Z.W.; BHUNIA, A.K. Glucose and nutrient concentrations affect the expression of 104-kilodalton *Listeria* adhesion protein in *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4876–4883, 2002.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed, v. 6, 2005.

JAY, J.M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D.A. **Modern food microbiology**. 7.ed. New York: SPRINGER, 2005.

JEFFERSON, K.K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, p. 163–173, 2004.

JOHNSON, J.L.; DOYLE, M.P.; CASSENS, R.G.; SHOENI, J.L. Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimentally infected cattle and in hard salami. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 497–501, 1988.

JONES, E.M.; MACGOWAN, A.P. Antimicrobial chemotherapy of human infection due to *Listeria monocytogenes*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v.14, p. 165–175, 1995.

KANUGANTI, S. R.; WESLEY, I. V.; REDDY, P. G.; MCKEAN, J.; HURD, H. S. Detection of *Listeria monocytogenes* in pigs and pork. **J. Food Prot.**, v. 65, p. 1470–1474, 2002.

KOCOT, A.M.; OLSZEWSKA, M.A. Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in a food processing context. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 47–57, 2017.

KORSAK, D.; BOREK, A.; DANILUK, S.; GRABOWSKA, A.; PAPPELBAUM, K. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environment in Poland. **International Journal of Food Microbiology**, v. 158, p. 203–208, 2012.

KOVACEVIC, J.; SAGERT, J.; WOZNIAK, A.; GILMOUR, M.W.; ALLEN, K.J. Antimicrobial resistance and coselection phenomenon in *Listeria* spp. recovered from food and food production environments. **Food Microbiol**, v. 34, p. 319–327, 2013.

LAMONT, R.F.; SOBEL, J.; MAZAKI-TOVI, S.; KUSANOVIC, J.P.; VAISBUCH, E.; KIM, S.K.; ULDBJERG, N.; ROMERO, R. Listeriosis in human pregnancy: a systematic review. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 39, p. 227–236, 2011.

LARIVIÈRE-GAUTHIER, G.; LETELLIER, A.; KÉROUANTON, A.; BEKAL, S.; QUESSY, S.; FOURNAISE, S.; FRAVALO, P. Analysis of *Listeria monocytogenes* strain distribution in a pork slaughter and cutting plant in the province of Quebec. **Journal of Food Protection**, v. 77, p.2121–2128, 2014.

LARSEN, H. E.; SEELIGER, H. P. R. (1966). A mannitol fermenting *Listeria*: *Listeria grayi* sp. n. In: **Proceedings of the Third International Symposium on Listeriosis**, p. 35–39, 1994.

LASA, I.; DEHOUX, P.; COSSART, P. Actin polymerization and bacterial movement. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1402, n. 3, p. 217–228, 1998.

LATORRE, L.; PARISI, A.; FRACCALVIERI, R.; NORMANNO, G.; LA PORTA, M. C.; GOFFREDO, E.; PALAZZO, L.; CICCARESE, G.; ADDANTE, N.; SANTAGADA, G. Low prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods from Italy. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 6, p. 1507–1512, 2007.

LECLERCQ, A.; CLERMONT, D.; BIZET, C.; GRIMONT, P.A.D.; FLECHE-MATÉOS, A.; ROCHE, S.M.; BUCHRIESER, C.; CADET-DANIEL, V.; MONNIER, A.; LECUIT, M.; ALLERBERGER, F. *Listeria rocourtiae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 2210–2214, 2010.

LEE WONG, A.C. Biofilms in food processing environments. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2765–2770, 1998.

LEE, S. H. I.; BARANCELLI, G. V.; DE CAMARGO, T. M.; CORASSIN, C. H.; ROSIM, R. E.; DA CRUZ, A. G.; CAPPATO, L. P.; DE OLIVEIRA, C. A. F. Biofilm-producing ability of *Listeria monocytogenes* isolates from Brazilian cheese processing plants. **Food Research International**, v. 91, p. 88–91, 2017.

LINNAN, M.J.; MASCOLA, L.; LOU, X.D.; GOULET, V.; MAY, S.; SALMINEN, C.; HIRD, D.W.; YONEKURA, M.L.; HAYES, P.; WEAVER, R. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. **The New England Journal of Medicine** v. 319, p. 823, 1988.

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

LOMONACO, S.; PATTI, R.; KNABEL, S.J.; CIVERA, T. Detection of virulence-associated genes and epidemic clone markers in *Listeria monocytogenes* isolates from PDO Gorgonzola cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, p. 76–79, 2012.

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

LÓPEZ, V.; NAVAS, J.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, J.V. Low potential virulence associated with mutations in the *inlA* and *prfA* genes in *Listeria monocytogenes* isolated from raw retail poultry meat. **J Food Prot**, v. 76, p. 129–132, 2013.

LORBER, B. Listeriosis. **Clin. Infect. Dis.** v. 24, p. 1–9, 1997.

- LOTFOLLAHI, L.; CHAHARBALESH, A.; REZAEI, M. A.; HASANI, A. Prevalence, antimicrobial susceptibility and multiplex PCR-serotyping of *Listeria monocytogenes* isolated from humans, foods and livestock in Iran. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 425-429, 2017.
- LUNGU, B.; O'BRYAN, C.A.; MUTHAIYAN, A.; MILILLO, S.R.; JOHNSON, M.G.; CRANDALL, P.G.; RICKE, S.C. *Listeria monocytogenes*: antibiotic resistance in food production. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, p. 569-578, 2011.
- MANTILLA, S. P. S.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; SANTOS, E. B.; GOUVÊA, R. Occurrence of *Listeria* spp. in bovine ground meat samples commercialized in Niterói, RJ, Brazil. **Ciênc Agrotec**, v. 31, p. 1225-1230, 2007.
- MARCO, A.J.; PRATS, N.; RAMOS, J.A.; BRIONES, V.; BLANCO, M.; DOMINGUEZ, L.; DOMINGO, M. A microbiological, histopathological and immunohistological study of the intragastric inoculation of *Listeria monocytogenes* in mice. **J. Comp. Pathol.**, v. 107, n. 1, p. 1-9, 1992.
- MARKKULA, A.; AUTIO, T.; LUNDÉN, J.; KORKEALA, H. Raw and processed fish show identical *Listeria monocytogenes* genotypes with pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 6, p. 1228-1231, 2005.
- MARTINS, E.A.; GERMANO, P.M.L. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of São Paulo, Brazil: Occurrence, quantification, and serotyping. **Food Control**, v. 22, p. 297-302, 2011.
- MASCOLA, L.; SORVILLO, F.; GOULET, V.; HALL, B.; WEAVER, R.; LINNAN, M. Fecal carriage of *Listeria monocytogenes*-observations during a community-wide, common-source outbreak. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, p. 557-558, 1992.
- MCKELLAR, R. Use of the CAMP test for identification of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 4219, 1994.
- MELONI, D.; PIRAS, F.; MUREDDU, A.; FOIS, F.; CONSOLATI, S.G.; LAMON, S.; MAZZETTE, R. *Listeria monocytogenes* in Five Sardinian Swine Slaughterhouses: Prevalence, Serotype, and Genotype Characterization. **Journal of Food Protection**, v. 76, p. 1863-1867, 2013.
- MELONI, D.; CONSOLATI, S.G.; MAZZA, R.; MEREDDU, A.; FOIS, F.; PIRAS, F.; MAZZETTE, R. Prevalence and molecular characterization of the major serovars of *Listeria monocytogenes* in ten Sardinian fermented sausage processing plants. **Meat Science**, v. 97, p. 443-450, 2014.
- MERTINS, S.; JOSEPH, B.; GOETZ, M.; ECKE, R.; SEIDEL, G.; SPREHE, M.; HILLEN, W.; GOEBEL, W.; MÜLLER-ALTROCK, S. Interference of components of the phosphoenolpyruvate system with the central virulence gene regulator *PrfA* of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 473-490, 2007.

