

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

***Listeria* spp. e *L. monocytogenes* EM CARNE BOVINA  
REFRIGERADA E EMBALADA A VÁCUO, EQUIPAMENTOS E  
AMBIENTES DE MATADOUROS-FRIGORÍFICOS**

Leonardo França  
Orientadora: Prof. Dra. Iolanda Aparecida Nunes

GOIÂNIA  
2008



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE)  
na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás-UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

- 1. Identificação do material bibliográfico:**       **Dissertação**       **Tese**  
**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

Autor(a):	Leonardo França		
CPF:		E-mail:	Leonardo.102@gmail.com
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?		<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Vínculo Empregatício do autor			
Agência de fomento:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	Sigla:	CNPQ
País:	Brasil	UF:GO	CNPJ:
Título:	<i>Listeria</i> spp. e <i>L. monocytogenes</i> em carne bovina refrigerada e embalada a vácuo, equipamentos e ambiente de matadouros -frigoríficos		
Palavras-chave:	Carcaças, carne bovina fresca, cortes cárneos, saúde pública, PCR, segurança alimentar		
Título em outra língua:	<i>Listeria</i> spp. and <i>L. monocytogenes</i> in vacuum-packed chilled beef, equipment, environment of slaughterhouses		
Palavras-chave em outra língua:	Carcass, fresh bovine meet, beef cuts, PCR, public health, food safety		
Área de concentração:	Higiene e Tecnologia de Alimentos		
Data defesa:	28/08/2008		
Programa de Pós-Graduação:	Ciência Animal		
Orientador(a):	Iolanda Aparecida Nunes		
CPF:		E-mail:	inag@terra.com.br
Co-orientador(a):	Albenones José de Mesquita		
CPF:		E-mail:	albenones@funape.org.br
Co-orientador (a):	Marcelo Vasconcelos Meireles		
CPF:		E-mail:	vetzootecnia@fmvz.unesp.br

**3. Informações de acesso ao documento:**

Liberção para disponibilização?<sup>1</sup>       total       parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

Capítulos. Especifique: \_\_\_\_\_

Outras restrições: \_\_\_\_\_ Gostaria que não fosse divulgado os anexos.

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: 28/08/2008

Assinatura do(a) autor(a)

**LEONARDO FRANÇA**

***Listeria* spp. e *L. monocytogenes* EM CARNE BOVINA  
REFRIGERADA E EMBALADA A VÁCUO, EQUIPAMENTOS E  
AMBIENTES DE MATADOUROS-FRIGORÍFICOS**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás

**Área de concentração:**

Higiene e Tecnologia de Alimentos

**Orientadora:**

Prof. Dr. Iolanda Aparecida Nunes -EV/UFG

**Comitê de orientação:**

Prof. Dr. Albenones José de Mesquita - EV/UFG

Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles - UNESP

**GOIÂNIA**

**2008**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(GPT/BC/UFG)

F814l França, Leonardo.  
Listeria spp. e *L. monocytogenes* em carne bovina refrigerada e embalada a vácuo, equipamentos e ambientes de matadouros –frigo- ríficos [manuscrito] / Leonardo França. – 2008.  
xv, 89f. : il., figs., tabs.,qds.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iolanda Aparecida Nunes; Co-  
Orientadores: Prof. Dr. Albenones José de Mesquita, Prof. Dr.  
Marcelo Vasconcelos Meireles.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,  
Escola de Veterinária, 2008.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, tabelas e de quadros.

Anexos.

1. Carne bovina – Embalagem a vácuo. 2. Alimentos de origem animal – Microbiologia. 3. Listeriose - Diagnóstico – Reação em Cadeia Polimerase. 4. Saúde Pública – Segurança alimentar.

CDU: 637.513:579.67

LEONARDO FRANÇA

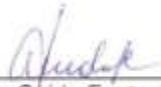
Dissertação defendida e aprovada em 28/08/2008, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Iolanda Aparecida Nunes  
(ORIENTADOR (A))



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Irma Nelly Gutierrez Rivera – ICBII/USP



\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares

À toda minha família e amigos, em especial à minha mãe Ivanilde e meu pai Adilson. À minha irmã Luciana, ao amigo-irmão Irdho e minha orientadora Iolanda, que sempre me apoiaram e me amaram, dedico.

Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida a mim concedida...

À minha Mãe, Ivanilde A. França, pelo amor incondicional, pelo exemplo de vida, por ter me ensinado a valorizar o estudo desde pequeno, pela paciência, compreensão, amizade e amor inesgotável. Pessoa esta que sabe o real sentido da palavra MÃE. Eternamente serei grato. Amo você;

A todos os mestres que por minha vida passaram e seus ensinamentos deixaram;  
À Universidade Federal de Goiás, à Escola de Veterinária, ao Centro de Pesquisa em Alimentos, por me acolherem e possibilitarem a realização deste curso;

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária, na figura de sua diretora, Dra. Maria Clorinda Fioravanti, pelo excelente desempenho de sua função;

À Secretaria da Pós-Graduação em Ciência Animal, na pessoa do Secretário Gerson de Barros, pela competência no cumprimento de suas funções, bem como por sua inesgotável paciência;

Ao CNPq pelo suporte financeiro;

À Prof. Dra. Iolanda A. Nunes, pelos ensinamentos, competência, compreensão e amparo nos momentos mais difíceis, pessoa esta que não mediu esforços para realização deste trabalho, desde seu início e principalmente no seu término. Obrigado por todos esses anos, aprendi muito com você...

Ao Prof. Dr. Albenones José de Mesquita, pelo apoio, confiança e viabilização do desenvolvimento deste trabalho;

Ao prof. Dr. Antonio Nonato, pelo apoio na realização deste trabalho;

Ao meu Amigo-Irmão Irdho, que sempre esteve do meu lado em todos os momentos que precisei, dizendo palavras de motivação, não me deixando desistir nunca e acreditando sempre na minha competência. Amigo, Obrigado por tudo!!!

A minha grande amiga, Joice Vinhal, pelo companheirismo e amizade, muito bom te conhecer e trabalhar com você;

Ao meu amigo Eurione Jardim, pela paciência, amizade e disposição de ajuda constante;

Aos meus grandes amigos Elvis Fernandes e Cristiano Pereira, pela amizade e companheirismo a mim dedicada, saudade de vocês;

As minhas companheiras de Pós-Graduação Camila Melo, Suzy Darlen e Eveline, pela convivência;

E a todos que ajudaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

**“Para que manter os pés no chão, se todo  
o mundo que voar...”**

**SUMÁRIO**

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	Xi
LISTA DE QUADROS	Xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Características do Gênero <i>Listeria</i> e <i>L. monocytogenes</i>	3
2.2 Importância de <i>L. monocytogenes</i> em saúde pública	5
2.3 Formas clínicas da listeriose	7
2.4 Vias de transmissão de <i>L. monocytogenes</i>	9
2.5 Associação de <i>L. monocytogenes</i> com alimentos	10
2.6 Regulamentações sobre <i>L. monocytogenes</i> em alimentos	17
2.7 Métodos de detecção do gênero <i>Listeria</i> e <i>L. monocytogenes</i>	19
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Amostragem	26
4.2 Técnica de PCR	27
4.3 Verificação da pureza e determinação da concentração do DNA	28
4.4 Amplificação	28
5 RESULTADOS	31
5.1 Distribuição de <i>Listeria</i> spp. e <i>L. monocytogenes</i> nas diferentes fontes	31
5.1.1 <i>Listeria</i> spp.	31
5.1.2 <i>L. monocytogenes</i>	35
5.2 Eficiência dos pares de “primers” utilizados para a detecção de <i>L. monocytogenes</i> nas fontes em estudo	36
5.2.1 Par LM1/LM2	36
5.2.2 Par LL5/LL6	38
5.3 Distribuição de <i>Listeria</i> spp. e <i>L. monocytogenes</i> nos matadouros-	39

frigoríficos de origem das amostras	
5.3.1 <i>Listeria</i> spp.	39
5.3.2 <i>L. monocytogenes</i>	44
5.4 Distribuição de <i>Listeria</i> spp. e <i>L. monocytogenes</i> segundo a origem geográfica das amostras	46
5.4.1 <i>Listeria</i> spp	51
5.4.2 <i>L. monocytogenes</i>	54
6. DISCUSSÃO	54
6.1 Distribuição de <i>Listeria</i> spp. e <i>L. monocytogenes</i> nas diferentes fontes	54
6.2 Eficiência dos pares de “primers” utilizados para a detecção de <i>L. monocytogenes</i> nas fontes em estudo	60
6.3 Distribuição de <i>Listeria</i> spp. e <i>L. monocytogenes</i> nos matadouros-frigoríficos de origem das amostras	63
6.4 Distribuição de <i>Listeria</i> spp. e <i>L. monocytogenes</i> segundo a origem geográfica das amostras	64
7. CONCLUSÕES	68
ANEXOS	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Eletroforese em gel de agarose a 1% de “amplicons” de *Listeria* spp. (938pb) e *L. monocytogenes* (702pb) obtidos com os pares de “primers” U1/LI1 e LM1/LM2, respectivamente.

FIGURA 2 - Eletroforese em gel de agarose a 2% de “amplicons” de *L. monocytogenes* (267pb) obtidos com o par de “primers” LL5/LL6

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Distribuição de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em amostras de matadouros-frigoríficos brasileiros no período de 2006 a 2008, segundo as fontes de detecção, através da técnica de PCR. Goiânia, 2008

TABELA 2 – Distribuição das amostras positivas para *L. monocytogenes* nas diferentes fontes, segundo aos pares de “primers” utilizados para amplificação. Goiânia, 2008

TABELA 3 – Distribuição de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em amostras de diferentes matadouros-frigoríficos brasileiros, segundo fontes e sítios analisados

TABELA 4 – Distribuição de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*, segundo a origem geográfica e as fontes e sítios analisados

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Misturas das reações de PCR e concentrações finais dos reagentes, segundo os pares de “primers” utilizados para amplificação de *Listeria monocytogenes* e *Listeria* spp. Goiânia, 2008

## RESUMO

Objetivando determinar a distribuição de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em fontes diversas, pela técnica de PCR, foram analisadas 360 amostras no período de novembro de 2006 a fevereiro de 2008, procedentes de 25 unidades frigoríficas de cinco empresas habilitadas para comércio internacional localizadas em alguns Estados. Foram utilizados os “primers” U1/LI1 para *Listeria* spp. e LM1/LM2 e LL5/LL6 para *L. monocytogenes*. *Listeria* spp. foi detectada em 19,72% do total analisado, com percentuais de 23% em salas de desossa, câmaras-frias e meias-carcaças, 15% em cortes cárneos e 10% em salas de matança. Nos matadouros-frigoríficos foi identificada em 19,42% no A, 17,72% no B, 22,95% no C e 20% no D e E. Em relação aos Estados, 16,34% em São Paulo, 23,94% no Mato Grosso do Sul, 14,06% em Goiás, 32% no Mato Grosso, 27,27% na Bahia e 14,28% no Pará foram positivas para o gênero. Independente do par de “primers” utilizado para amplificação, *L. monocytogenes* foi detectada em 14,72% da amostragem, sendo 20% em câmaras-frias, 15,83% em salas de desossa, 13,33% em meias-carcaças e em cortes cárneos e 10% em salas de matança. Foram obtidas 12,57% de amostras positivas no matadouro-frigorífico A, 11,39% no B, 21,31% no C e 13,33% no D e E. A espécie foi detectada em São Paulo, com 12,42% de amostras positivas, 14,08% no Mato Grosso do Sul, 12,30% em Goiás, 24% no Mato Grosso, 27,27% na Bahia e 14,28% no Pará. O par de “primer” LM1/LM2 revelou maior eficiência que o LL5/LL6 e, apesar deste último ter apresentado baixa eficiência para detecção, a totalidade de amostras positivas para *L. monocytogenes* deste trabalho só foi possível com a associação de ambos. *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* se encontram amplamente distribuídas nas fontes e sítios estudados, estando disseminadas em todos os matadouros-frigoríficos e Estados analisados, com exceção de Minas Gerais. Os resultados deste trabalho revelam a necessidade de adoção de medidas urgentes para o controle do patógeno nos estabelecimentos de abate de bovinos no Brasil e devem servir de alerta para a possibilidade de ocorrência de surtos de listeriose de veiculação alimentar, dadas as freqüências de ocorrência aqui verificadas em meias-carcaças e cortes cárneos.

Palavras chave: carcaças, carne bovina fresca, cortes cárneos, saúde pública, PCR, segurança alimentar.

## ABSTRACT

Intending to stipulate the parcel of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* in several sources, using the PCR technique, 360 samples were analyzed in the period between november 2006 and february 2008, proceeding from 25 commercial abattoirs of five companies all licensed to export from some Brazilian States. "Primers" U1/LI1 for *Listeria* spp. and LM1/LM2 and LL5/LL6 for *L. monocytogenes*. *Listeria* spp. was detected in 19,72% of the samples, with percentage of 23% in the bone rooms, cold chamber and half carcass, 15% in beef cuts and 10% in the slaughter rooms. In the slaughterhouses it was detected in 19,42% in the A, 17,72% in the B, 22,95% in the C and 20% in the D and E. Analyzing the states, 16,34% in São Paulo, 23,94% in Mato Grosso do Sul, 14,06% in Goiás, 32% in Mato Grosso, 27,27% in Bahia and 14,28% in Pará were positive for its genus. No matter the pair of "primers" used for amplification, *L. monocytogenes* were detected in 14,72% of the samples, 20% in cold chambers, 15,83% in bone rooms, 13,33% in half-carcass and in beef cuts and 10% in slaughter rooms. In the slaughterhouse A, 12,57% of the samples were detected 'positive', 11,39% in B, 21,31% in C and 13,33% in D e E. The bacterium was detected in São Paulo in 12,42% of positive samples, 14,08% in Mato Grosso do Sul, 12,30% in Goiás, 24%, in Mato Grosso, 27,27% in Bahia and 14,28% in Pará. The pair of "primer" LM1/LM2 revealed better efficiency than the LL5/LL6 and although this last one has presented low efficiency to detection, the total of positive samples of *L. monocytogenes* of this research only was possible by the association of both. *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* are largely propagated in the sources and studied places, and, therefore, disseminated in all slaughterhouses and analyzed States, excepting Minas Gerais. The results of this research revealed the necessariness of adoption of urgent providences about the control of the pathogen in the bovine slaughterhouses in Brazil and must alert the possibility of occurrence of outbreak of listeriosis of nutritious transmission, considering the occurrence and the frequency repetition here verified in half-carcass and beef cuts.

Key words: carcass, fresh bovine meat, beef cuts, PCR, public health, food safety.

## 1. INTRODUÇÃO

Entre as bactérias patogênicas veiculadas por alimentos, destaca-se *Listeria monocytogenes* em virtude da gravidade da enfermidade por ela causada e as altas taxas de letalidade, verificado em populações de risco. A prevenção da presença da bactéria no produto representa um grande desafio para as autoridades sanitárias de todos os países, especialmente os mais industrializados, onde a prevalência no homem é maior.

Em geral, a listeriose determina sintomas semelhantes ao resfriado, podendo progredir para septicemia, meningite, meningoencefalite e aborto, estando a enfermidade relacionada principalmente a idosos, recém-nascidos, indivíduos imunodeprimidos e gestantes.