MIYASAKI, K.N.; CHIARINI, E.; SANT'ANA, A.S.; DESTRO, M.T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M. High prevalence, low counts and uncommon serotypes of *Listeria monocytogenes* in linguça, a Brazilian fresh pork sausage. **Meat Science**, v. 83, p. 523-527, 2009.

MOLTZ, A. G.; MARTIN, S. E. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 92–97, 2005.

MØRETRØ, T.; LANGSRUD, S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. **Biofilms**, v. 1, p. 107-121, 2004.

MYLONAKIS, E.; HOHMANN, E.L.; CALDERWOOD, S.B. Central nervous system infection with *Listeria monocytogenes*. 33 years experience at a general hospital and review of 776 episodes from the literature. **Medicine**, v. 77, n. 5, p. 313-336, 1998.

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, p. 769-774, 2000.

NOTERMANS, S.H.; DUFRENNE, J.; LEIMEISTER-WACHTER, M.; DOMANN, E.; CHAKRABORTY, T. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2666-2670, 1991.

OCHIAI, Y.; YAMADA, F.; BATMUNKH, O.; MOCHIZUKI, M.; TAKANO, T.; HONDO, R.; UEDA, F. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in retailed meat in the Tokyo metropolitan area. **J Food Prot**, v. 73, p. 1688–1693, 2010.

OLANIRAN, A. O.; NZIMANDE, S. B. T.; MKIZE, N. G. Antimicrobial resistance and virulence signatures of *Listeria* and *Aeromonas* species recovered from treated wastewater effluent and receiving surface water in Durban, South Africa. **BMC Microbiology**, v. 15, p. 234, 2015.

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

OXARAN, V.; LEE, S.H.I.; CHAUL, L.T.; CORASSIN, C.H.; BARANCELLI, G.V.; ALVES, V.F.; OLIVEIRA, C.A.F.; GRAM, L.; MARTINIS, E.C.P. *Listeria monocytogenes* incidence changes and diversity in some Brazilian dairy industries and retail products. **Food Microbiology**, v. 68, p. 16-23, 2017.

PAINTER, J.A.; HOEKSTRA, R.M.; AYERS, T.; TAUXE, R.V.; BRADEN, C.R.; ANGULO, F. J.; GRIFFIN, P. M. Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998-2008. **Emerg Infect Dis**, v. 19, p. 407–415, 2013.

PAN, Y.; BREIDT JR. F.; KATHARIOU, S. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilmes to sanitizing agents in simulated food processing environment. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 72, p. 7711-7717, 2006.

PAZIAK-DOMANSKA, B.; BOGULAWSKA, E.; WIEKOWSKA-SZAKIEL, M.; KOTLOWSKI, R.; ROZALSKA, B.; CHMIELA, M.; KUR, J.; DABROWSKI, W.; RUDNICKA, W. Evaluation of the API test, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity and PCR method in identification of *Listeria monocytogenes* in meat foods. **FEMS Microbiology Letters**, v. 171, p. 209-214, 1999.

PICHLER, J.; MUCH, P.; KASPER, S.; FRETZ, R.; AUER, B.; KATHAN, J.; MANN, M.; HUHULESCU, S.; RUPPITSCH, W.; PIETZKA, A.; SILBERBAUER, K.; NEUMANN, C.; GSCHIEL, E.; MARTIN, A.; SCHUETZ, A.; GINDL, J.; NEUGSCHWANDTNER, E.; ALLERBERGER, F. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with jellied pork contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Wien Klin Wochenschr**, v. 121, p. 149–156, 2009.

PIFFARETTI, J.C.; KRESSEBUCH, H.; AESCHBACHER, M.; BILLE, J.; BANNERMAN, E.; MUSSER, J.M.; SELANDER, R.K.; ROCOURT, J. Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p. 3818-3822, 1989.

PIRIE, J. H. The Genus *Listerella* Pirie. **Science**, v. 91, p. 383, 1940.
 PIZARRO-CERDA, J.; KUHBACHER, A.; COSSART, P. Entry of *Listeria monocytogenes* in Mammalian Epithelial Cells: An Updated View. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, p. 1-17, 2012.

PIZZARRO-CERDA, J.; COSSART, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. **Cell**, v. 24, n. 4, p. 715-727, 2006.

POROS-GLUCHOWSKA, J.; MARKIEWICZ, Z. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes*. **Acta Microbiol. Pol.**, v. 52, n. 2, p. 113-129, 2003.

PORT, G. G.; FREITAG, N. E. Identification of novel *Listeria monocytogenes* secreted virulence factors following mutational activation of the central virulence regulator, *PrfA*. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 5886-5897, 2007.

POUILLOT, R.; HOELZER, K.; JACKSON, K.A.; HENAO, O.L.; SILK, B.J. Relative risk of listeriosis in Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) sites according to age, pregnancy, and ethnicity. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, p. 5405-5410, 2012.

POUILLOT, R.; HOELZER, K.; CHEN, Y.; DENNIS, S. *Listeria monocytogenes* dose response revisited--incorporating adjustments for variability in strain virulence and host susceptibility. **Risk Analysis**, v. 35, p. 90-108, 2015.

POUILLOT, R.; KLONTZ, K.C.; CHEN, Y.; BURALL, L.S.; MACARISIN, D.; DOYLE, M.; BALLY, K.M.; STRAIN, E.; HAMMACK, T.S.; VAN DOREN, J.M. Infectious dose of *Listeria monocytogenes* in outbreak linked to ice cream United States, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, V. 22, P. 2113-2119, 2016.

PRENCIPE, V. A.; RIZZI, V.; ACCIARI, V.; IANNETTI, L.; GIOVANNINI, A.; SERRAINO, A.; CALDERONE, D.; ROSSI, A.; MORELLI, D.; MARINO, L.;

MIGLIORATI, G.; CAPORALE, V. *Listeria monocytogenes* prevalence, contamination levels and strains characterization throughout the Parma ham processing chain. **Food Control**, v. 25, p. 150-158, 2012.

RAGON, M.; WIRTH, T.; HOLLANDT, F.; LAVENIR, R.; LECUIT, M.; LE MONNIER, A.; BRISSE, S. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. **PLoS Pathog**, v.4, 2008.

RASMUSSEN, O.F.; SKOUBOE, P.; DONS, L.; ROSSEN, L.; OLSEN, J.E. *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes. **Microbiology**, v.141, p.2053-2061, 1995.

RAWOOL, D. B.; MALIK, S. V. S.; BARBUDDHE, S. B.; SHAKUNTALA, I.; AURORA, R. A. A multiplex PCR for detection of virulence associated genes in *Listeria monocytogenes*. **Internet Journal of Food Safety**, v. 9, p. 56-62, 2007.

REIS-TEIXEIRA, F.B.D.; ALVEZ, V.F.; de MARTINIS, E.C.P. Growth, viability and architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces. **Braz J Microbiol**, v. 48, p. 587-591, 2017.

ROBERTS, A.; NIGTINGALE, K.; JEFFERS, G.; FORTES, E.; KONGO, J.M.; WIEDMANN, M. Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III. **Microbiology**, v.152, n.3, p.685-963, 2006.

ROCOURT, J. Risk factors for listeriosis. **Food Control**, v. 7, p. 194-203, 1996.
ROCOURT, J.; GRIMONT, P. A. D. *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. **Int J Syst Bacteriol**, v. 33, p. 866–869, 1983.

ROSSI, L.P.R.; ALMEIDA, R.C.C.; LOPES, L.S.; FIGUEIREDO, A.C.L.; RAMOS, M.P.P.; ALMEIDA, P.F. Occurrence of *Listeria* spp. in Brazilian fresh sausage and control of *Listeria monocytogenes* using bacteriophage P100. **Food Control**, v. 22, p. 954-958, 2011.

RUIZ-BOLIVAR, Z.; NEUQUE-RICO, M. C.; POUTOU-PINÁLES, R. A.; CARRASCAL-CAMACHO, A. K.; MATTAR, S. Antimicrobial Susceptibility of *Listeria monocytogenes* Food Isolates from Different Cities in Colombia. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, p. 913-919, 2011.

RYSER, E.T.; MARTH, E.M. **Listeria, Listeriosis, and Food Safety**. 3rd ed. (Food Science and Technology). New York: CRC Press, 2007.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R.M.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.V.; WIDDOWSON, M.A.; ROY, S.L.; JONES, J.L.; GRIFFIN, P.M. Foodborne illness acquired in the United States—Major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 7–15, 2011.

SCHÄFER, D.F.; STEFFENS, J.; BARBOSA, J.; ZENI, J.; PAROUL, N.; VALDUGA, E.; JUNGES, A.; BACKES, G.T.; CANSIAN, R.L. Monitoring of contamination sources of *Listeria monocytogenes* in a poultry slaughterhouse. **LWT - Food Science and Technology**, v. 86, p. 393-398, 2017.

SCHLECH III, W.F.; LAVIGNE, P.M.; BORTOLUSSI, R.A.; ALLEN, A.C.; HALDANE, E.V.; WORT, A.J.; HIGHTOWER, A.W.; JOHNSON, S.E.; KING, S.H. Epidemic listeriosis -- evidence for transmission by food. **New England Journal of Medicine**, v. 308, p. 203-205, 1983.

SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C.V. Epidemiology of human listeriosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, p. 169-183, 1991.

SCORTTI, M.; MONZÓ, H.J.; LACHARME-LORA, L.; LEWIS, D.A.; VÁZQUEZ-BOLAND, J.A. The PrfA virulence regulon. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 1196-1207, 2007.

SEELIGER, H. P. R. Apathogene Listerien: *L. innocua* sp. n. (Seeliger et Schoofs, 1977). **Zentralbl Bakteriolog Hyg 1 Abt Orig A** 249, p. 487-493, 1981.

SEELIGER, H. P. R.; ROCOURT, J.; SCHRETTENBRUNNER, A.; GRIMONT, P. A. D.; JONES, D. *Listeria ivanovii* sp. nov. **Int J Syst Bacteriol**, v. 34, p. 336-337, 1984.

SEVEAU, S.; PIZARRO-CERDA, J.; COSSART, P. Molecular mechanism exploited by *Listeria monocytogenes* during host cell invasion. **Microbes and infection**, v. 9, p. 1167- 1175, 2007.

SHARMA, S.; SHARMA V.; DAHIYA, D. K.; KHAN, A.; MATHUR, M.; Sharma, A. Prevalence, Virulence Potential, and Antibiotic Susceptibility Profile of *Listeria monocytogenes* Isolated From Bovine Raw Milk Samples Obtained From Rajasthan, India. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 14, n. 3, p. 132-140, 2017.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 407-413, 2009.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N..F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R.; OKAZAKI, M.M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3ª Ed. São Paulo, Varela. p. 552, 2007.

SILVA, D.A.L.; CAMARGO, A.C.; TODOROV, S.D.; NERO, L.A. *Listeria* spp. contamination in a butcher shop environment and *Listeria monocytogenes* adhesion ability and sensitivity to foodcontact surface sanitizers. **Journal of Food Safety**, p. 1-8, 2016.

SIMMONS, C.; STASIEWICZ, M.J.; WRIGHT, J. *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. contamination patterns in retail delicatessen establishments in three U.S. states. **Journal of Food Protection**, v. 77, p. 1929-1939, 2014.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, p. 573-583, 2010.

SLUTSKER, L.; SCHUCHAT, A. **Listeriosis in humans**. (Food Science and Technology). New York: Marcel Dekker, p. 75-96, 1999.

SPÍŽEK, J.; ŘEZANKA, T. Lincosamides: Chemical Structure, Biosynthesis, Mechanism of Action, Resistance, and Applications. **Biochemical Pharmacology**, v.133, p. 20-28, 2017.

SREY, S.; JAHID, I.K.; HA, S.D. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. **Food Control**, v. 31, p. 572-585, 2013.

STEENACKERS, H.; HERMANS, K.; VANDERLEYDEN, J.; KEERSMAECKER, S.C.J. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, v. 45, p. 502-531, 2012.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, v. 40, n. 2, p. 175–179, 2000.

SUAREZ, M.; VAZQUEZ-BOLAND, J. A. **The bacterial actin nucleator protein actA is involved in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes***. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed [Accession No. AF103807]. 2001.

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

TÉMOIN, S.; ROCHE, S.M.; GRÉPINET, O.; FARDINI, Y. ; VELGE, P. Multiple point mutations in virulence genes explain the low virulence of *Listeria monocytogenes* field strains. **Microbiology- SGM**, v. 154, p. 939-948, 2008.