Os estudos e disponibilização de procedimentos para isolamento e identificação de bactérias do gênero *Listeria* e de *L. monocytogenes* em alimentos têm aumentado muito nos últimos anos. As mudanças nas características e nos hábitos alimentares, a forma em que os alimentos são produzidos, a habilidade desta espécie para sobreviver em condições adversas e a sua capacidade para crescer em temperaturas de refrigeração, aliadas à sua resistência ao congelamento e aos diversos antimicrobianos, a torna um dos microrganismos de grande importância entre os patógenos de veiculação alimentar que representam uma preocupação constante para as indústrias de alimentos e órgãos oficiais de regulamentação.

Assim, indústrias alimentícias, autoridades de saúde pública e pesquisadores em vários países redobraram sua atenção para a presença de *L. monocytogenes* em plantas processadoras e nos alimentos de origem animal e vegetal.

Os métodos convencionais de isolamento e identificação de *L. monocytogenes* envolvem etapas de pre-enriquecimentos, enriquecimento e

plaqueamento em meios seletivos, exaustivas etapas de identificação bioquímica e sorotipagem. Tais procedimentos são trabalhosos e requerem em média duas semanas para serem concluídas, uma vez que se trata de um microrganismo psicrotrófico.

Há necessidade de se disponibilizar métodos rápidos, sensíveis, econômicos, de fácil utilização e interpretação para detecção específica de *L. monocytogenes*.

A fim de atender à legislação brasileira e às exigências dos países importadores, os diversos segmentos da indústria alimentícia brasileira têm dado maior atenção à pesquisa de *L. monocytogenes*, tanto em produtos cárneos quanto no ambiente de produção.

Embora *L. monocytogenes* seja amplamente estudada, os dados da literatura são bastante escassos quanto a sua ocorrência em matadouros-frigoríficos de bovinos no Brasil, o que motivou a realização deste trabalho, cujos objetivos consistiram na detecção de *Listeria* spp. e de *L. monocytogenes*, pela técnica de PCR, visando determinar sua distribuição em ambientes de matadouros-frigoríficos de bovinos localizados em alguns Estados brasileiros e em superfície de meias-carcaças e cortes cárneos obtidos nesses estabelecimentos.

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Características do Gênero *Listeria* e *L. monocytogenes*

As listerias são cocobacilos Gram-positivos curtos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, com extremidades arredondadas que medem de 0,4 a 0,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 0,5 a 2,0  $\mu\text{m}$  de comprimento (BERGEY'S, 1994).

Acreditava-se que as listerias estivessem relacionadas a bactérias corineformes, tendo sido colocados na família *Corinebacteriaceae*. Contudo, o gênero encontra-se mais relacionados aos gêneros *Bacillus*; *Lactobacillus* e *Streptococcus* (BERGEY'S, 1986).

As listerias são catalase-positivas, oxidase-negativa, algumas espécies são  $\beta$  hemolíticas em ágar sangue de carneiro a 5% (*L. monocytogenes*, *L. seeligeri*), D-xilose e D-manitol negativas, L-ramnose positivas,  $\alpha$  metil-D-monosídeo positivas, fermentam a glicose, são Vermelho de Metila positivas, Voges-Proskauer positivas, indol negativas, esculina positivas e não reduzem nitrato (BERGEY'S, 1994).

Em ágar semi-sólido para teste de motilidade com incubação em temperatura entre 20 a 25°C, *L. monocitogenes* desenvolve um crescimento típico, cerca de 3 a 5 mm abaixo da superfície produzindo um crescimento que lembra um guarda-chuva (BERGEY'S, 1994).

Móvel por flagelos peritríquios, quando cultivada a 20°C/24-48h é observado um movimento característico, denominado tombamento ou turbilhonamento, que auxilia na sua identificação. A 37°C, a produção de flagelos é reduzida notavelmente e a bactéria pode-se tornar imóvel (BERGEY'S, 1994).

O habitat primário de *L. monocytogenes* são o solo e a água. Vegetais podem contaminar-se pelo solo ou adubos usados como fertilizantes. Animais podem portar a bactéria sem apresentar doença e assim contaminar os alimentos como carne e leite (CDC, 2005).

Segundo BERGEY'S (1994), *L. monocytogenes* caracteriza-se como sendo um patógeno psicrotrófico que se multiplica geralmente em temperaturas de 1°C a 50°C, com temperatura ótima de 28°C, crescendo bem em temperaturas de refrigeração, de 4°C a 5°C.

Tem como características peculiares à capacidade de multiplicação em temperatura de refrigeração e suportar repetidos ciclos de congelamentos e descongelamentos (GERMANO & GERMANO, 2008). A característica psicrotrófica depende da integridade celular e de um sistema de transporte energético resistente ao frio, que estimula o metabolismo sob baixas temperaturas, propiciando altas concentrações de substratos intracelulares e uma fase lag prolongada em temperaturas de refrigeração (OLIVEIRA, 1993).

Foi constatado que a *L. monocytogenes* é capaz de tolerar concentrações de nitrito de sódio da ordem de 156ppm, máximo permitido nos Estados Unidos. Por esta razão, muitos autores a consideram um problema para a indústria de carne, uma vez que sobrevive aos níveis recomendados de nitrito de sódio e de cloreto de sódio (LOGUERCIO et al., 2001)

Pode tolerar concentrações de 10% a 30% de cloreto de sódio e crescer em atividade de água de 0,90, bem como em pHs que variam de 4,4 a 9,6, com pH ótimo de crescimento de 7,0 (SEELIGER & JONES, 1986). Estas características associadas, à capacidade de formar biofilmes, tornam o gênero de especial importância para a indústria de alimentos (AGUADO et al., 2004). Estudos demonstraram a capacidade de *L. monocytogenes* para formar biofilmes sobre materiais comumente utilizados em indústrias de alimentos, inclusive na presença de outros microrganismos (BERESFORD et al., 2001). A resistência do microrganismo a agentes antimicrobianos, substâncias químicas como álcalis e ácidos e a sua capacidade de adesão e formação de biofilmes sobre várias superfícies, como plásticos e aço inoxidável, tornam difícil sua eliminação do ambiente de produção (TAKHISTOV & GEORGE, 2004).

Não existe consenso sobre a resistência térmica da *L. monocytogenes*. BUNNING et al. (1988) adicionaram 105 UFC/mL de *L. monocytogenes* ao leite integral e o mesmo submetido à pasteurização a 71,9°C/9seg., tendo sido

observada a eficiência do processo. BOURRY & POUTREL et al. (1995) realizou inoculação experimental de *L. monocytogenes* pela via intra-mamaria em vacas que passaram a eliminar o agente no leite. Este foi então submetido a dois tratamentos térmicos. No primeiro, o leite foi pasteurizado a 71,7°C e 73,9°C/16,4seg., que se mostrou insatisfatório para a destruição das bactérias. No segundo, o aquecimento foi realizado em temperaturas de 76,4°C a 77,8°C/15,4seg. Este último tratamento demonstrou ser efetivo para a inativação da bactéria. Os resultados obtidos geraram um sério questionamento sobre a eficiência do processo de pasteurização rápida na inativação da bactéria no leite.

São descritos 14 sorovares de *L. monocytogenes*, com base nos antígenos somáticos e flagelares e são identificados pelo esquema alfa-numérico (SEELIGER & JONES, 1996). Este esquema estabelece que o número do sorovar descreva os antígenos somáticos, enquanto a letra refere-se aos flagelares. As cepas se distribuem nos sorovares 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4bx, 4b, 4c, 4d, 4e e 7. Porém, 95% dos isolados relacionados a infecções humanas, em diversos países, pertencem aos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b (ARRUDA, 2007).

## 2.2 Importância de *L. monocytogenes* em saúde pública

A importância de *L. monocytogenes* em saúde pública reside na severidade da doença e nas elevadas taxas de letalidades no homem, caracterizada por meningite, septicemia ou aborto (ARRUDA et al., 2007).

Os casos de listeriose são freqüentes e relatados há vários anos. Entre 1990 e 2004 foram notificados 1.933 casos esporádicos de listeriose humana na Inglaterra e País de Gales, tendo sido ressaltado o aumento no número de casos entre 2001 e 2004 (GILLESPEI et al., 2007).

Nos Estados Unidos, 466 casos de listeriose humana ocorreram entre 1970 e 2002, tendo sido ressaltado que quatro grupos de alimentos foram responsáveis como veículos, produtos de laticínios (leite e queijos), produtos cárneos, vegetais e ovos (FDA, 2003). Até 2003, foram confirmados nos EUA, 16

casos de listeriose perinatal a cada 100 mil nascimentos, sendo que 23% destes resultaram em mortes fetais, representando 2% das mortes fetais em geral (FDA, 2003). Atualmente são diagnosticados nesse País, mais de 2.500 casos de listeriose humana por ano e, destes, 500 resultam em óbito (CDC, 2005).

Estudos conduzidos em 2.000 na Áustria identificaram uma taxa de portadores fecais de *L. monocytogenes* de 0,8% em pessoas saudáveis (GRIF et al., 2001).

A exposição ao patógeno é grande, face ao caráter ubíquo do agente (DOUMITH et al., 2004), embora aproximadamente 90% dos adultos possuam resistência imunológica à bactéria (DOUMITH et al., 2004). Apesar disso, sua importância é justificada pela gravidade com que acomete populações consideradas de risco, que podem sofrer graves conseqüências da enfermidade por ela causada, pessoas acima de 70 anos de idade, alcoólatras, diabéticos, anêmicos, gestantes, pacientes com câncer, AIDS, lupus ou leucemia, bem como aquelas submetidas a transplantes, são considerados como grupo de risco (CHIARINI, 2007). Uma boa resistência imunológica é essencial para combater a infecção (PETERS et al., 2003; DOUMITH et al., 2004).

Apesar da baixa morbidade associada à doença, de aproximadamente 3 casos/ $10^6$  habitantes/anos nos EUA, a taxa de letalidade relacionada à infecção é muito elevada, podendo, em alguns casos atingir 50% (CDC, 2005).

São poucos os relatos de casos de listeriose no Brasil e nunca foi comprovada a sua veiculação alimentar (HOFER et al., 2006). Os relatos publicados referem-se a meningite, aborto, endocardite e isolamento de material abortado (SCHWAB et al., 2003; HOFER et al., 2006).

### 2.3 Formas clínicas da listeriose

No início da infecção, a listeriose assemelha-se a um resfriado comum, acompanhado de febre, dores musculares e distúrbios gastrintestinais. Quando a infecção atinge o sistema nervoso, podem ocorrer sintomas como dor de cabeça, torcicolo, confusão mental, perda de equilíbrio e convulsões.

Podem apresentar septicemia, geralmente sem infecção localizada, a septicemia caracteriza-se por febre, náusea, vômito e mal-estar (VASQUEZ-BOLAND et al., 2004). DOGANAY (2003) identificou a septicemia em 15 casos de 32 avaliados, entre os anos de 1987 a 2001 na Turquia.

O tropismo pelo cérebro e medula justifica a alta incidência de meningite e meningoencefalite nos casos de infecção do sistema nervoso central, acompanhado por febre alta, rigidez na nuca e desordens motoras (DOGANAY, 2003; (DOGANAY, 2003; VASQUEZ-BOLAND et al., 2001). DOGANAY (2003) identificou 13 casos de meningoencefalite e três de meningite em 32 casos estudados, constatando que 10% dos casos acometidos pela infecção neurológica apresentavam abscessos cerebrais (DOGANAY, 2003).

Endocardite é observada em 8,0% dos pacientes adultos acometidos, os quais apresentaram aproximadamente 50% de taxa de mortalidade (DOGANAY, 2003).

Gastrenterite pode se manifestar em adultos saudáveis que consomem alimentos contaminados por *L. monocytogenes*, apresentando gastrenterite febril auto-limitante após 24h a 48h de incubação (DOGANAY, 2003).

As gestantes possuem doze vezes mais chances de serem acometidas pela listeriose em relação à população em geral (HOF, 2003). Embora a gestante não manifeste sintomas preocupantes, as probabilidades de aborto e parto prematuro são grandes, em função da invasão da placenta pela bactéria, atingindo o feto, que ainda não dispõe de sistema imunológico capaz de se defender do agente (ABRAM et al., 2003). Apesar de a patologia poder se manifestar ao longo da gestação é mais comum no ultimo trimestre da gravidez (DOGANAY, 2003). Os

sintomas mais comuns da infecção gestacional são febre, dores de cabeça, mialgia, artralgia e mal-estar. Cerca de 20% dos casos resultaram em aborto, parto prematuro ou morte neonatal (DOGANAY, 2003). A *L. monocytogenes* é, ainda, considerada a terceira causa de meningite em recém-nascidos (VASQUEZ-BOLAND et al., 2001).

No Brasil, alguns estudos têm sido conduzidos para identificação do agente quando há ocorrência de quadros infecciosos em gestantes e recém-nascidos. SCHWAB & EDELWEISS (2003), pesquisaram 148 placentas e identificaram 345 de presença de *L. monocytogenes*, empregando o teste imunohistoquímico (IHQ). Em outro estudo, os mesmos autores identificaram a presença da bactéria em cinco de um total de 10 placentas analisadas pelo teste IHQ. MARTH, (1998) acompanhou um caso de listeriose congênita, com melhora clínica e laboratorial após antibioticoterapia. HOFER et al. (1998) confirmaram pelos métodos bacteriológicos a ocorrência de três casos de meningite causada por *L. monocytogenes* em Brasília, DF, sendo um caso de recém-nascido.

Em outros países da América Latina também há relatos de casos de listeriose associados à gestação. Um estudo de caso, conduzido por LACIR et al. (2000) na Argentina identificaram por eletroforese de campo pulsado (“Pulsed-field Gel Eletroforesis”, PFGE) o mesmo perfil genotípico de *L. monocytogenes* de amostras da vagina da mãe infectada e sangue do recém-nascido, que apresentava meningite, septicemia e hidrocefalia severa. CISTERNAS et al. (2002) no Chile, acompanharam um caso de listeriose em gestantes que resultou em um neonato saudável, graças ao diagnóstico precoce da doença e o emprego de antibioticoterapia imediatamente, após a confirmação da infecção. Nos Estados Unidos, o CDC (“Centers of Diseases Control”) identificou dois casos de abortamento relacionados ao consumo de hot dog em 1998. SCHWAB & EDELWEISS (2003), nos EUA, confirmaram pelo teste IHQ a presença de *L. monocytogenes* em sete placentas, provenientes de abortamento decorrente de listeriose gestacional.

*L. monocytogenes* pode causar, ainda, infecções localizadas, como conjuntivite, dermatite e lifadenite. Essas infecções podem dar origem a

complicações como: peritonite, pericardite, colédoco, cistite, hepatite, pleurite, abscesso esplênico, pericardite, osteomielite e endoftalmite. Pacientes com infecção localizada geralmente são portadores assintomáticos do patógeno (DOGANAY, 2003).

#### 2.4- Vias de transmissão de *L. monocytogenes*

Com exceção da listeriose neonatal, que é transmitida da mãe para o feto, as outras formas de listeriose são adquiridas pelo contato direto com animais doentes ou seus excrementos e pela inalação de poeira ou ingestão de alimentos contaminados (CASTRO, 1989).