THÉVENOT, D.; DELINGNETTE-MULLER, M.L; CHRISTIEANS, S.; VERNOSZYROZAND, C. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p. 85-94, 2005.

TODD, E. C. D.; NOTERMANS, S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 22, p. 1438-1490, 2011.

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

TYÖPPÖNEN, S.; PETÄJÄ, E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 233-244, 2003.

UE – União Europeia. **Regulamento nº 2073/2005 da comissão de 15 de Novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios**. Disponível em:

<<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:PT:PDF>>. Acesso em: 23 de novembro de 2017.

USDA/FDA – United States Department of Agriculture and Food and Drug Administration. **Food safety for older adults (2011)**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM312790.pdf>>. Acesso em: 23 de janeiro de 2018.

VAN DER VEEN, S.; ABEE, T. Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and paracetic acid. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 421-431, 2011.

VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; DOMINGUEZ, L.; RODRIGUEZ-FERRI, E.F.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.F.; SUAREZ, G. Preliminary evidence that different domains are involved in cytolytic activity and receptor (cholesterol) binding in listeriolysin O, the *Listeria monocytogenes* thiol-activated toxin. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 53, n. 1-2, p. 95-99, 1989.

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

WARD, T.J.; DUCEY, T.F.; USGAARD, T.; DUNN, K.A.; BIELAWSKI, J.P. Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 7629-7642, 2008.

WELLER, D.; ANDRUS, A.; WIEDMANN, M.; den BAKKER, H.C. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 286-292, 2015.

WHO – World Health Organization. Food Safety. **General information related to microbiological risks in food (2012)**. Disponível em:

<<http://www.who.int/foodsafety/micro/general/en/index.html>>. Acesso em: 15 de outubro de 2014.

WIECZOREK, K.; DMOWSKA, K.; OSEK, J. Prevalence, characterization, and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from bovine hides and carcasses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 2043-2045, 2012.

WIEDMANN, M. Molecular Subtyping Methods for *Listeria monocytogenes*. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 2, p.524-531, 2002.

YANG, S.; PEI, X.; WANG, G.; YAN, L.; HU, J.; LI, Y.; LI, N.; YANG, D. Prevalence of food-borne pathogens in ready-to-eat meat products in seven different Chinese regions. **Food Control**, v. 65, p. 92-98, 2016.

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

ZHAO, T.; PODTBURG, T.C.; ZHAO, P.; SCHMIDT, B.E.; BAKER, D.A.; CORDS, B.; DOYLE, M.P. Control of *Listeria* spp. by competitive-exclusion bacteria in floor drains of a poultry processing plant. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p. 3314–3320, 2006.

ZHAO, T.; PODTBURG, T.C.; ZHAO, P.; CHEN, D.; BAKER, D.A.; CORDS, B.; DOYLE, M.P. Reduction by competitive bacteria of *Listeria monocytogenes* in biofilms and *Listeria* bacteria in floor drains in ready-to-eat poultry processing plant. **Journal of Food Protection**, v. 76, p. 601-607, 2013.

APÊNDICE 1 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA: METODOLOGIA E RESULTADOS DETALHADOS

Foram selecionadas dezesseis cepas de *Listeria monocytogenes* (TABELA 01) para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para ampicilina, penicilina e para a associação de sulfametoxazol com trimetoprim, conforme determinado para *L. monocytogenes* (CLSI, 2006), através do método de microdiluição em caldo para testes de suscetibilidade antimicrobiana (CLSI, 2012).

TABELA 01 – CEPAS DE *Listeria monocytogenes* TESTADAS ATRAVÉS DO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA

ORIGEM	DATA COLETA	IDENTIFICAÇÃO
Esteira condutora para Embalagem Limpa	28/09/16	L01
Esteira condutora para Embalagem Em Uso	13/10/16	L07
Esteira condutora para Embalagem Em Uso	01/11/16	L13
Ralo Limpo	09/11/16	L19
Esteira condutora para Embalagem Limpa	09/11/16	L25
Esteira condutora para Embalagem Em Uso	09/11/16	L31
Tábua de corte Limpa	30/11/16	L37
Esteira condutora para Embalagem Limpa	30/11/16	L43
Esteira condutora para Embalagem Em Uso	30/11/16	L50
Esteira condutora para Embalagem Limpa	14/12/16	L55
Esteira condutora para Embalagem Em Uso	14/12/16	L61
Ralo Limpo	11/01/17	L67
Esteira condutora para Embalagem Limpa	11/01/17	L69
Esteira condutora para Embalagem Em Uso	11/01/17	L75
Piso Em Uso	11/01/17	L81
Faca Em Uso	18/01/17	L82

FONTE: a autora (2018).

O teste foi realizado em triplicata e para cada antimicrobiano foi testado seis concentrações, sendo três concentrações acima e duas concentrações abaixo ao *breakpoint* determinado pelo CLSI (CLSI, 2006). Cada cepa, diluída a 10^8 UFC/mL (escala 0,5 de MacFarland) utilizando caldo Mueller-Hinton (Oxoid), foi semeada nos poços da microplaca de 96 poços previamente preparados com os antimicrobianos a serem testados nas concentrações pré-determinadas. Em todas as placas utilizadas

foram reservados poços para controles de crescimento das cepas (meio de cultura com inóculo e sem adição de antimicrobianos) e para o branco (poços com meio de cultura sem inóculo e sem antimicrobiano). As placas foram incubadas a 37°C/24h, e em seguida, foram submetidas à leitura das densidades ópticas (DO) em leitor de ELISA.

As DO das amostras foram ajustadas com o branco, e as médias foram analisadas por ANOVA e teste de Fisher ($p < 0,05$) para verificação das diferenças estatísticas entre os crescimentos dos controles com as cepas nas diferentes concentrações de antimicrobianos. Ainda, gráficos a partir das médias foram criados para uma detecção visual do ponto evidente de inibição do crescimento das cepas nas diferentes concentrações dos antimicrobianos. Assim, os resultados das CIM foram determinados associando o ponto evidente de inibição das cepas através dos gráficos com as diferenças detectadas nos testes estatísticos, interpretando os valores de acordo com os *breakpoints* definidos no CLSI (CLSI, 2006) como sensíveis e resistentes (TABELAS 02 A 04).