A transmissão de *L. monocytogenes*. pode ocorrer tanto por contato direto quanto indireto, através de fontes contaminadas e pelas vias orais, oculares, cutânea, respiratória e urogenital. O microrganismo pode estar presente em secreções oculares, nasais e purulentas da epiderme e na urina, placenta de bovinos infectados e outros tecidos contaminados, fezes e sangue.

É provável que muitos casos de listeriose de origem alimentar não sejam diagnosticados devido ao prolongado período de incubação da doença, razão pela qual os enfermos podem não associar um alimento como o veículo de transmissão (ACHA & SZYERES, 2001).

Embora muitos casos de listeriose veiculados por alimentos não sejam diagnosticados, esta é considerada a principal forma de transmissão ao homem (MANTILLA, 2006).

A presença da bactéria no sêmen de um homem cuja esposa apresentava infecção genital sugere que em alguns casos, a transmissão pode ocorrer por via genital (ACHA & SZYERES, 2001). Já a listeriose neonatal é transmitida da mãe para o feto (ACHA & SZYERES, 2001).

A resistência da *L. monocytogenes* a fatores como pH, sua habilidade para multiplicar-se à temperatura de refrigeração e a alta resistência ao congelamento constituem um fator crítico na transmissão da bactéria,

principalmente através de alimentos de origem animal, cujos processos mais frequentes de conservação são a refrigeração e congelamento (VASQUEZ-BOLAND et al., 2001; FORSYTHE, 2002).

## 2.5 - Associação de *L. monocytogenes* com alimentos

Vários surtos de listeriose têm sido descritos pelo mundo (CHIARINI, 2007).

Na Europa e nos EUA diversos surtos de listeriose foram atribuídos ao consumo de leite pasteurizado e produtos de laticínio (TOBIA et al., 1997), vegetais crus, queijos de alta umidade (FARBER & PETERKIN, 1991) e produtos cárneos (CHIARINI, 2007).

Apesar da listeriose poder acometer qualquer pessoa, são mais susceptíveis os indivíduos mais jovens, os idosos e pacientes imunodeprimidos (MENA et al., 2004).

O primeiro caso de listeriose humana foi descrito em 1929 e desde então, tem sido comprovado a ocorrência da doença em todo o mundo (JAY, 2005). Embora não apresente alta incidência na maioria dos países, a listeriose humana mantém em alerta as autoridades de saúde, a indústria alimentícia e a população devido sua alta taxa de letalidade (BARBALHO et al., 2006, CHIARINI, 2007) que, em recém-nascidos é de 30% e em adultos 35%, sendo que aproximadamente 11% das mortes são observadas em indivíduos com menos de 40 anos, enquanto que a maioria dos óbitos ocorre em pacientes com idade superior aos 60 anos de idade (SÃO PAULO, 2008).

O primeiro surto relatado de listeriose no mundo, veiculado por alimentos ocorreu em 1979, nos Estados Unidos, quando 20 pacientes foram internados apresentando a doença, após o consumo de verduras contaminadas por *L. monocytogenes* (MCLAUHLIN et al., 2004).

Surtos continuaram a surgir entre 1980 e 1990 em outras partes do mundo, sempre associando a enfermidade ao consumo de alimentos de origem

animal ou vegetal, incluindo leite e derivados (LOUGUERCIO et al., 2001; McLAUHLIN et al., 2004; ARRUDA et al., 2007). Um dos surtos melhor documentados ocorreu em 1981, nas Províncias Marítimas do Canadá, onde foram constatados 41 casos, sendo 34 perinatais e sete em adultos, ocasionando 11 mortes. O veículo de transmissão foi uma salada de repolho cru ("cole slaw"), onde havia sido cultivado com esterco de ovelhas infectadas por *L. monocytogenes*, na qual a bactéria foi isolada (SCHLECH et al., 1983).

Um surto de listeriose por *L. monocytogenes* 4b ocorreu em 1983, Boston, Massachussets, afetando 49 indivíduos, sendo 42 adultos imunossuprimidos e sete crianças tendo determinado 14 óbitos. O surto foi atribuído ao consumo de leite pasteurizado submetido a tratamento térmico insuficiente (FLEMING et al., 1985).

Em 1985, em Los Angeles, Califórnia, ocorreu um surto de listeriose atingindo 67% da população de risco (idosos e imunodeprimidos), incluindo, gestantes. O alimento responsável foi um queijo macio tipo mexicano. *L. monocytogenes* 4b foi isolada dos pacientes, do alimento ingerido e de um manipulador na planta processadora do queijo, levando a suspeita de contaminação cruzada entre manipulador e produto. As investigações realizadas na indústria sugeriram a utilização de volumes de leite superiores à capacidade do pasteurizador, resultando em tratamento térmico insuficiente. Este surto resultou em 305 casos com 105 mortes (LINNAN et al., 1988).

Na parte ocidental da Suíça foi registrado surto da listeriose no homem, no período de 1983 a 1987. Esse surto compreendeu 122 casos com 34 óbitos (BILLE, 1990). O queijo tipo "Vacheun Mont d'Or", foi o veículo da bactéria nesse surto, uma vez que a *L. monocytogenes* 4b foi isolada da superfície do produto.

Um caso esporádico de listeriose materno-fetal foi relatado em 1986 em Ankara, na Turquia, a gestante consumiu carne de frango cozida, sem prévio reaquecimento, em uma salada armazenada por três dias em refrigerador. A infecção da mãe resultou no aborto de um feto de 23 semanas de vida e *L. monocytogenes* 4b foi isolada da carne de frango, do feto e do sangue materno (KERR et al., 1988).

Um surto de listeriose ocorreu em 1992 na França, com 279 casos, 63 mortes e 22 abortos, tendo sido identificada *L. monocytogenes* no alimento ingerido, língua de porco mal cozida (DEVER et al., 1993).

Na Suécia foi relatado um surto de listeriose associado a ingestão de truta arco-íris. Cepas de *L. monocytogenes* 1/2a pertencentes a um mesmo tipo clonal (genogrupo) foram isoladas de seis pacientes e dos alimentos suspeitos (Truta filetada ou defumada a frio) (ERICSSON et al., 1997).

Entre junho de 1998 a abril de 1999, foi relatado na Finlândia a ocorrência de um surto de listeriose em um hospital universitário veiculado por manteiga de leite contaminada com *L. monocytogenes* 3a. A maioria dos pacientes estavam internados no Hospital Universitário e era constituído de indivíduos imunocomprometidos. No Hospital era consumido um único tipo de manteiga, que também era utilizada em outros hospitais e no mercado a varejista (MAIJALA et al., 2001).

Um surto descrito em Paris em 2000, veiculado por língua de porco defumada, com o relato de 48 doentes e sete óbitos. O frigorífico retirou do comércio todos os seus produtos, após ter sido detectada a presença de *L. monocytogenes* em línguas, cabeças e diversos embutidos de carne (DOROZYNSKI, 2000).

Em 2000 foi descrito, na Carolina do Norte, EUA, listeriose veiculada por queijo tipo mexicano (BOGGS, et al., 2001). Foram afetados 12 pessoas sendo um homem imunodeprimido, de 70 anos de idade e os demais eram mulheres com idade média de 21 anos. Destas, dez eram gestantes no início da gestação e uma tinha um bebê de cinco meses de idade. Das mulheres, cinco tiveram natimortos, três partos prematuros e dois bebês se infectaram após o nascimento. A última mulher apresentou um quadro de meningite. Os sintomas apresentados pelos doentes foram febre (nove pacientes), frio (nove), dores de cabeça (nove), pescoço duro (cinco), vômitos (três) e fotofobia (dois). Cepas de *L. monocytogenes* 4b foram isoladas dos pacientes, do leite cru e do queijo (BOGGS et al., 2001).

Um surto de listeriose identificado em uma região do nordeste da Suíça durante um período de oito semanas em 2005, acometeu 10 pessoas. Eram oito pacientes imunodeprimidos, ocasionado três óbitos e duas mulheres grávidas que tiveram um aborto séptico. Todos os casos foram determinados por *L. monocytogenes* 1/2a e entrevistas com os pacientes indicaram a associação do queijo macio “tomme” como veículo. Fabricado e distribuído localmente, foi nestes queijos de fabricação e distribuição locais, foi identificada *L. monocytogenes* 1/2a tendo o mesmo sorovar sido detectado também na manteiga produzida na leiteira (BILLE et al., 2006).

*L. monocytogenes* está envolvida em surtos relacionados a alimentos, de origem animal, embora, no Brasil, em humanos, a doença seja pouco relatada no homem (CHIARINI, 2007).

A contaminação de alimentos com níveis acima de  $10^3$  UFC/g é considerada alta para a *L. monocytogenes*. Experimentos feitos com animais saudáveis indicaram que a ingestão de doses entre  $10^3$  e  $10^6$  UFC sejam suficientes pra desencadear a doença (MADDEN, 1992).

É considerado que todos os alimentos ingeridos pelos humanos estejam contaminados pela *L. monocytogenes*, que também pode estar presente em equipamentos e utensílios empregados pela indústria de processamento de alimentos (JEONG & FRANK, 1994;).

Convém ressaltar ainda a grande capacidade de *L. monocytogenes* formar biofilme, este fato que torna ainda mais preocupante a presença desse microrganismo na indústria de alimentos. Com base nesses aspectos, a OMS concluiu que a eliminação total de *L. monocytogenes* de todos os alimentos é impraticável, podendo mesmo ser impossível. A maior importância preocupação para a indústria de alimentos talvez seja o fato da *L. monocytogenes* poder sobreviver e se multiplicar em temperatura de refrigeração. Essa característica é relevante principalmente para os alimentos refrigerados prontos para consumo quando insuficientemente processados e/ou contaminados após o processamento (McCARTHY, 1997). Esses alimentos geralmente uma longa vida de prateleira sob refrigeração e que, geralmente, são consumidos sem serem reaquecidos

(TOMPKIM, 2002). A bactéria é eficientemente inativada por cozimento ou pasteurização e tratamentos térmicos são incluídos no processamento da maioria dos alimentos prontos para consumo (TOMPKIM, 2002). Conseqüentemente, a contaminação desses alimentos ocorre pós processamento.

*L. monocytogenes* é comumente isolada de vários nichos em ambientes de processamento como drenos, pisos, luvas, matéria-prima, e superfícies de equipamentos utilizados para produzir alimentos prontos para consumo e, como conseqüência da colonização, os nichos podem atuar como reservatório para a bactéria na planta de processamento e ser responsável pela contaminação posterior do alimento (TOMPKIM, 2002). De acordo com THOMPSON (2002), um nicho é o sitio dentro do ambiente de processamento em que a bactéria pode estabelecer-se e multiplicar-se.

Alguns autores relatam que cepas de *L. monocytogenes* podem persistir em uma planta de processamento mesmo após desinfecção, tornando-se membro da microbiota residente por meses ou anos (BERRANGS, 2002). Uma cepa é considerada persistente quando é repetidamente encontrada em uma planta de processamento (LUNDEN et al., 2003). Cepas persistentes podem ser mais resistentes a sanitizantes do que cepas não persistentes, o que contribui para a contaminação contínua da planta processadora (LUNDEN et al., 2003).

Existem contradições com relação às fontes mais importantes de *L. monocytogenes*

Segundo McLAUCHLIN, (1997), alimentos implicados em surtos de listeriose que causaram maior número de casos foram aqueles produtos que permitem a multiplicação da *L. monocytogenes* em elevado nível antes do consumo.

Segundo CHASSEIGNAUX et. al (2002), a freqüência de *L. monocytogenes* na carne crua, em geral, pode ultrapassar os 40%, dependendo do tipo de produto. A contaminação de meias-carcaças podem se dar a partir de fezes contendo *L. monocytogenes* ou a partir de contaminação no próprio ambiente de abate, de superfícies, equipamentos ou utensílios contaminados.

De acordo com TRÉMOULET et al. (2002), *L. monocytogenes* pode ser isolada superfícies de equipamentos e utensílios na linha de processamento de alimentos e pode sobreviver nessas superfícies por muitos meses formando biofilmes, uma estratégia adotada por muitas espécies bacterianas.

A contaminação de meias-carcaças pode se dar também pelos operários da indústria de alimentos, uma vez que esses podem se comportar como portadores inaparentes (KOSARK, et al. 1998). O grupo de trabalho em listeriose da OMS considerou que uma forma fundamental de transmissão da doença ao homem seja através de alimentos contaminados durante sua produção e processamento, podendo se dar por meio das mãos dos manipuladores (DESTRO & SERRANO, 1990).

A *Listeria* spp. é uma bactéria que pode ser isolada de meias-carcaças em etapas do abate, na medida em que animais doentes ou sadios podem veicular a bactéria principalmente através do intestino (FABER & PETERKIN, 1991). O isolamento da *Listeria* spp. em efluentes de matadouros também reforçam esta possibilidade (WATKINS & SLEATH, 1981). O congelamento, a desidratação superficial e o resfriamento não parecem afetar a sobrevivência da *Listeria* spp. na carne (FABER & PETERKIN, 1991).

No programa realizado pelo USDA-FSIS para verificar a ocorrência de *L. monocytogenes* em carne bovina crua, no período de 1987 a 1990, o microrganismo foi isolado de 122 (7,1%) das 1.726 amostras monitoradas (RYSER; MARTH, 1991). A incidência de *Listeria* spp. em produtos cárneos também foi demonstrada por TRUSCOTT e MCNAB, ao isolarem *Listeria* spp. em 45 das 50 amostras de carne bovina moída analisada no Canadá. Na França, LE GUILLOX et al. também demonstraram a ocorrência de *L. monocytogenes* em 4,9%, 21,2% e 19,8% das amostras avaliadas de carcaça bovina, carne moída e carne moída congelada respectivamente.

No estudo realizado por YUCEL et al. 2005 na Turquia, 146 amostras de carnes (bovina inteira, moída e de frango) cruas e cozidas, foram analisadas pela bacteriologia convencional à presença de *Listeria* spp. Destas, 79 amostras (54,

10%) apresentaram-se contaminadas por *Listeria* spp., sendo que *L. monocytogenes* foi isolada em nove das 79 amostras (6,16%).

De um total de 400 amostras, de carne bovina moída, FANTELLI & STEPHAN (2001) na Suíça detectaram 43 amostras de *L. monocytogenes* (10,75%), pela bacteriologia convencional.

Já em experimentos realizados por SILVA et al. (2004) foi isolado *Listeria* spp. em 100% das 41 amostras de lingüiças mistas do tipo frescal examinadas, sendo que a freqüência de *L. monocytogenes* foi de 29,3%.

De 63 amostras de carcaças de frango analisadas em Portugal, todas apresentavam-se contaminadas por *Listeria* spp., sendo que 26 amostras (41%) foram positivas para *L. monocytogenes* (ANTUNES et al., 2002)

De acordo com resultados obtidos por BERSOT et al. (2001) no estado de São Paulo, das 30 amostras de mortadela analisadas, 11(36,7%) foram positivas para *Listeria* spp., sendo oito (26,7%) para *L. monocytogenes*.

No trabalho desenvolvido por MENA et al. (2004), vários tipos alimentos foram analisados quanto à presença de *L. monocytogenes* em Portugal, através da bacteriologia convencional. Das 1035 amostras (leite, carne, peixes crus e alimentos termicamente processados e fermentados), 72 (7,0%) foram positivas. Das 17 amostras de carne bovina crua, 3 (17,7%) foram positivas.

KASNOWSKI (2004), em Niterói, isolou um total de 173 cepas de *Listeria* spp. de 30 amostras de carne bovina inteira e carne bovina moída. Destas, 72 (41,62%) foram originadas da carne inteira e 101 (58,38%) da carne moída, sendo isolado 45 cepas de *L. monocytogenes*.

No trabalho realizado por SAMADPOUR et al. (2006) de um total de 512 amostras de carne bovina analisada através da "Polymerase Chain Reaction" (PCR), 18 (3,5%) foram positivas para *L. monocytogenes*.

PICCHI et al., (1999), obteve percentuais de 96% de *Listeria* spp e 20% de *L. monocytogenes* a partir de amostras isoladas de 25 quartos dianteiros de bovinos.

VITAS et al. (2004) investigaram a presença de *Listeria* spp. em um total de 3.685 amostras no Norte da Espanha. As amostras analisadas incluíam

produtos crus (carnes, leite e frango) e processados (carne curada e cozida, vegetais congelados e salmão defumado). A maior ocorrência de *Listeria* spp.. foi verificada em amostras de carnes cruas de frango (76,3%), seguidas por amostras de carne bovina e suína (62,3%). Das 295 amostras de carnes bovinas e suínas cruas, 103 (34,9%) foram positivas para *L. monocytogenes*.

LAWRENCE, (1994), analisando carnes “in natura” e cozidas de frango, pelo método bacteriológico convencional, e utilizando a técnica de PCR como confirmativo, utilizando o par de “primer” U1/LI1, detectou *Listeria* spp. em um percentual de 46% de um total de 79 amostras de carnes “in natura” e 29% de um total de 173 amostras de carnes cozidas. Ao analisar *L. monocytogenes* nas mesmas amostras, utilizando o par de “primer” LM1/LM2 detectou 26% em carnes “in natura” e 15% em carnes cozidas.

SAKATE et al. (2004), estudou a distribuição de *L. monocytogenes* nas diversas etapas de abate de um frigorífico bovino no estado de São Paulo através da PCR, desde a sangria até os cortes prontos para comercialização. Um total de 516 amostras, sendo elas ambientais, de utensílios, equipamentos, carcaças e cortes cárneos. *L. monocytogenes* foi detectada em 27 amostras (5,23%) e somente três eram provenientes da área suja (duas carcaças após sangria e uma de piso da área de sangria). As demais eram de ambientes de câmara-fria, equipamentos da área de desossa e cortes cárneos.

## 2.6- Regulamentações sobre *L. monocytogenes* em alimentos

O governo dos EUA possui a legislação mais rígida, na qual a *L. monocytogenes* tem sido considerada como um adulterante e isso significa que, quando detectada a presença do patógeno em um alimento o mesmo é considerado adulterado e, portanto sujeito a *recall* e/ou apreensão. É a política conhecida como “tolerância zero” determinada pela ausência do patógeno em 25g de amostra (JAY, 2000).

A legislação da Comunidade Européia sobre leite e derivados determina o padrão de “tolerância zero” para queijos moles e ausência de *L. monocytogenes* em 1 g dos outros produtos. Na Grã Bretanha determinou-se padrões para alguns alimentos produtos para o consumo estabelecendo grupos baseados no número de *L. monocytogenes* presentes. Quando o microrganismo não é detectado em 25g do alimento é considerado satisfatório; entre  $10^2$  e  $10^3$  UFC/25g do alimento é considerado insatisfatório e acima de 103UFC/25g do alimento é considerado inaceitável (JAY, 2005).

O Canadá adotou uma política regulatória baseada na redução do risco de contaminação, já que o microrganismo nem sempre será erradicado do produto final ou do meio ambiente. Essa política está direcionada para a inspeção e o cumprimento de ações principalmente para alimentos prontos para consumo que possam permitir ou favorecer o crescimento de *L. monocytogenes*. Para tanto três categorias foram estabelecidas, incluindo na categoria I alimentos geralmente relacionados a surtos e com alta prioridade na inspeção e rigor nas ações, como recolhimento e alerta público; na categoria II estão os alimentos com vida de prateleira maior do que 10 dias, os quais se detecta a presença de *L. monocytogenes*, estão recolhidos e considerada a possibilidade de alerta público e na categoria III estão aqueles alimentos com vida de prateleira menor do que 10 dias (FARBER & HARWIG, 1996).

No Brasil, a legislação brasileira não prevê limites de tolerância para a presença do microrganismo em carnes e produtos cárneos e a Resolução da Diretoria Colegiada, da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA-RDC NO. 12/2001) aprovou o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para alimentos, e somente estabeleceu a pesquisa de *L. monocytogenes* (ausência em 25g) para quilos de média a muito alta de umidade (BRASIL, 2001).

São considerados produtos em condições sanitárias insatisfatórias aqueles cujos resultados analíticos estão acima dos limites estabelecidos para amostras indicativas ou amostra representativa, ou aqueles cujos resultados analíticos demonstram a presença ou a quantificação de outros microrganismos patogênicos ou toxinas que representem riscos à saúde do consumidor. Dada a

freqüência de *L. monocytogenes* em carnes e produtos cárneos, sua detecção deveria ser levada em consideração na avaliação do risco de transmissão da listeriose para o ser humano a partir de produtos cárneos.

A Comissão Internacional em Especificações Microbiológicas para Alimentos (“International Commission on Microbiological Specifications for Foods” – “ICMSF”) concluiu que, se esse microrganismo não exceder 100 UFC/g de alimento, este pode ser considerado aceitável para indivíduos que fazem parte do grupo de risco. (ICMSF, 2003).

## 2.7- Métodos de detecção do gênero *Listeria* e *L. monocytogenes*

Os métodos clássicos para isolamento de *Listeria* spp.. a partir de alimentos são complexos e demorados, sendo geralmente necessários 5 a 7 dias para obter o resultado (GERMANO & GERMANO, 2008), envolvendo procedimentos de pré-enriquecimento e/ou enriquecimento, semeadura em meios seletivos diferenciais e caracterização bioquímica e sorológica.

Nos últimos anos, inúmeros métodos de detecção de *Listeria* spp. em alimentos foram desenvolvidos, sendo mais amplamente difundidos e utilizados o método da United States Food and Drug Administration (FDA), usualmente aplicado a análise de leite e produtos lácteos e o método do United States Department of Agriculture (USDA), usualmente aplicado na análise de carne, produtos cárneos e amostras de superfícies. No método da FDA é utilizado o caldo de enriquecimento para *Listeria* (LEB) a 30°C/ 24 e 48h, semeadura de superfície no Agar Oxford (OXA) a 35°C e 48h e ágar Cloreto de Lítio Feniletanol Moxalactam (LPM) a 30°C/24h e 48h. O método da USDA utiliza enriquecimento primário em Caldo Universidade de Vermont (UVM) a 30°C por 24h, seguido do enriquecimento secundário em caldo Fraser a 35°C/24h e 48h e semeadura de superfície no ágar Oxford Modificado (MOX) a 35°C/24h e 48h (SILVA et al., 1997)

Existe também o método do Health Protection Branch (HPB) do Canadá, utilizado para todos os tipos de alimentos e amostras ambientais. Consiste em

enriquecimento primário em Caldo LEB a 30°C/24h, enriquecimento secundário em Caldo Fraser a 35°C/24 e 48h e semeadura de superfície no Ágar Oxford (OXA) a 35°C/24 e 48h Ágar Cloreto de Lítio Feniletanol Moxalactam (LPM) a 30°C/24 e 48h, Agar Oxford Modificado (MOX) a 35°C/24 e 48h e Agar Palcam a 35°C/24 e 48h (WARBURTON et al., 1991).

Os métodos descritos acima avaliam apenas a presença ou ausência de *Listeria* spp. nas amostras. Para estimar o número de microrganismos, utiliza-se a técnica do Número Mais Provável (NMP). Embora não seja uma determinação precisa, ela consegue estimar baixas concentrações de bactérias que são dificilmente detectáveis pelos métodos diretos de contagem. Esta técnica é comumente utilizada para determinação de coliformes em alimentos (PEELER et al., 1992).

O emprego da técnica do NMP aumenta a complexidade da análise em pelo menos nove vezes (para um NMP de 3 tubos), mas é a única forma efetiva de obter dados quantitativos quando os números de *L. monocytogenes* são inferiores a 50 UFC/g. Este método também utiliza caldos de enriquecimento primários e secundários, seguido de semeadura em meios sólidos seletivos por aqueles recomendados pelo FDA, USDA e HPB (BUCHANAN, 1990).

Muitas vezes a obtenção de resultados negativos não reflete a realidade, pois o microrganismo pode apresentar-se injuriado, não conseguindo se recuperar no caldo de enriquecimento, ou pode estar em números inferiores microbiota acompanhante, e com isto não ser detectado. Sabe-se também que o meio de enriquecimento empregado pode facilitar a multiplicação de *L. innocua* em detrimento a *L. monocytogenes* (BRUHN et al., 2005).

Diversos autores afirmam que métodos tradicionais de pesquisa de *L. monocytogenes* são demorados e pouco específicos, além de não permitir a identificação do patógeno quando em baixas contagens na amostra. Embora não possam ser totalmente abolidos, os métodos convencionais vêm sendo cada vez mais substituídos pelas técnicas moleculares, face ao seu grau de especificidade e rapidez (SOMER & KASHI, 2003, AGUADO et al., 2004).

Os métodos clássicos para detecção, contagem e identificação de *Listeria* são efetivos porém complexos e lentos para aplicação em programas de controle de qualidade microbiológica nas indústrias de alimentos. Portanto, torna-se claro a necessidade de uma metodologia mais adequada para detecção e isolamento de *L. monocytogenes* nos alimentos, a fim de se obter resultados rápidos e seguros (CASAROTTI et al., 1994).

As indústrias de alimentos precisam detectar *Listeria* com rapidez necessária para poder implementar e avaliar programas preventivos de qualidade microbiológica e atender à legislação vigente. A presença de qualquer espécie de *Listeria* nos alimentos e superfícies envolvidas com o processamento de alimentos é uma possível indicação de que cepas patogênicas de *L. monocytogenes* possam estar envolvidas (BARBALHO, 2002).

Várias técnicas tem sido propostas e avaliadas para simplificar e melhorar a precisão dos resultados de identificação desse microrganismo.

O Imunoensaio Visual para *Listeria* (LISVIA – TECRA) ® é uma prova de triagem, rápida e específica para detecção de *Listeria* spp.. em amostras de alimentos, equipamentos, utensílios e ambiente industrial, após o enriquecimento seletivo.

Utiliza anticorpos policlonais específicos para *Listeria*, o que possibilita a detecção específica de todas espécies existentes. Tecra LISVIA é um teste de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) no formato de configuração “sanduíche”, reação antígeno – anticorpo onde a leitura do resultado é feito visualmente. Caso haja desenvolvimento de formação de cor verde, o resultado será positivo, e se incolor, o resultado é negativo. O tempo de duração total, incluindo o pré-enriquecimento é de 49 horas.

O API *Listeria* (BIO MÉRIEUX®) é um sistema de identificação de *Listeria*, utilizando testes miniaturizados e padronizados, sendo possível diferenciar todas as espécies de *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. ivanovii* e *L. welshimeri*. O API *Listeria* possui 10 microtubos contendo substratos desidratados para diversas provas bioquímicas, incluindo testes enzimáticos e fermentação de açúcares. Os resultados das reações são obtidos

18-24h de incubação a 35°C – 37°C, identificando a espécie. A interpretação dos resultados deve ser feito por um profissional capacitado, levando-se em consideração os resultados da análise das colônias, análise microscópica e reação de Gram. Apesar de ser um teste rápido, há relatos de falso-positivos.

Para a escolha de um método a ser adotado deve-se levar em consideração alguns parâmetros entre eles a adequação do método ao tipo de alimento que irá ser analisado, a existência de um reconhecimento internacional, a facilidade de emprego e confiabilidade do resultado, o custo e a especialização da mão de obra requerida.

Usualmente no Brasil, a escolha de métodos microbiológicos é baseada nas recomendações do *Food and Drugs Administration* (FDA), através do *Bacteriological Analytical Manual*, do *Food Safety and Inspection Services* (FSIS) do Departamento de Agricultura (USDA) em seu “Microbiology Laboratory Handbook”, ou ainda em métodos preconizados pela *International Organization for Standardization* (ISO). Há ainda os métodos apresentados no “Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods” e o “Standard Methods for the Examination of Dairy Products”, ambos publicados pela “American Public Health Association” e aqueles reconhecidos pela AOAC Internacional.

Para as análises que visam atender as especificações da Resolução 12 (BRASIL, 2001) podem-se empregar diferentes métodos, conforme apresentado no item 5. Estes métodos podem ser os das referências citadas ou podem-se seguir outras metodologias, desde que sejam “metodologias internacionalmente reconhecidas”.

A literatura refere vários experimentos realizados com emprego das técnicas de PCR, na pesquisa de patógenos veiculados por alimentos. As vantagens dessa técnica estão associadas ao alto grau de reprodutibilidade, alta sensibilidade, especificidade e custo relativamente baixo. A desvantagem consiste em detectar também células mortas, comuns em alimentos processados, que é contornado pela realização do enriquecimento ou pré-enriquecimento prévio das amostras para o isolamento do DNA e amplificação.

Entretanto, quando aplicado em amostras de alimentos, pode sofrer inibição ou sua sensibilidade ser reduzida.

Alguns autores vêm descrevendo que a detecção direta de *L. monocytogenes* por PCR de alimentos como carnes, pode ser limitada pela presença de inibidores da reação de PCR, ácidos nucleicos de outras bactérias, números baixo de microrganismos nos alimentos e pela própria natureza do alimento (DUFFY et al., 1999; GOLSTEYN et al., 1991).

Para superar esse problema, uma variedade de tratamentos têm sido propostos para a extração do DNA, além de introduzir uma fase de pré-enriquecimento. Esse efeito inibidor dos alimentos sobre a amplificação pode ser minimizado pela utilização de uma fase de pré-enriquecimento, que também melhora a sensibilidade. Como citado anteriormente, o pré-enriquecimento além de evitar a inibição da amplificação pode melhorar a sensibilidade.

Um período de enriquecimento de 24h é importante para assegurar a identificação de bacteris viáveis e evitar resultados falsos negativos, especialmente quando o número de bactérias a serem detectadas é baixo (BEUMER, 2003).

JONES et al. (1993) utilizaram o PCR e a hibridização do produto amplificado para detectar *Salmonella* spp. em ostras. Os resultados demonstraram um limite de detecção de 40 células por grama sem pré-enriquecimento. BEJ et al. (1994) também utilizaram o PCR para detectar *Salmonella* spp. em ostras, utilizando um passo de pré-enriquecimento para aumentar a sensibilidade. O limite de detecção caiu para 1 a 10 células, mostrando a importância do pré-enriquecimento para as amostras de alimentos. BURKHALTER et al. (1995) analisaram amostras de ovos artificialmente contaminadas antes e depois do pré-enriquecimento e verificaram que o limite de detecção caiu para 1 a 10 UFC/ovo depois do pré-enriquecimento. JITRAPAKDEE et al. (1995) analisaram amostras de carne de frango artificialmente contaminadas em vários tempos de pré-enriquecimento variando de 0 a 10 horas, e verificaram que somente amostras com grande inóculo foram detectadas sem pré-enriquecimento.