TABELA 2 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA **AMPICILINA** SEGUNDO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE DEZESSEIS ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* (FONTE: a autora, 2018)

Concentração	L01	L07	L13	L19	L25	L31	L37	L65
0 µg/ml	0,224 a	0,221 a	0,294 a	0,269 a	0,236 a	0,253 b	0,265 a	1,243 a
0,5µg/ml	0,233 a	0,222 a	0,243 b	0,227 b	0,214 a	0,218 c	0,242 ab	1,169 a
1 µg/ml	0,234 a	0,216 a	0,236 b	0,222 b	0,212 a	0,288 a	0,230 ab	1,244 a
2 µg/ml	0,231 a	0,211 a	0,227 b	0,213 b	0,214 a	0,204 c	0,236 ab	1,175 a
4 µg/ml	0,213 a	0,219 a	0,229 b	0,232 b	0,219 a	0,227 bc	0,239 ab	1,163 a
8 µg/ml	0,132 b	0,163 b	0,156 c	0,166 c	0,177 b	0,210 c	0,220 b	1,180 a
16 µg/ml	0,038 c	0,024 c	0,019 d	0,054 d	0,014 c	0,062 d	0,117 c	1,275 a
p^1	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,000	0,486
CIM ²	R ³ (16)	R(16)	R(16)	R(16)	R(16)	R(16)	R(>16)	R(>16)

¹Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Fisher ($p < 0,05$); ²Concentração Inibitória Mínima; ³Resistente.

GRÁFICO 1 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA **AMPICILINA** SEGUNDO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE DEZESSEIS ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* (FONTE: a autora, 2018).

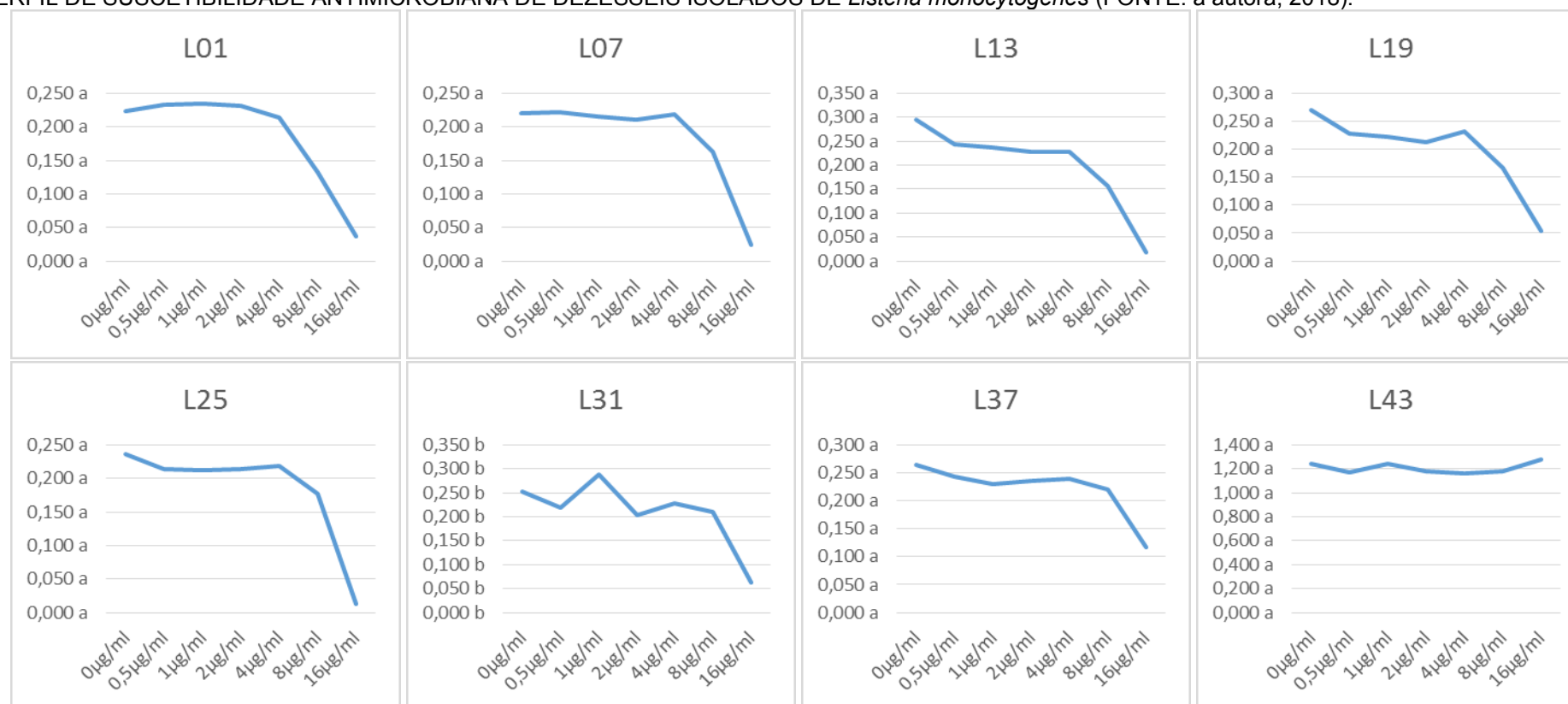


TABELA 2 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA **AMPICILINA** SEGUNDO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE DEZESSEIS ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* (continuação) (FONTE: a autora, 2018)

Concentração	L50	L55	L61	L67	L69	L75	L81	L82
0 µg/ml	1,365 ab	0,264 a	0,238 a	0,250 a	1,434 a	0,241 a	0,264 a	0,234 a
0,5µg/ml	1,347 abc	0,235 ab	0,217 a	0,217 ab	1,294 ab	0,216 b	0,226 b	0,218 ab
1 µg/ml	1,254 bc	0,225 b	0,248 a	0,210 b	1,364 ab	0,214 b	0,229 b	0,213 ab
2 µg/ml	1,230 bc	0,238 ab	0,223 a	0,209 b	1,318 ab	0,206 b	0,214 bc	0,225 a
4 µg/ml	1,199 bc	0,266 a	0,231 a	0,222 ab	1,189 ab	0,214 b	0,218 b	0,214 ab
8 µg/ml	1,193 c	0,248 ab	0,205 a	0,200 b	1,056 b	0,198 b	0,193 c	0,178 b
16 µg/ml	1,471 a	0,075 c	0,068 b	0,046 c	1,416 ab	0,058 c	0,051 d	0,040 c
p^1	0,054	< 0,0001	0,000	< 0,0001	0,292	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
CIM ²	R ³ (>16)	R(16)	R(16)	R(16)	R(>16)	R(16)	R(16)	R(16)

¹Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Fisher ($p < 0,05$); ²Concentração Inibitória Mínima; ³Resistente.

GRÁFICO 1 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA **AMPICILINA** SEGUNDO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE DEZESSEIS ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* (continuação) (FONTE: a autora, 2018)

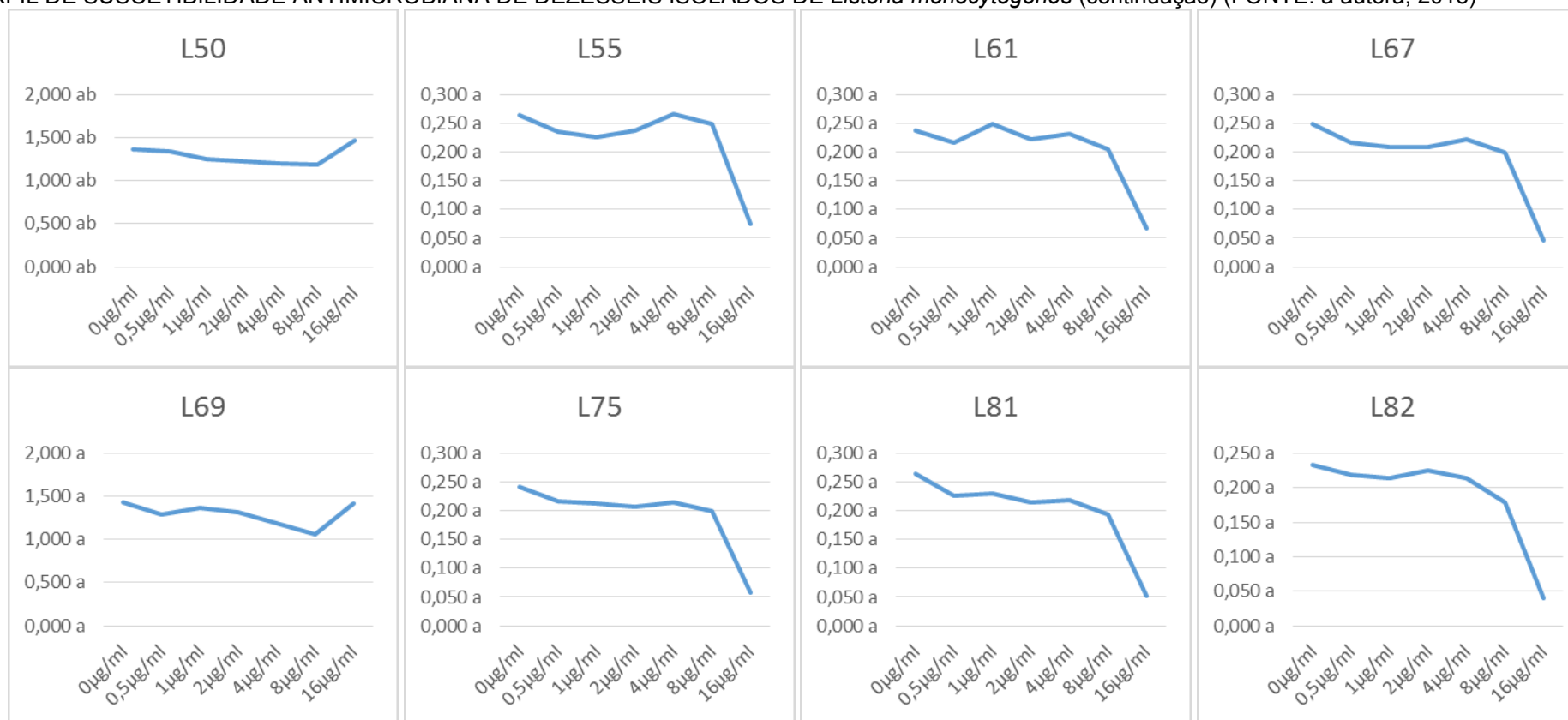


TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA **PENICILINA** SEGUNDO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE DEZESSEIS ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* (FONTE: a autora, 2018)

Concentração	L01	L07	L13	L19	L25	L31	L37	L43
0 µg/ml	0,224 a	0,221 a	0,294 a	0,269 a	0,236 a	0,253 a	0,265 a	1,243 c
0,5µg/ml	0,046 b	0,042 b	0,011 b	0,015 b	0,020 b	0,041 b	0,105 b	1,242 c
1 µg/ml	0,022 c	0,008 c	0,005 b	0,006 bc	0,008 c	0,009 c	0,056 c	1,230 c
2 µg/ml	0,015 c	0,005 c	0,003 b	0,004 bc	0,003 cd	0,007 c	0,008 d	1,411 bc
4 µg/ml	0,011 c	0,003 c	0,003 b	0,003 bc	0,001 d	0,003 c	0,005 d	1,769 a
8 µg/ml	0,006 c	0,002 c	0,002 b	0,001 c	0,001 d	0,002 c	0,002 d	1,541 b
16 µg/ml	0,005 c	0,003 c	0,002 b	0,002 bc	0,001 d	0,002 c	0,003 d	1,460 b
p^1	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,000
CIM ²	S ³ (0,5)	S(0,5)	S(0,5)	S(0,5)	S(0,5)	S(0,5)	S(2)	R ⁴ (>16)

¹Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Fisher ($p < 0,05$); ²Concentração Inibitória Mínima; ³Sensível; ⁴Resistente.

GRÁFICO 2 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA PENICILINA SEGUNDO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE DEZESSEIS ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* (FONTE: a autora, 2018)