ARRUDA (2006) utilizou a técnica da PCR para confirmação da espécie em cepas, identificadas presuntivamente como *L. monocytogenes*. Foram estudadas 38 cepas, sendo 31 provenientes de cortes cárneos bovinos. Destas, apenas 35% foram confirmadas pela técnica da PCR.

RIJPEENS et al. (1998), analisando quatro cepas identificadas por métodos bacteriológicos como *L. monocytogenes*, constataram que nenhum confirmou ser o patógeno, pela técnica da PCR.

PIATTI et al. (2004), pesquisando *L. monocytogenes* em amostras de caprinos com sintomatologia nervosa no Brasil, utilizaram a técnica PCR para identificação da presença do gene listeriolisina de 9 cepas, de *L. monocytogenes* isoladas de cérebro, fígado, pulmão e rins de caprinos com sintomatologia nervosa. Apenas uma amostra, a proveniente do cérebro de um dos animais, foi identificada com *L. monocytogenes*.

HOLKO et al. (2002), utilizaram a técnica da PCR para reconhecimento do gene *prfA* em cepas isoladas de leite e derivados, sendo supostamente identificadas como *L. monocytogenes* pela bacteriologia convencional. Foram analisadas 42 cepas classificadas como *L. monocytogenes*, e destas apenas duas foram confirmadas pelo método PCR. As demais foram identificadas com *L. innocua*. Os autores destacaram os grandes riscos de interpretação equivocada de cepas como *L. monocytogenes*, tendo em vista que a espécie *L. innocua* está, frequentemente, presente nos alimentos.

Todos os autores citados acima, concluíram que testes e detecção utilizando a técnica PCR são mais específicos comparados com métodos bacteriológicos, os quais estão mais sujeitos a erros de interpretação e também ao treinamento do bacteriologista.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Determinar as frequências de ocorrência de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em meias-carcaças quentes e resfriadas, cortes cárneos resfriados embalados a vácuo e não embalados, em ambiente e equipamentos de matadouros-frigoríficos.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Determinar a distribuição de *L. monocytogenes* e *Listeria* spp. em amostras de diferentes sítios (roletes da desossa, esteiras da desossa, ralos da desossa, evaporadores da desossa, cortes cárneos embalados a vácuo e não embalados, ralos e evaporadores de câmaras frias, meias-carcaças quentes e frias, ralo da sala de matança e roletes de pele) em matadouros-frigoríficos;
- Determinar a distribuição de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em alguns Estados brasileiros e em matadouros-frigoríficos localizados em áreas geográficas diversas;
- Avaliar a aplicabilidade de dois pares de primers para detecção de *L. monocytogenes* em amostras de diferentes fontes (*swabs* de meias-carcaças e cortes não embalados, ambiente e cortes cárneos embalados a vácuo) pela técnica de PCR.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Amostragem

As amostras foram colhidas em 25 unidades de cinco matadouros-frigoríficos habilitados para comércio internacional, localizados em sete Estados, totalizando 360 amostras. Deste total, 240 eram de ambiente e equipamentos, 60 de superfície de meias-carcaças, 60 de cortes cárneos embalados e não embalados a vácuo. Dentre as 240 de ambiente, incluíram-se 120 das salas de desossa, sendo 30 de esteiras, 30 de roletes de esteiras, 30 de evaporadores e 30 de ralos, 60 de câmaras-frias, sendo 30 de ralos e 30 de evaporadores, nas salas de matança, foram 30 de ralos e 30 de roletes. Das 60 de superfície de meias-carcaças, estão inclusas 30 de meias-carcaças quentes e 30 das resfriadas, dos cortes cárneos, 30 decortes embalados a vácuo e 30 dos não embalados a vácuo..

Do total da amostragem, 153 (42,50%) eram de matadouros-frigoríficos localizados em São Paulo, 71 (19,72%) do Mato Grosso do Sul, 64 (17,78%) de Goiás, 50 (13,89%) de Mato Grosso, 11 (3,06%) da Bahia, sete (1,89%) do Pará e quatro (1,11%) de Minas Gerais.

As indústrias colheram e encaminharam as amostras ao laboratório de Biologia Molecular do Centro de Pesquisas em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (CPA/EV/UFG) para monitoria. Essas amostras foram colhidas no período de novembro de 2006 a fevereiro de 2008.

As amostras foram colhidas em cinco estabelecimentos, do Matadouro-frigorífico A foram analisadas 175 amostras, 70 do B, 61 do C, 30 do D e 15 do E.

As amostras de ambiente e equipamentos, superfície de meias-carcaças e cortes cárneos não embalados foram colhidas com “swabs” umedecidos em solução salina a 0,85% (pH 7,0), através de esfregaços em áreas de 10 a 100 cm<sup>2</sup>, dependendo da superfície disponível. Uma vez identificadas as

amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo em escamas e encaminhadas ao laboratório.

Os cortes cárneos embalados a vácuo foram igualmente acondicionados em caixas isotérmicas, observando-se a integridade física das embalagens e a manutenção de baixas temperaturas dos cortes.

Como controles positivos das reações de PCR foram utilizados amostras de DNA genômico extraído a partir de cepas de *L. monocytogenes* (4b) isoladas de salsichas, as quais foram previamente confirmadas pela FIOCRUZ, e gentilmente cedidas para realização desse trabalho.

#### 4.2 Preparação das amostras para amplificação

As amostras foram pré-enriquecidas em 20 mL do caldo soja trypticaseína (Casoy), utilizando 2 mL da amostra ressuspensa em solução salina a 0,85% e homogeneizadas. Posteriormente as amostras foram incubadas a 28°C/18h em estufa B.O.D. Após este período, os tubos foram homogeneizados e 2 mL da cultura foram centrifugados a 10000 rpm/10 min. Posteriormente foram descartados o sobrenadante e adicionado 500µL de T.E (pH 8,0) e 50µL de lisozima. Em seguida as amostras foram homogeneizadas e incubadas em banho-maria a 37°C por 24h. Dos cortes cárneos foram realizados os mesmos procedimentos, utilizando 2 mL do exsudato para realizar o cultivo.

A extração de DNA foi realizada de acordo com a metodologia proposta por van SOOLINGEN et al. (1991). O "pellet obtido foi seco ao ar, e hidratado com 100µL de tampão T.E (10mM tris; 1 mM EDTA, pH 8,0) e armazenado a -20°C.

#### 4.3 Verificação da pureza e determinação da concentração do DNA

Objetivando a avaliação da integridade do DNA isolado para determinação da concentração, 2µg da solução de DNA de cada amostra foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE (Tris Boreto Edta) (0,5X), a 80V;50min. Os géis foram corados com brometo de etídeo (0.6 µg/mL) e a documentação fotográfica no sistema Gel Doc XR, utilizando o software Quantity One. Algumas amostras foram verificadas a necessidade de se fazer uma diluição (100ng/5µL) em tampão T.E, concentração utilizada nas ampliações. Após a diluição foram feitas as ampliações com cada par de “primer” específico para *Listeria monocytogenes*.

#### 4.4 Amplificação

Foram utilizados os pares de “primers” U1/LI1 (LAWRENCE, 1994) para *Listeria* spp., LM1/LM2 (LAWRENCE, 1994) e LL5/LL6 (GOLSTEYN THOMAS et al., 1991) para *L. monocytogenes*. Os “primers” U1 (5' CAG CMGCCGCGGTAATWC 3'), e LI1 (5' CTCCATAAAGGTGACCCT 3'), se localizam nas posições 519-536 e 1457-1440, respectivamente, da subunidade 16S do RNAr de *Listeria* spp. Deste par obtém-se um “amplicon” de 938 pares de base (pb). Os “primers” LM1 (5' CCTAAGACGCCAATCGAA 3') e LM2 (5' AAGCGCTTGCAACTGCTC 3') são específicos para *L. monocytogenes* e originam um “amplicom” de 702 (pb).

Os “primers” LL5 (5' AACCTATCCAGGTGCTC 3') e LL6 (5' CTGTAAGCCATTTTCGTC 3') encontrando-se localizados nas posições 372-389 e 622-639, respectivamente, e geram um “amplicom” de 268pb.

Nas ampliações com os pares U1/LI1 e LM1 e LM2, as soluções de amplificação foram submetidas à desnaturação inicial a 95°C/120seg, seguindo-se 24 ciclos de desnaturação a 94°C/80s, anelamento a 50°C/90s, extensão a 72°C/120s, com extensão final a 72°C/10 min, descrito no QUADRO 1.

Com o par LL5/L6, as soluções de amplificação foram submetidas à desnaturação inicial a 95°C/180s, seguindo-se 30 ciclos de desnaturação a

94°C/60s, anelamento a 55°C/60s e extensão a 72°C/120s, com extensão final de 72°C/5min, descrito no QUADRO 1.

As soluções amplificadas foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em 0,5X TBE, com corrida 130 V/40 min. O marcador de padrão de peso molecular (PM) utilizado foi 100 pb DNA *Ladder* (Invitrogen®). Os géis foram corados com brometo de etídeo (0.6 µg/mL) e a documentação fotográfica no sistema Gel Doc XR, utilizando o software Quantity One.

QUADRO 1- Misturas das reações de PCR e concentrações finais dos reagentes, segundo os pares de “primers” utilizados para amplificação de *Listeria monocytogenes* e *Listeria* spp. Goiânia, 2008

REAGENTES	PARES DE PRIMERS		
	U1/LI1	LM1/LM2	LL5/LL6
REFERÊNCIA	LAWRENCE, 1994	LAWRENCE, 1994	GOLSTEYN THOMAS et al. (1991)
AMPLICON (pb)	938	702	267
TAMPÃO 10X 100MM TRIS-HCL PH 8.3 500MM KCL	5µL	5µL	5µL
DNA	100 ng	100 ng	100 ng
“PRIMERS”	1µM	1µM	1µM
dNTP	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
MgCL <sub>2</sub>	1,5 mM	1,5 mM	2 Mm
TAQ DNA POLIMERASE	2U	2U	2U
<b>VOLUME TOTAL</b>	50µL	50µL	50µL

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Distribuição de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* nas diferentes fontes

#### 5.1.1 *Listeria* spp.

A Tabela 1 apresenta a distribuição de *Listeria* spp. nas fontes analisadas pela técnica de PCR após o enriquecimento a 28°C/18h em caldo soja trypticase, enquanto que nas Figuras 1 e 2 podem ser observados os produtos de amplificação com os pares utilizados para gênero e espécie.

Foram obtidas 71/360 (19,72%) amostras positivas e 289/360 (80,28%) negativas no total da amostragem.

Considerando as fontes de detecção, em sala de desossa, 28/120 (23,33%) foram positivas e 92/120 (76,67%) negativas. As frequências de ocorrência de *Listeria* spp. nos sítios analisados na sala de desossa foram de 08/30 (26,67%) em ralos, 06/30 (20%) em evaporadores, 08/30 (26,67%) em esteiras e 06/30 (20%) em roletes de esteiras. Amostras negativas foram observadas em 22/30 (73,33%) ralos, 24/30 (80%) evaporadores, 22/30 (73,33%) esteiras e 24/30 (80%) roletes de esteiras.

Em cortes cárneos foram detectados 09/60 (15,%) positivos e 51/60 (85,%) negativos. Destes, 05/30 (16,67%) e 04/30 (13,33%) cortes sem embalar e embalados a vácuo, respectivamente, foram positivos, ao passo que 25/30 (73,33%) e 26/30 (86,67%) amostras forma negativas, na mesma ordem.

Em câmaras-frias, 14/60 (23,33%) foram positivas e 46/60 (76,67%) negativas, obtendo-se igualmente 07/30 (23,33%) amostras positivas em ralos e evaporadores e 23/30 (76,67%) negativas nos dois sítios.

Das meias-carcaças, 14/60 (23,33%) e 46/60 (66,67%) foram positivas e negativas, respectivamente. Em meias-carcaças quentes, 10/30 (33,33%) foram positivas e 20/30 (66,67%) negativas, enquanto que 04/30 (13,33%) resfriadas foram positivas e 26/30 (86,67%) negativas.

Em sala de matança, 06/60 (10%) amostras foram positivas e 54/60 (90%) negativas. Considerando os sítios desta fonte, foram detectadas 02/30 (6,67%) ralos positivos e 04/30 (13,33%) roletes de pele. Por outro lado, obtiveram-se 28/30 (93,33%) negativas em ralos e 02/30 (86,67%) negativas em roletes de pele.

Das 71 amostras positivas para *Listeria* spp. detectadas no total da amostragem, pode ser observado em ANEXO-QUADRO 1-5, que 18 foram positivas apenas para o gênero. Destas, nove foram identificadas em salas de desossa (duas em roletes, três em ralos, duas nas esteiras e duas nos evaporadores), uma em cortes cárneos embalados a vácuo, duas em evaporadores de câmaras-frias e seis de meias-carcaças, sendo cinco meias-carcaças quentes e uma resfriada.

TABELA 1 – Distribuição de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em amostras de matadouros-frigoríficos brasileiros no período de 2006 a 2008, segundo as fontes de detecção, através da técnica de PCR. Goiânia, 2008

FONTES	<i>Listeria</i> spp.				<i>L. monocytogenes</i>			
	(+)		(-)		(+)		(-)	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<b>SALAS DE DESOSSA</b>	<b>28/120</b>	<b>23,33</b>	<b>92/120</b>	<b>76,67</b>	<b>19/120</b>	<b>15,83</b>	<b>101/120</b>	<b>84,17</b>
RALOS	08/30	26,67	22/30	73,33	05/30	16,67	25/30	83,33
EVAPORADORES	06/30	20,00	24/30	80,00	04/30	13,33	26/30	86,67
ESTEIRAS	08/30	26,67	22/30	73,33	06/30	20,00	24/30	80,00
ROLETES DE ESTEIRA	06/30	20,00	24/30	80,00	04/30	13,33	26/30	86,67
<b>CORTES CÂRNEOS</b>	<b>09/60</b>	<b>15,00</b>	<b>51/60</b>	<b>85,00</b>	<b>08/60</b>	<b>13,33</b>	<b>52/60</b>	<b>86,67</b>
SEM EMBALAR	05/30	16,67	25/30	83,33	04/30	13,33	26/30	86,67
EMBALADOS A VÁCUO	04/30	13,33	26/30	86,67	04/30	13,33	26/30	86,67
<b>CAMARAS-FRIAS</b>	<b>14/60</b>	<b>23,33</b>	<b>46/60</b>	<b>76,67</b>	<b>12/60</b>	<b>20,00</b>	<b>48/60</b>	<b>80,00</b>
RALOS	07/30	23,33	23/30	76,67	07/30	23,33	23/30	76,67
EVAPORADORES	07/30	23,33	23/30	76,67	05/30	16,67	25/30	83,33
<b>MEIAS-CARCAÇAS</b>	<b>14/60</b>	<b>23,33</b>	<b>46/60</b>	<b>66,67</b>	<b>08/60</b>	<b>13,33</b>	<b>52/60</b>	<b>86,67</b>
QUENTES	10/30	33,33	20/30	66,67	05/30	16,67	25/30	83,33
RESFRIADAS	04/30	13,33	26/30	86,67	03/30	10,00	27/30	90,00
<b>SALAS DE MATANÇA</b>	<b>06/60</b>	<b>10,00</b>	<b>54/60</b>	<b>90,00</b>	<b>06/60</b>	<b>10,00</b>	<b>54/60</b>	<b>90,00</b>
RALOS	02/30	6,67	28/30	93,33	02/30	6,67	28/30	93,33
ROLETES DE PELE	04/30	13,33	26/30	86,67	04/30	13,33	26/30	86,67
<b>TOTAL</b>	<b>71/360</b>	<b>19,72</b>	<b>289/360</b>	<b>80,28</b>	<b>53/360</b>	<b>14,72</b>	<b>307/360</b>	<b>85,28</b>



FIGURA 1 - Eletroforese em gel de agarose a 1% de “amplicons” de *Listeria* spp. (938pb) e *L. monocytogenes* (702pb) obtidos com os pares de “primers” U1/LI1 e LM1/LM2, respectivamente. Canaletas 1 e 12: DNA “ladder” de 100pb; ***Listeria* spp.**: canaleta 2: controle positivo, canaletas 3 e 11: controles negativo e de reagentes, canaleta 4: amostra positiva. ***L. monocytogenes***: canaleta 5: controle positivo, canaletas 8 e 10: controles negativo e de reagentes, canaletas 6 e 7: amostras positivas, canaleta 9: amostra negativa.