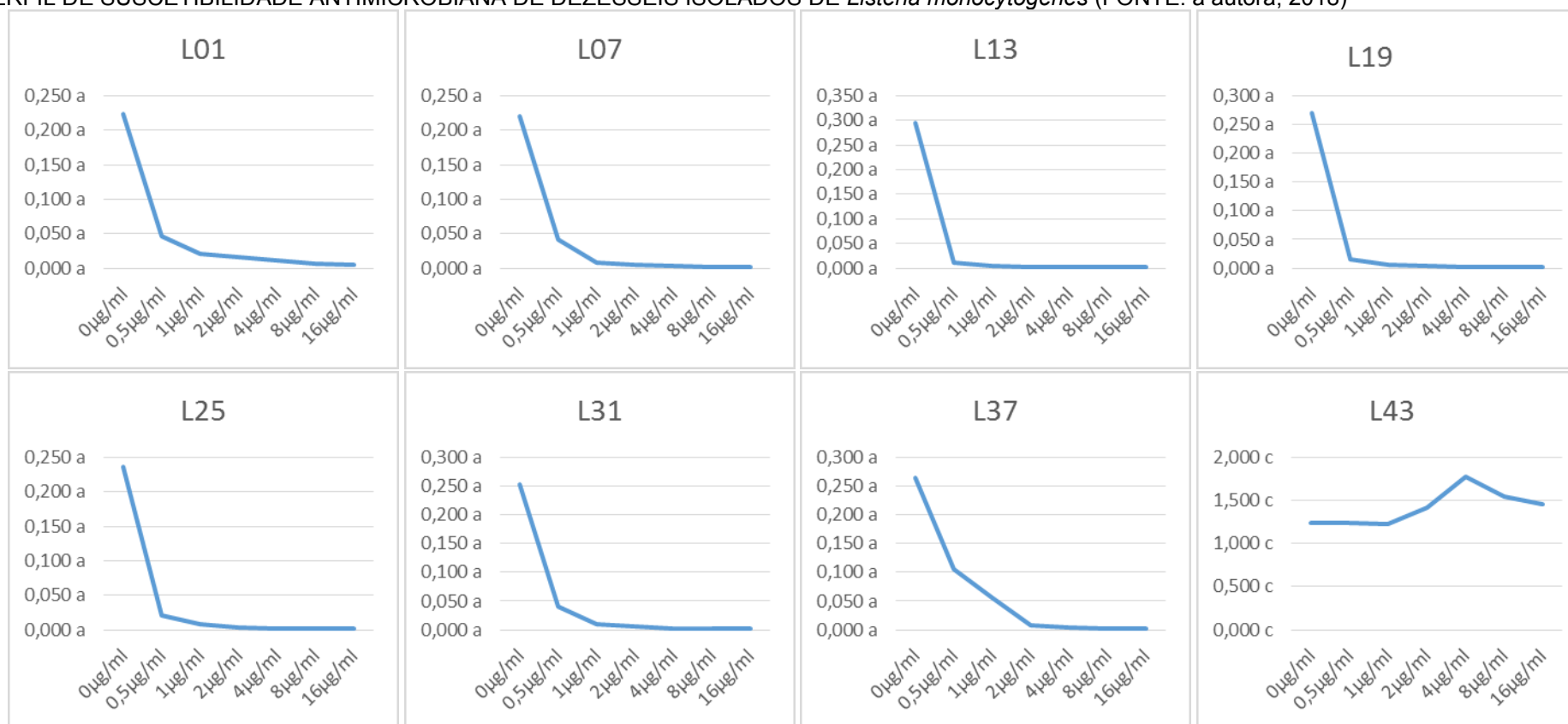


TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA **PENICILINA** SEGUNDO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE DEZESSEIS ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* (continuação) (FONTE: a autora, 2018)

Concentração	L50	L55	L61	L67	L69	L75	L81	L82
0 µg/ml	1,365 abc	0,264 a	0,238 a	0,250 a	1,434 bc	0,241 a	0,264 a	0,234 a
0,5µg/ml	1,217 bc	0,057 b	0,046 b	0,047 b	1,590 ab	0,042 b	0,046 b	0,052 b
1 µg/ml	1,141 c	0,016 c	0,013 c	0,018 c	1,311 c	0,015 c	0,015 c	0,020 c
2 µg/ml	1,469 ab	0,008 c	0,005 c	0,006 cd	1,360 c	0,007 c	0,007 cd	0,011 c
4 µg/ml	1,259 bc	0,005 c	0,001 c	0,004 cd	1,642 a	0,004 c	0,003 d	0,005 c
8 µg/ml	1,480 ab	0,003 c	0,002 c	0,004 cd	1,467 abc	0,004 c	0,002 d	0,002 c
16 µg/ml	1,574 a	0,003 c	0,002 c	0,002 d	1,479 abc	0,002 c	0,002 d	0,002 c
p^1	0,056	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,059	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
CIM ²	R ³ (>16)	S ⁴ (0,5)	S(0,5)	S(0,5)	R(>16)	S(0,5)	S(0,5)	S(0,5)

¹Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Fisher ($p < 0,05$); ²Concentração Inibitória Mínima; ³Resistente; ⁴Sensível

GRÁFICO 2 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA **PENICILINA** SEGUNDO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE DEZESSEIS ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* (continuação) (FONTE: a autora, 2018)

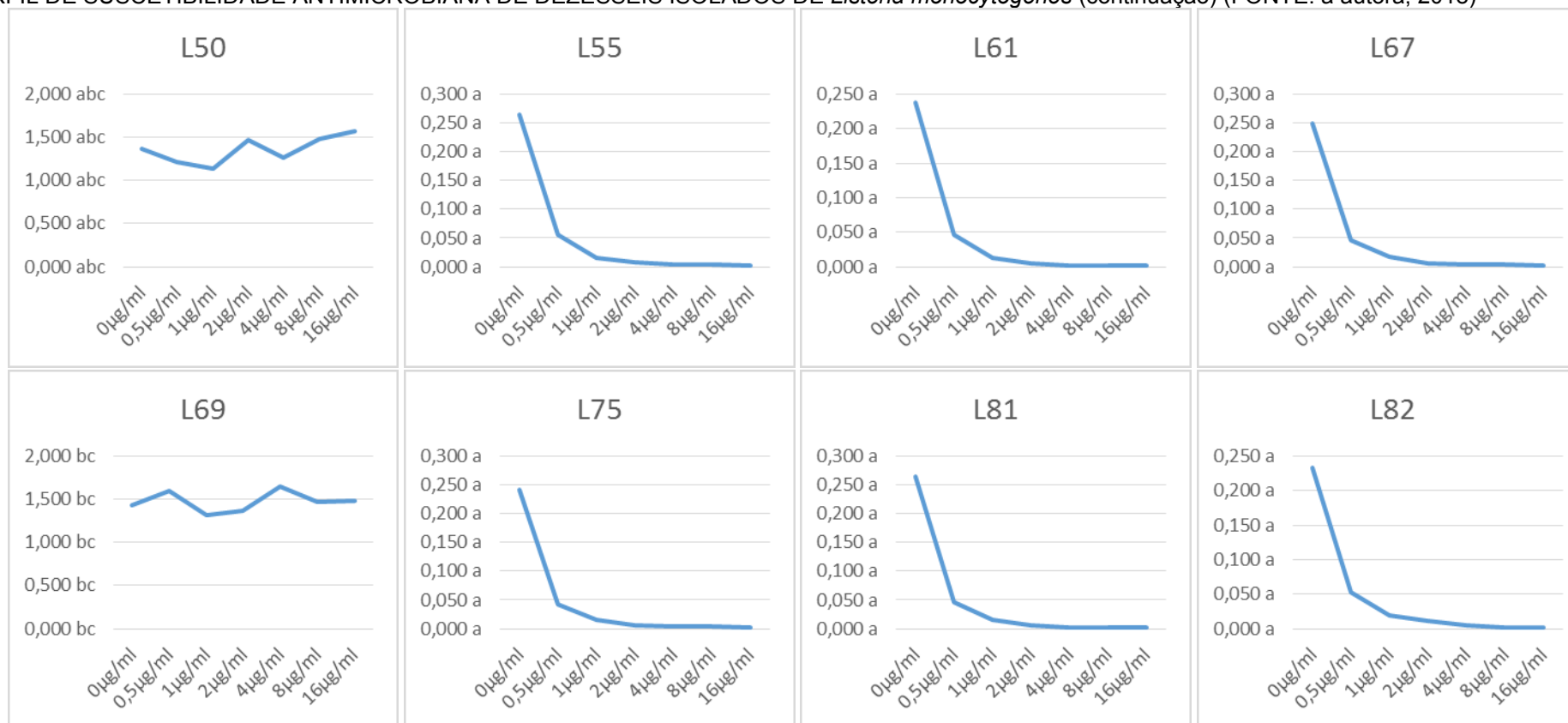


TABELA 4 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA **SULFAMETAXAZOL-TRIMETROPIM** SEGUNDO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE DEZESSEIS ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* (FONTE: a autora, 2018)