FIGURA 2 - Eletroforese em gel de agarose a 2% de “amplicons” de *L. monocytogenes* (267pb) obtidos com o par de “primers” LL5/LL6. Canaletas 1 e 8: DNA “ladder” de 100pb; 2 e 7: controles negativos de reagentes e de amostra; 3 e 4: amostras negativas; 5: controle positivo; 6: amostra positiva.

### 5.1.2 *L. monocytogenes*

Na Tabela 1 encontram-se dispostos os resultados obtidos para *L. monocytogenes*, independente dos pares de “primers” utilizados para amplificação. No total da amostragem, 53/360 (14,72%) foram positivas e 307/360 (80,28%) negativas.

Considerando as fontes de detecção, em salas de desossa, 19/120 (15,83%) foram positivas e 101/120 (84,17%) negativas. Nos sítios amostrados nesta fonte, foram obtidas 05/30 (16,67%) positivas em ralos, 04/30 (13,33%) em evaporadores, 06/30 (20%) em esteiras e 04/30 (13,33%) em roletes de esteira. Por outro lado, 25/30 (73,33%), 26/30 (76,67%), 24/30 (80%) e 26/30 (76,67%) amostras de ralos, evaporadores, esteiras e roletes de esteiras, respectivamente, foram negativas.

Em cortes cárneos, 08/60 (13,33%) foram positivos e 52/60 (86,67%) negativos. Nos cortes sem embalar e nos embalados a vácuo verificaram-se, igualmente, 04/30 (13,33%) positivos e 26/30 (86,67%) negativos.

Em câmaras-frias foram observadas 12/60 (20%) amostras positivas e 48/60 (80%) negativas sendo que, em ralos 07/30 (23,33%) foram positivas e em evaporadores, 05/30 (16,67%). Nos mesmos sítios foram obtidos 23/30 (76,67%) e 25/30 (83,33%) negativas, nesta ordem.

Em meias-carcaças, 08/60 (13,33%) e 52/60 (86,67%) mostraram-se positivas e negativas, respectivamente. Destas, 05/30 (16,67%) quentes foram positivas e 25/30 (83,33%) negativas, enquanto que das resfriadas, 03/30 (10%) foram positivas e 27/30 (90%) negativas.

Em sala de matança, 06/60 (10%) foram positivas e 54/60 (90%) negativas. Das amostras de ralo, 02/30 (6,67%) foram positivas e 28/30 (93,33%) negativas. Em roletes de pele foram obtidas 04/30 (13,33%) positivas e 26/30 (86,67%) negativas.

## 5.2 Eficiência dos pares de “primers” utilizados para detecção de *L. monocytogenes* nas fontes em estudo

### 5.2.1 Par LM1/LM2

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos com os dois pares de “primers” utilizados para detecção de *L. monocytogenes* nas amostras positivas das diferentes fontes. Das 53 amostras positivas identificadas no presente trabalho, 49/53 (92,45%) foram detectadas com o par LM1/LM2.

Considerando os resultados obtidos nas fontes analisadas, em salas de desossa foram detectadas 18/19 (94,73%) amostras positivas. Destas, 05/05 (100%) de ralos, 03/04 (75%) de evaporadores, 06/06 (100%) de esteira e 04/04 (100%) de roletes de esteira foram detectados com este par. Dos oito cortes cárneos positivos, 07/08 (87,5%) foram detectados com este par, sendo 04/04 (100%) cortes cárneos não embalados e 03/04 (75%) embalados a vácuo. Em câmaras-frias foram detectadas 11/12 (91,67%) positivas, notando-se 06/07 (85,71%) positivas em ralos e 05/05 (100%) em evaporadores. Em meias-carcaças, 07/08 (87,5%) foram positivas, sendo 04/05 (80%) quentes e 03/03 (100%) resfriadas. Em sala de matança, 06/06 (100%) foram identificadas, sendo 02/02 (100%) de ralos e 04/04 (100%) de roletes de pele.

Dentre as 49 amostras positivas com o par LM1/LM2, 33 foram detectadas exclusivamente por ele. Estas compreenderam três de roletes de esteiras, quatro de ralos da desossa, cinco de esteiras da desossa, uma de evaporador, quatro de cortes sem embalar, uma de corte embalado a vácuo, duas de ralos de câmaras-frias, duas de evaporadores de câmaras-frias, quatro de meias-carcaças quentes e duas de resfriadas, duas de ralos de salas de matança e três de roletes de pele (ANEXO, QUADRO 1-5).

TABELA 2 – Distribuição das amostras positivas para *L. monocytogenes* nas diferentes fontes, segundo os pares de “primers” utilizados. Goiânia, 2008

FONTES	<i>L. monocytogenes</i>							
	LM1/LM2				LL5/LL6			
	(+)		(-)		(+)		(-)	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<b>SALAS DE DESOSSA</b>	<b>18/19<sup>1</sup></b>	<b>94,73</b>	<b>01/19</b>	<b>5,27</b>	<b>06/19</b>	<b>31,58</b>	<b>14/19</b>	<b>73,68</b>
RALOS	05/05 <sup>2</sup>	100,00	00/05	0,00	01/05	20,00	04/05	80,00
EVAPORADORES	03/04	75,00	01/04	25,00	03/04	75,00	01/04	25,00
ESTEIRAS	06/06	100,00	00/06	0,00	01/06	16,67	05/06	83,33
ROLETES DE ESTEIRA	04/04	100,00	00/05	0,00	01/05	20,00	04/05	80,00
<b>CORTES CÁRNEOS</b>	<b>07/08</b>	<b>87,50</b>	<b>01/08</b>	<b>12,50</b>	<b>03/08</b>	<b>37,50</b>	<b>05/08</b>	<b>62,50</b>
SEM EMBALAR	04/04	100,00	00/04	0,00	0/04	0,00	04/04	100,00
EMBALADOS A VÁCUO	03/04	75,00	01/04	25,00	03/04	75,00	01/04	25,00
<b>CÂMARAS-FRIAS</b>	<b>11/12</b>	<b>91,67</b>	<b>01/12</b>	<b>8,33</b>	<b>08/12</b>	<b>66,67</b>	<b>04/12</b>	<b>100,00</b>
RALOS	06/07	85,71	01/07	14,29	05/07	71,43	02/07	28,57
EVAPORADORES	05/05	100,00	00/05	0,00	03/05	60,00	02/02	100,00
<b>MEIAS-CARCAÇAS</b>	<b>07/08</b>	<b>87,50</b>	<b>01/08</b>	<b>12,50</b>	<b>02/08</b>	<b>25,00</b>	<b>06/08</b>	<b>75,00</b>
QUENTES	04/05	80,00	01/05	20,00	01/05	20,00	04/05	80,00
RESFRIADAS	03/03	100,00	00/03	0,00	01/03	33,33	02/03	66,67
<b>SALAS DE MATANÇA</b>	<b>06/06</b>	<b>100,00</b>	<b>00/06</b>	<b>0,00</b>	<b>01/06</b>	<b>16,67</b>	<b>05/06</b>	<b>83,33</b>
RALOS	02/02	100,00	00/02	0,00	0/02	0,00	02/02	100,00
ROLETES DE PELE	04/04	100,00	00/04	0,00	01/04	25,00	03/04	75,00
<b>TOTAL</b>	<b>49/53</b>	<b>92,45</b>	<b>04/53</b>	<b>7,55</b>	<b>20/53</b>	<b>37,03</b>	<b>34/53</b>	<b>62,97</b>

<sup>1</sup>Relação entre o número de amostras positivas detectado com o par de “primers” e o número total de positivas identificadas no trabalho, em cada fonte; <sup>2</sup>Relação entre o número de amostras positivas detectado com o par de “primers” e o número total de positivas identificado no trabalho, em cada sítio amostrado.

### 5.2.2 Par LL5/LL6

Na Tabela 2 ainda podem ser observados os resultados obtidos com o par LL5/LL6. Das 53 amostras positivas para *L. monocytogenes* identificadas no total da amostragem, este par permitiu a detecção de apenas 20/53 (37,73%).

As diferenças apresentadas nos resultados obtidos no total da amostragem com os dois pares aqui utilizados foram estatisticamente significativas.

Em sala de desossa, o par LL5/LL6 permitiu a detecção de 06/20 (30%) positivas. Nos sítios positivos desta fonte, foram detectadas 01/05 (20%) amostra de ralo, 03/04 (75%) de evaporadores, 01/06 (16,67%) de esteiras e 01/05 (20%) de roletes de esteira. Das positivas de cortes cárneos, foram identificadas 03/08 (37,5%), notando-se que foram detectadas 03/04 (75%) positivas em cortes embalados a vácuo e naqueles sem embalar nenhuma das positivas foi detectada. Em câmaras-frias, 08/12 (66,67%) positivas foram detectadas. Levando em conta as amostras positivas identificadas nos sítios desta fonte, com este par foram detectadas 05/07 (71,42%) em ralos e 03/05 (60%) em evaporadores. Das oito de meias-carcaças positivas deste trabalho, 02/08 (25%) foram detectadas, ressaltando-se a identificação de 01/02 (50%) quente e 01/02 (50%) resfriada dentre as positivas. Em sala de matança, 01/06 (16,67%) foi positiva com este par. Das positivas identificadas nos sítios desta fonte, foi detectada apenas 01/04 (25%) em roletes de pele, sendo as de ralos negativas.

Dentre as 20 amostras positivas com o par LL5/LL6, somente quatro foram detectadas unicamente com seu uso, sendo uma de evaporador da desossa, uma de corte cárneo embalado a vácuo, uma de ralo de câmara-fria e uma de meia-carcaça quente, conforme ANEXO, QUADROS 1-5.

Considerando as 53 amostras positivas para *L. monocytogenes* identificadas neste trabalho, apenas 16 foram detectadas simultaneamente pelos dois pares de “primers” aqui utilizados, sendo cinco de salas de desossa, duas de cortes cárneos, sete de câmaras-frias, uma de meias-carcaças e uma de sala de matança ANEXO, QUADROS 1-5.

### 5.3 Distribuição de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* nos matadouros-frigoríficos de origem das amostras

#### 5.3.1 *Listeria* spp.

As frequências de ocorrência de *Listeria* spp. segundo os estabelecimentos de procedência das amostras e as fontes em estudo, podem ser verificadas na Tabela 3. Considerando as frequências de ocorrência de *Listeria* spp. no total analisado por estabelecimento, observa-se na Tabela 3 que 34/175 (19,43%) amostras do estabelecimento A, 14/79 (17,72%) do B, 14/61 (22,95%) do C, 06/30 (20%) do D e 03/15 (20%) do E, foram positivas.

Considerando as amostras do matadouro-frigorífico, *Listeria* spp. foi detectada em 15/60 (25%) amostras de salas de desossa, 06/33 (18,18%) cortes cárneos, 05/27 (18,52%) de câmara-fria, 06/28 (21,43%) em meias-carcaças e 02/27 (7,41%) na salas de matança.

Em relação aos sítios amostrados nas cinco fontes em estudo deste estabelecimento, naqueles de salas de desossa foram detectados 05/20 (25%) em roletes, 02/11 (18,18%) nas esteiras, 05/15 (33,33%) nos ralos e três nos evaporadores 03/14 (21,43%). Em cortes cárneos, das seis positivas 03/11 (27,27%) foram identificados nos não embalados e 03/22 (13,63%) nos embalados a vácuo. Em câmaras-frias, foram identificados 04/13 (30,77%) positivas em ralos e apenas uma nos evaporadores 01/14 (7,14%), enquanto que as positivas de meias-carcaças foram seis, 03/17 (17,65%) em meias-carcaças quentes e 03/11 (27,27%) em resfriadas. Em salas de matança, foram obtidas duas amostras positivas, apenas de ralos 02/23 (8,69%), não tendo sido detectada amostra positiva em roletes de pele.

No matadouro-frigorífico B, amostras positivas para *Listeria* spp. foram identificadas, sendo que, 06/32 (18,75%) são da salas de desossa, 05/23 (21,73%) em câmaras-frias e 03/14 (21,42%) em meias-carcaças. Não foram analisadas amostras de sala de matança neste estabelecimento.

TABELA 3 – Distribuição de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em amostras de diferentes matadouros-frigoríficos brasileiros, segundo fontes e sítios analisados. Goiânia, 2008

FONTES	A		B				C					
	<i>L.</i>		<i>L.</i>		<i>L.</i>		<i>L.</i>					
	<i>Listeria</i> spp.	<i>monocytogenes</i>	<i>Listeria</i> spp.	<i>monocytogenes</i>	<i>Listeria</i> spp.	<i>monocytogenes</i>	<i>Listeria</i> spp.	<i>monocytogenes</i>				
	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)				
N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	
Sala da Desossa	15/60	25,00	09/60	15,00	06/32	18,75	05/32	15,62	03/15	20,00	03/15	20,00
Roletes	05/20	25,00	03/20	15,00	-	-	-	-	01/07	14,28	01/07	14,28
Esteiras	02/11	18,18	02/11	18,18	02/07	28,57	01/07	14,28	01/04	25,00	01/04	25,00
Ralos	05/15	33,33	03/15	20,00	01/11	9,09	01/11	9,09	01/03	33,33	01/03	33,33
Evaporadores	03/14	21,43	01/14	7,14	03/14	21,43	03/14	21,43	0/01	0,00	0/01	0,00
Cortes Carneos	06/33	18,18	04/33	12,12	0/10	0,00	0/10	0,00	02/10	20,00	02/10	20,00
sem embalar	03/11	27,27	02/11	18,18	0/10	0,00	0/10	0,00	01/05	20,00	01/05	20,00
Embalados a vácuo	03/22	13,63	02/22	9,09	-	-	-	-	01/05	20,00	01/05	20,00
Câmara Fria	05/27	18,52	04/27	14,81	05/23	21,73	02/23	8,69	04/08	50,00	04/08	50,00
ralos	04/13	30,77	04/13	30,77	01/11	9,09	01/11	9,09	02/05	40,00	02/05	40,00
evaporadores	01/14	7,14	0/14	0,00	04/12	33,33	01/12	8,33	02/03	66,67	02/03	66,67
Meias-Carças	06/28	21,43	03/28	10,71	03/14	21,42	02/14	14,28	03/14	21,43	02/14	14,28
Quentes	03/17	17,65	01/17	5,88	02/04	50,00	01/04	25,00	03/07	42,86	02/07	28,57
Resfriadas	03/11	27,27	02/11	18,18	01/10	10,00	01/10	10,00	0/07	0,00	0/07	0,00
Sala de Matança	02/27	7,41	02/27	7,41	-	-	-	-	02/14	14,28	02/14	14,28
ralos	02/23	8,69	02/23	8,69	-	-	-	-	0/05	0,00	0/05	0,00
Roletes de pele	00/04	0,00	00/04	0,00	-	-	-	-	02/09	22,22	02/09	22,22
<b>TOTAL</b>	<b>34/175</b>	<b>19,42</b>	<b>22/175</b>	<b>12,57</b>	<b>14/79</b>	<b>17,72</b>	<b>09/79</b>	<b>11,39</b>	<b>14/61</b>	<b>22,95</b>	<b>13/61</b>	<b>21,31</b>

Continuação.

TABELA 3 – Distribuição de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em amostras de diferentes matadouros-frigoríficos brasileiros, segundo fontes e sítios analisados. Goiânia, 2008

FONTE	D				E			
	<i>Listeria</i> spp.		<i>L. monocytogenes</i>		<i>Listeria</i> spp.		<i>L. monocytogenes</i>	
	(+) N.		(+) N.		(+) N.		(+) N.	
	%		%		%		%	
<b>Sala da Desossa</b>	<b>03/08</b>	<b>37,50</b>	<b>02/08</b>	<b>25,00</b>	<b>01/05</b>	<b>20,00</b>	<b>0/05</b>	<b>0,00</b>
<b>Roletes</b>	-	-	-	-	0/03	0,00	0/03	0,00
<b>esteiras</b>	03/08	37,50	02/08	25,00	-	-	-	-
<b>ralos</b>	-	-	-	-	01/01	100,00	0/01	0,00
<b>evaporadores</b>	-	-	-	-	0/01	0,00	0/01	0,00
<b>Cortes Carneos</b>	<b>0/06</b>	<b>0,00</b>	<b>0/06</b>	<b>0,00</b>	<b>01/01</b>	<b>100,00</b>	<b>01/01</b>	<b>100,00</b>
<b>sem embalar</b>	0/03	0,00	0/03	0,00	01/01	100,00	01/01	0,00
<b>embalados a vácuo</b>	0/03	0,00	0/03	0,00	-	-	-	-
<b>Câmara Fria</b>	-	-	-	-	<b>0/02</b>	<b>0,00</b>	<b>0/02</b>	<b>0,00</b>
<b>ralos</b>	-	-	-	-	0/01	0,00	0/01	0,00
<b>evaporadores</b>	-	-	-	-	0/01	0,00	0/01	0,00
<b>Meias-Carças</b>	<b>01/02</b>	<b>50,00</b>	<b>0/02</b>	<b>0,00</b>	<b>01/02</b>	<b>100,00</b>	<b>01/02</b>	<b>50,00</b>
<b>quentes</b>	01/01	100,00	0/01	0,00	01/01	100,00	01/01	100,00
<b>resfriadas</b>	0/01	0,00	0/01	0,00	0/01	0,00	0/01	0,00
<b>Sala de Matança</b>	<b>02/14</b>	<b>14,28</b>	<b>02/14</b>	<b>14,28</b>	<b>0/05</b>	<b>0,00</b>	<b>0/05</b>	<b>0,00</b>
<b>ralos</b>	-	-	-	-	0/02	0,00	0/02	0,00
<b>roletes de pele</b>	02/14	14,28	02/14	14,28	0/03	0,00	0/03	0,00
<b>TOTAL</b>	<b>06/30</b>	<b>20,00</b>	<b>04/30</b>	<b>13,33</b>	<b>03/15</b>	<b>20,00</b>	<b>02/15</b>	<b>13,33</b>

Considerando os sítios amostrados nas diferentes fontes, em salas de desossa, amostras positivas para *Listeria* spp. foram identificadas 02/07 (28,57%) esteiras, 01/11 (9,09%) ralo e 03/14 (21,43%) evaporadores. Das amostras positivas nas câmaras-frias, 01/11 (9,09%) era de ralos e 04/12 (33,33%) de evaporadores. Em meias-carcaças, foram detectadas 02/04 (50%) quentes e 01/10 (10%) resfriada positiva, enquanto que as de cortes cárneos não embalados foram negativas. Não foram analisadas amostras de roletes de esteiras, cortes cárneos embalados a vácuo e em salas de matança deste estabelecimento.

No estabelecimento C, *Listeria* spp. foi identificada em 03/15 (20%) amostras de salas de desossa, 02/10 (20%) cortes cárneos, 04/08 (50%) de câmaras-frias, 03/14 (21,43%) meias-carcaças e 02/14 (14,28%) de salas de matança.

Considerando os sítios amostrados nas fontes do matadouro-frigorífico C, em salas de desossa foram detectadas 01/07 (14,28%) em rolete de esteiras, 01/04 (25%) em esteira e 01/03 (33,33%) em ralo. Em cortes cárneos, 01/05 (20%) não embalado e 01/05 (20%) embalado a vácuo foram positivos. Das positivas nas câmaras-frias, foram detectadas 02/05 (40%) em ralos e 02/03 (66,67%) em evaporadores. Em meias-carcaças, 03/07 (42,86%) quentes apenas foram positivas. Em salas de matança, foram encontradas 02/09 (22,22%) amostras positivas, sendo elas de roletes. A ausência de *Listeria* spp. foi evidenciada em evaporadores de salas de desossa, meias-carcaças resfriadas e ralos de salas de matança.

No matadouro-frigorífico D e suas respectivas fontes, *Listeria* spp. foi detectada em 03/08 (37,50%) amostras de salas de desossa, 01/02 (50%) meia-carcaça e 02/14 (14,28%) de salas de matança.

Em relação aos sítios de amostragem, *Listeria* spp. foi identificada em salas de desossa, sendo 03/08 (37,50%) em esteiras, enquanto que em meias-carcaças somente uma foi detectada, sendo ela de meia-carcaça quente (01/01, 100%). Em salas de matança foram obtidas duas amostras positivas, em roletes de pele (02/14, 14,28%). Amostras negativas foram obtidas em cortes cárneos e meias-carcaças resfriadas, ressaltando que não foram analisadas amostras de

roletes de esteiras, ralos e evaporadores de salas de desossa, câmaras-frias e ralos de salas de matança.

No estabelecimento E, amostras positivas para *Listeria* spp. foram evidenciadas, sendo 01/05 (20%) de sala de desossa, 01/01 (100%) de corte cárneo e 01/02 (50%) em meias-carcaças. Dos sítios de amostragem analisados nas cinco fontes, dos positivos para *Listeria* spp. na sala de desossa, apenas uma amostra foi detectada em ralo (01/01, 100%). Em cortes cárneos, apenas um foi positivo, identificado em corte não embalado (01/01, 100%). Em meias-carcaças, obteve-se somente uma positiva, identificada em meia-carcaça quente (01/01, 100%), não tendo sido encontrada nenhuma amostra positiva em ralos e evaporadores de salas de desossa, câmaras-frias, meias carcaças resfriadas e em salas de matança. Não foram analisadas amostras de esteiras de salas de desossa e cortes cárneos embalados a vácuo.

### 5.3.2 *L. monocytogenes*

Considerando as freqüências de ocorrência de *L. monocytogenes* nos matadouros-frigoríficos, pode-se observar na Tabela 3 que 22/175 (12,57%) foram positivas no total analisado do matadouro-frigorífico A, 09/79 (11,39%) do B, 13/61 (21,31%) do C, 04/30 (13,33%) do D e 02/15 (13,33%) do E.

Considerando as fontes analisadas no matadouro-frigorífico A, em salas de desossa foram detectadas 09/60 amostras positivas, 04/27 (14,81%) em câmaras-frias, 03/28 (10,71%) meias-carcaças e 02/27 (7,41%) em salas de matança. Foram observadas nas salas de desossa, 03/20 (15%) positivas em roletes de esteiras, 02/11 (18,18%) em esteiras, 03/15 (20%) em ralos e 01/14 (7,14%) em evaporador. Dos cortes cárneos, foram verificados 02/11 (18,18%) cortes sem embalar e 02/2 (9,09%) embalados a vácuo positivos. Em câmaras-frias, as positivas foram detectadas em ralos (04/13, 30,77%). Foram observadas três amostras positivas de meias-carcaças, 01/17 (5,88%) quente e 02/11; (18,18%) resfriadas. Das amostras de salas de matança, 02/23 (8,69%) de ralos

foram positivas. Amostras negativas foram evidenciadas em evaporadores de câmaras-frias e roletes de pele.

No matadouro-frigorífico B, foram detectadas 05/32 (15,62%) positivas em salas de desossa, 02/23 (8,69%) em câmaras-frias e em 02/14 (14,28%) meias-carcaças. Não foram analisadas amostras de salas de matança.

Nos sítios de salas de desossa, *L. monocytogenes* foi detectada em 01/07 (14,287%) amostra de esteira, 01/11 (9,09%) de ralo e 03/14 (21,43%) de evaporadores. Das amostras positivas de câmaras-frias, 01/11 (9,09%) foi identificada em ralo e 01/12 (8,33%) em evaporador. Em meias-carcaças, foram positivas 01/04 (25%) quente e 01/10 (10%) resfriada. As amostras de cortes cárneos não embalados foram negativas. Não foram pesquisadas amostras em roletes das esteiras, cortes cárneos embalados a vácuo e na sala de matança.

No estabelecimento C, *L. monocytogenes* foi detectada em 03/15 (20%) amostras de salas de desossa, 02/10 (20%) cortes cárneos, 04/08 (50%) de câmaras-frias, 02/14 (14,28%) meias-carcaças e 02/14 (14,28%) de salas de matança.

Considerando os sítios analisados em salas de desossa, 01/07 (4,28%) foram de roletes das esteiras, 01/04 (25%) das esteiras e 01/03 (33,33%) dos ralos. Em cortes cárneos, foram detectadas 01/05 (20%) em cortes cárneos não embalados e 01/05 (20%) em cortes embalados a vácuo. Das amostras positivas em câmaras-frias, 02/05 (40%) foram de ralos e 02/03 (66,67%) de evaporadores. Em meias-carcaças, foram encontrados 02/07 (29,57%) positivas, apenas nas quentes. Em salas de matança, foram encontradas duas amostras positivas, sendo elas de roletes (02/09, 22,22%). Amostras negativas foram observadas em evaporadores de salas de desossa, meias-carcaças resfriadas e em ralos de salas de matança.

No matadouro-frigorífico D, *L. monocytogenes* foi detectada em 02/08 (25%) amostras de salas de desossa e 02/14 (14,28%) na sala de matança.

Em relação aos sítios de amostragem analisados nas quatro fontes em estudo neste estabelecimento, das positivas para *L. monocytogenes* identificadas em salas de desossa, apenas duas foram detectada nas esteiras (02/08, 25%), enquanto que em salas de matança foram obtidas duas amostras positivas, em

roletes de pele (02/14, 14,28%). A ausência de *L. monocytogenes*. foi observada em cortes cárneos e meias-carcaças, ressaltando-se que não foram analisadas amostras de roletes de esteiras, ralos e evaporadores de salas de desossa, câmaras-frias e ralos de salas de matança.

No matadouro-frigorífico E, *L. monocytogenes* foi detectada em 01/01 (100%) corte cárneo e 01/02 (50%) meia-carcaça. As positivas foram identificadas em corte não embalado e em meia-carcaça quente. Não foi obtida nenhuma amostra positiva em roletes, ralos e evaporadores de salas de desossa, câmaras-frias, meias carcaças resfriadas e em salas de matança. Não foram analisadas amostras de esteiras da desossa e cortes embalados a vácuo.

#### 5.4 Distribuição de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* segundo a origem geográfica das amostras

##### 5.4.1 *Listeria* spp.

As frequências de ocorrência de *Listeria* spp. nos Estados de origem das amostras, segundo as fontes, podem ser verificadas na Tabela 4. Foram obtidas 25/153 (16,34%) positivas procedentes de São Paulo, 17/71 (23,94%) do Mato Grosso do Sul, 09/64 (14,06%) de Goiás, 16/50 (32%) do Mato Grosso, 03/11 (27,27%) da Bahia e 01/07 (14,28%) do Pará. A bactéria não foi detectada apenas em Minas Gerais.

No Estado de São Paulo foram detectadas 08/48 (16,67%) positivas em salas de desossa, 02/16 (12,5%) em cortes cárneos, 05/26 (19,23%) em câmaras-frias, 08/33 (24,24%) em meias-carcaças e 02/30 (6,67%) em sala de matança.

Considerando os sítios de amostragem neste Estado, em salas de desossa verificaram-se 02/13 (15,38%) positivas em roletes de esteiras, 02/11 (18,18%) em esteiras, 03/13 (23,07%) em ralos e 01/11 (9,09%) em evaporador. Em cortes cárneos, apenas cortes sem embalar (02/12, 16,67%) foram positivos e, em câmaras-frias, 04/13 (30,77%) de ralos e 01/13 (7,69%) de evaporador. Em

meias-carcaças, 06/19 (31,58%) quentes e 02/14 (14,28%) resfriadas positivas. Em salas de matança, detectaram-se 01/18 (5,55%) em rolete de pele e 01/12 (8,33%) em ralo.