Concentração	L01	L07	L13	L19	L25	L31	L37	L43
0 µg/ml	1,049 a	0,211 a	0,207 a	0,255 a	0,255 a	0,224 a	0,234 a	0,244 a
1-19 µg/ml	0,947 ab	0,015 b	0,006 b	0,012 bc	0,005 b	0,011 b	0,014 b	0,010 b
2-38 µg/ml	0,643 b	0,015 b	0,007 b	-0,001 c	0,023 b	0,012 b	0,015 b	0,010 b
4-76 µg/ml	0,231 c	0,016 b	0,008 b	0,030 b	0,006 b	0,013 b	0,014 b	0,011 b
8-152 µg/ml	0,212 c	0,015 b	0,009 b	0,014 bc	0,005 b	0,012 b	0,014 b	0,010 b
16-304 µg/ml	0,136 c	0,014 b	0,010 b	0,013 bc	0,005 b	0,012 b	0,011 b	0,009 b
32-608 µg/ml	0,132 c	0,022 b	0,014 b	0,015 bc	0,009 b	0,015 b	0,012 b	0,010 b
p^1	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
CIM ²	R ³ (4-76)	S ⁴ (1-19)	S(1-19)	S(1-19)	S(1-19)	S(1-19)	S(1-19)	S(1-19)

¹Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Fisher ($p < 0,05$); ²Concentração Inibitória Mínima; ³Resistente; ⁴Sensível

GRÁFICO 3 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA **SULFAMETAXAZOL-TRIMETROPIM** SEGUNDO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE DEZESSEIS ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes*(FONTE: a autora, 2018)

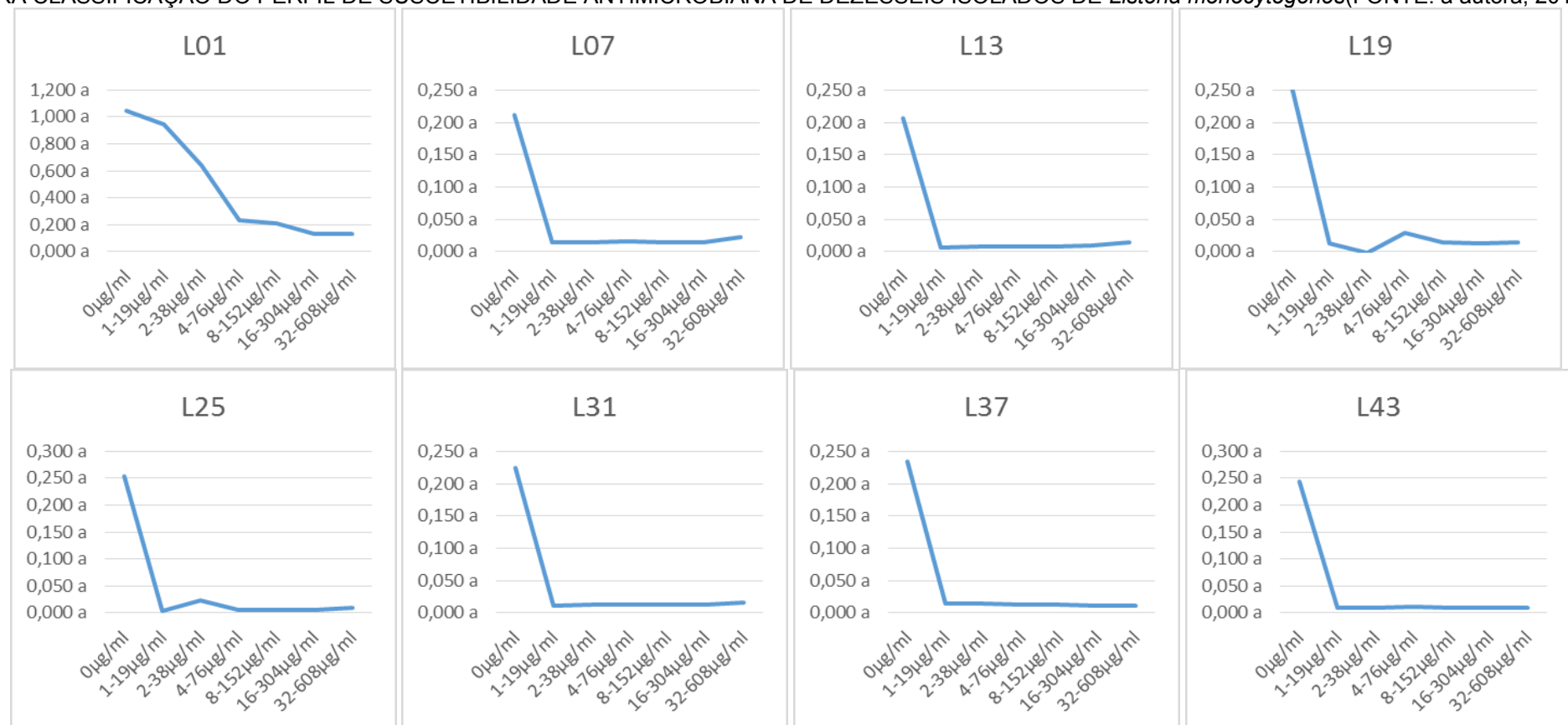


TABELA 4 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA **SULFAMETAXAZOL-TRIMETROPIM** SEGUNDO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE DEZESSEIS ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes*(cont.)(FONTE: a autora, 2018)

Concentração	L50	L55	L61	L67	L69	L75	L81	L82
0 µg/ml	0,238 a	0,242 a	0,229 a	0,213 a	0,236 a	0,231 a	0,244 a	0,238 a
1-19 µg/ml	0,010 b	0,009 b	0,019 b	0,016 b	0,018 b	0,014 b	0,014 b	0,014 b
2-38 µg/ml	0,012 b	0,008 b	0,022 b	0,019 b	0,017 b	0,016 b	0,016 b	0,020 b
4-76 µg/ml	0,010 b	0,008 b	0,023 b	0,021 b	0,017 b	0,016 b	0,015 b	0,015 b
8-152 µg/ml	0,010 b	0,008 b	0,023 b	0,018 b	0,015 b	0,016 b	0,014 b	0,016 b
16-304 µg/ml	0,009 b	0,007 b	0,021 b	0,015 b	0,015 b	0,016 b	0,012 b	0,014 b
32-608 µg/ml	0,011 b	0,008 b	0,020 b	0,014 b	0,014 b	0,015 b	0,014 b	0,016 b
p^1	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
CIM2	S3(1-19)	S(1-19)	S(1-19)	S(1-19)	S(1-19)	S(1-19)	S(1-19)	S(1-19)

¹Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Fisher ($p < 0,05$); ²Concentração Inibitória Mínima; ³Sensível

GRÁFICO 3 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA **SULFAMETAXAZOL-TRIMETROPIM** SEGUNDO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE 17 ISOLADOS DE *L. monocytogenes*(cont.)(FONTE: a autora, 2018)