TABELA 4 – Distribuição de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*, segundo a origem geográfica e as fontes e sítios analisados. Goiânia, 2008

FONTES	SÃO PAULO				MATO GROSSO DO SUL				GOIÁS			
	<i>Listeria</i> spp.		<i>L. monocytogenes</i>		<i>Listeria</i> spp.		<i>L. monocytogenes</i>		<i>Listeria</i> spp.		<i>L. monocytogenes</i>	
	(+) N.		(+) %		(+) N.		(+) %		(+) N.		(+) %	
	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%
<b>Sala da Desossa</b>	<b>08/48</b>	<b>16,67</b>	<b>06/48</b>	<b>12,50</b>	<b>09/27</b>	<b>33,33</b>	<b>05/27</b>	<b>18,52</b>	<b>02/14</b>	<b>14,28</b>	<b>01/14</b>	<b>7,14</b>
Roletes	02/13	15,38	02/13	15,38	02/07	28,57	0/07	0,00	00/01	0,00	0/01	0,00
Esteiras	02/11	18,18	02/11	18,18	05/08	62,50	04/08	50,00	01/05	20,00	0/05	0,00
Ralos	03/13	23,07	01/13	7,14	01/05	20,00	00/05	0,00	00/04	0,00	0/04	0,00
Evaporadores	01/11	9,09	00/11	0,00	01/07	14,28	01/07	14,28	01/04	25,00	01/04	25,00
<b>Cortes Carneos</b>	<b>02/16</b>	<b>12,50</b>	<b>02/16</b>	<b>12,50</b>	<b>02/09</b>	<b>22,22</b>	<b>02/09</b>	<b>22,22</b>	<b>03/30</b>	<b>10,00</b>	<b>03/30</b>	<b>10,00</b>
não embalados	02/12	16,67	02/12	16,67	01/07	14,28	01/07	14,28	0/06	0,00	0/06	0,00
embalados a vácuo	0/04	0,00	0/00	0,00	01/02	50,00	01/02	50,00	03/24	12,50	03/24	12,50
<b>Câmara Fria</b>	<b>05/26</b>	<b>19,23</b>	<b>04/26</b>	<b>15,38</b>	<b>01/12</b>	<b>8,33</b>	<b>0/12</b>	<b>0,00</b>	<b>02/07</b>	<b>28,57</b>	<b>02/07</b>	<b>28,57</b>
Ralos	04/13	30,77	04/13	30,77	0/06	0,00	0/06	0,00	01/04	25,00	01/04	25,00
Evaporadores	01/13	7,69	0/13	0,00	01/06	16,67	0/06	0,00	01/03	33,33	01/03	33,33
<b>Meias-Carças</b>	<b>08/33</b>	<b>24,24</b>	<b>06/33</b>	<b>18,18</b>	<b>03/09</b>	<b>33,33</b>	<b>01/09</b>	<b>11,11</b>	<b>01/06</b>	<b>16,67</b>	<b>01/06</b>	<b>16,67</b>
Quentes	06/19	31,58	05/19	26,31	02/06	33,33	0/06	0,00	00/02	0,00	0/02	0,00
Resfriadas	02/14	14,28	01/14	7,14	01/03	33,33	01/03	33,33	01/05	20,00	01/05	20,00
<b>Sala de Matança</b>	<b>02/30</b>	<b>6,67</b>	<b>02/30</b>	<b>6,67</b>	<b>02/14</b>	<b>14,28</b>	<b>02/14</b>	<b>14,28</b>	<b>01/06</b>	<b>16,67</b>	<b>01/06</b>	<b>16,67</b>
Ralos	01/18	5,55	01/18	5,55	01/06	16,67	01/06	16,67	-	-	-	-
Roletes de pele	01/12	8,33	01/12	8,33	01/08	12,50	01/08	12,50	01/06	16,67	01/06	16,67
<b>TOTAL</b>	<b>25/153</b>	<b>16,34</b>	<b>19/153</b>	<b>12,42</b>	<b>17/71</b>	<b>23,94</b>	<b>10/71</b>	<b>14,08</b>	<b>09/64</b>	<b>14,06</b>	<b>08/64</b>	<b>12,30</b>

Continua...

TABELA 4 –Distribuição de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*, segundo a origem geográfica e as fontes e sítios analisados.  
Goiânia, 2008

FONTE	MATO GROSSO				BAHIA				PARÁ				MINAS GERAIS			
	<i>Listeria</i> spp.		<i>L. monocytogenes</i>		<i>Listeria</i> spp.		<i>L. monocytogenes</i>		<i>Listeria</i> spp.		<i>L. monocytogenes</i>		<i>Listeria</i> spp.		<i>L. monocytogenes</i>	
	(+) N.		(+) %		(+) N.		(+) %		(+) N.		(+) %		(+) N.		(+) %	
	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%
<b>Sala da</b>																
<b>Desossa</b>	<b>07/23</b>	<b>30,43</b>	<b>06/23</b>	<b>26,08</b>	<b>02/06</b>	<b>33,33</b>	<b>02/06</b>	<b>33,33</b>	<b>00/04</b>	<b>0,00</b>	<b>00/04</b>	<b>0,00</b>	<b>00/02</b>	<b>0,00</b>	<b>00/02</b>	<b>0,00</b>
<b>Roletes</b>	02/09	22,22	02/09	22,22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Esteiras</b>	0/05	0,00	0/05	0,00	00/03	0,00	00/03	0,00	00/02	0,00	0/02	0,00	-	-	-	-
<b>Ralos</b>	03/05	60,00	03/05	60,00	00/01	0,00	00/01	00,00	00/01	00,00	00/01	00,00	00/01	0,00	00/01	0,00
<b>Evaporadores</b>	02/04	50,00	01/04	25,00	02/02	100,00	02/02	100,00	00/01	00,00	00/01	00,00	00/01	0,00	00/01	0,00
<b>Cortes Carneos</b>	<b>02/03</b>	<b>66,67</b>	<b>01/03</b>	<b>33,33</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>sem embalar</b>	02/03	66,67	01/03	33,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>embalados a</b>																
<b>vácuo</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Câmara Fria</b>	<b>04/08</b>	<b>50,00</b>	<b>04/08</b>	<b>50,00</b>	<b>00/01</b>	<b>0,00</b>	<b>00/01</b>	<b>0,00</b>	<b>00/01</b>	<b>0,00</b>	<b>0/01</b>	<b>0,00</b>	-	-	-	-
<b>Ralos</b>	02/04	50,00	02/04	50,00	00/01	0,00	00/01	0,00	00/01	0,00	0/01	0,00	-	-	-	-
<b>Evaporadores</b>	02/04	50,00	02/04	50,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Meias-Carcaças</b>	<b>02/06</b>	<b>33,33</b>	<b>0/06</b>	<b>0,00</b>	<b>01/03</b>	<b>33,33</b>	<b>01/03</b>	<b>33,33</b>	<b>00/01</b>	<b>0,00</b>	<b>00/01</b>	<b>0,00</b>	<b>00/01</b>	<b>0,00</b>	<b>00/01</b>	<b>0,00</b>
<b>Quentes</b>	02/03	66,67	0/03	0,00	00/01	0,00	00/01	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Resfriadas</b>	0/03	0,00	0/03	0,00	01/02	50,00	01/02	50,00	00/01	0,00	0/01	0,00	0/01	0,00	0/01	0,00
<b>Sala de</b>																
<b>Matança</b>	<b>01/10</b>	<b>10,00</b>	<b>01/10</b>	<b>10,00</b>	<b>00/01</b>	<b>0,00</b>	<b>00/01</b>	<b>0,00</b>	<b>01/01</b>	<b>100,00</b>	<b>01/01</b>	<b>100,00</b>	<b>0/01</b>	<b>0,00</b>	<b>0/01</b>	<b>0,00</b>
<b>Ralos</b>	0/06	0,00	0/06	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Roletes de</b>																
<b>pele</b>	01/04	25,00	01/04	25,00	00/01	0,00	00/01	0,00	01/01	100,00	01/01	100,00	0/01	0,00	0/01	0,00
<b>TOTAL</b>	<b>16/50</b>	<b>32,00</b>	<b>12/50</b>	<b>24,00</b>	<b>03/11</b>	<b>27,27</b>	<b>03/11</b>	<b>27,27</b>	<b>01/07</b>	<b>14,28</b>	<b>01/07</b>	<b>14,28</b>	<b>0/04</b>	<b>0,00</b>	<b>0/04</b>	<b>0,00</b>

- sítio de amostragem não analisado

No Mato Grosso do Sul, *Listeria* spp. foi detectada em (09/24, 37,5%) amostras de salas de desossa, (02/09; 22,22%) cortes cárneos, (01/12; 8,33%) de câmara-fria, (03/09; 33,33%) meias-carcaças e (02/14; 14,28%) de salas de matança.

Considerando os sítios de amostragem, em salas de desossa foram identificadas 02/07 (28,57%) amostras de roletes de esteiras, 05/08 (62,5%) de esteiras, 01/05 (20,07%) de ralo e 01/07 (14,28%) de evaporador positivas. Em cortes cárneos, 01/07 (14,28%) não embalados e 01/02 (50%) embalado a vácuo foram positivos, enquanto que em câmaras-frias, a bactéria foi detectada apenas em evaporador (01/06; 16,67%). Em meias-carcaças, 02/06 (33,33%) quentes e uma 01/03 (33,33%) resfriada foram positivas e, em salas de matança, 01/06 (16,67%) de ralo e 01/08 (12,5%) de rolete de pele. A ausência de *Listeria* spp. foi evidenciada apenas em ralos das câmaras-frias.

Considerando as amostras de Goiás e suas respectivas fontes, *Listeria* spp. foi detectada em 02/14 (14,28%) amostras de salas de desossa, 03/30 (10%) cortes cárneos, 02/07 (28,57%) de câmaras-frias, 01/06 (16,67%) meia-carcaça e em 01/06 (16,67%) de sala de matança.

Em relação aos sítios de amostragem, em salas de desossa foram identificadas 01/05 (20%) e 01/04 (25%) positivas em esteiras e evaporadores, respectivamente. Em cortes cárneos, apenas os embalados a vácuo foram positivos (03/24; 12,5%). Em câmaras-frias, foram positivas uma amostra de ralo (01/04; 25%) e uma de evaporador (01/03; 33,33%), enquanto que em meias-carcaças e salas de matança foram obtidas de 01/05 (20%) positiva em meia-carcaça resfriada e 01/06 (16,67%) em rolete de pele. A ausência de *Listeria* spp. foi observada em roletes de esteira e ralos de sala de salas de desossa, cortes cárneos não embalados e em meias-carcaças quentes, ressaltando-se que não foram analisadas amostras de ralos de salas de matança de Goiás.

No Mato Grosso, *Listeria* spp. foi detectada em 07/23 (30,43%) amostras de sala de desossa, 02/03 (66,67%) cortes cárneos, 04/08 (50%) de câmaras-frias, 02/06 (33,33%) meias-carcaças e 01/10 (10%) de sala de matança.

Em relação aos sítios de amostragem, em sala de desossa foram verificadas 02/09 (22,22%) positivas em roletes das esteiras, 03/05 (60%) em ralos e 02/04 (50%) em evaporadores. Em cortes cárneos, apenas os cortes sem embalar foram positivos (02/03; 66,67%). Em câmaras-fria, 02/04 (50%) amostras de ralos e 02/04 (50%) de evaporadores foram positivas, enquanto que em meias-carcaças e sala de matança, 02/03 (66,67%) meias-carcaças quentes e 01/04 (25%) de rolete de pele. Ausência de *Listeria* spp. foi observada em esteiras de salas de desossa, cortes cárneos embalados a vácuo, meias-carcaças resfriadas e roletes de pele ressaltando-se que não foram analisadas amostras de ralo de sala de matança neste Estado.

Na Bahia, três amostras positivas para *Listeria* spp. foram identificadas, sendo 02/06 (33,33%) de salas de desossa e 01/03 (33,33%) meias-carcaças. Não foram detectadas amostras positivas em câmaras-frias e salas de matança. Não foram pesquisadas amostras de cortes cárneos neste Estado. Considerando os sítios de amostragem, na sala de desossa foram verificadas 02/02 (100%) positivas em evaporadores enquanto que, em meias-carcaças, 01/02 (50%) resfriada. Amostras negativas foram observadas em esteiras e ralos de salas de desossa, ralos de câmaras-frias, meias-carcaças quentes. Não foram analisadas amostras de roletes de pele.

No Pará, apenas uma amostra positiva para *Listeria* spp. foi identificada, presente em rolete de pele (01/01,100%), na sala de matança. Amostras das demais fontes analisadas mostraram-se negativas. Não foram analisados cortes cárneos neste Estado.

Em Minas Gerais, *Listeria* spp. não foi detectada em nenhuma das fontes analisadas, devendo-se ressaltar que a amostragem consistiu em apenas quatro amostras.

#### 5.4.2 *L. monocytogenes*

As frequências de ocorrência de *L. monocytogenes* nos Estados de origem das amostras, segundo as fontes, podem ser verificadas na Tabela 4. Foram obtidas 19/153 (12,42%) positivas procedentes de São Paulo, 10/71 (14,08%) do Mato Grosso do Sul, 08/64 (12,3%) de Goiás, 12/50 (24%) do Mato Grosso, 03/11 (27,27%) da Bahia e 01/07 (14,28%) do Pará. A bactéria não foi detectada apenas em Minas Gerais.

No Estado de São Paulo foram detectadas 06/48 (12,5%) positivas em salas de desossa, 02/16 (12,5%) em cortes cárneos, 04/26 (15,38%) em câmaras-frias, 06/33 (18,18%) em meias-carcaças e 02/30 (6,67%) em sala de matança.

Considerando os sítios de amostragem neste Estado, em salas de desossa verificaram-se 02/13 (15,38%) positivas em roletes de esteiras, 02/11 (18,18%) em esteiras e 01/13 (7,14%) em ralos. Em cortes cárneos, apenas cortes sem embalar (02/12, 16,67%) foram positivos e em câmaras-frias, 04/13 (30,77%) em ralos. Em meias-carcaças, 05/19 (26,31%) quentes e 01/14 (7,14%) resfriadas positivas. Em salas de matança, detectaram-se 01/18 (5,55%) em rolete de pele e 01/12 (8,33%) em ralo. A ausência de *L. monocytogenes* foi observada nos evaporadores da desossa, nos cortes embalados a vácuo e evaporadores das câmaras-frias.

No Mato Grosso do Sul, *L. monocytogenes* foi detectada em (05/27, 18,52%) amostras de salas de desossa, (02/09; 22,22%) cortes cárneos, (01/09; 11,11%) meias-carcaças e (02/14; 14,28%) de salas de matança.

Considerando os sítios de amostragem, em salas de desossa foram identificadas 04/08 (50%) de esteiras e 01/07 (14,28%) de evaporador positivas. Em cortes cárneos, 01/07 (14,28%) não embalados e 01/02 (50%) embalado a vácuo foram positivos. Em meias-carcaças, somente uma 01/03 (33,33%) resfriada foi positiva e, em salas de matança, 01/06 (16,67%) de ralo e 01/08 (12,5%) de rolete de pele. Amostras negativas foram detectadas em roletes das esteiras, ralos da desossa, ralos e evaporadores das câmaras-frias e meias-carcaças quente.

Considerando as amostras de Goiás e suas respectivas fontes, *L.monocytogenes* foi detectada em 01/14 (7,14%) amostras de salas de desossa, 03/30 (10%) cortes cárneos, 02/07 (28,57%) de câmaras-frias, 01/06 (16,67%) meia-carcaça e em 01/06 (16,67%) de sala de matança.

Em relação aos sítios de amostragem, em salas de desossa foram identificadas 01/04 (25%) positivas em evaporadores. Em cortes cárneos, apenas os embalados a vácuo foram positivos (03/24; 12,5%). Em câmaras-frias, foram positivas uma amostra de ralo (01/04; 25%) e uma de evaporador (01/03; 33,33%), enquanto que em meias-carcaças e salas de matança foram obtidas de 01/05 (20%) positiva em meia-carcaça resfriada e 01/06 (16,67%) em rolete de pele. A ausência de *Listeria* spp. foi observada em roletes das esteiras, esteiras, ralos da desossa, cortes sem embalar e meias-carcaças quente. Sendo que não foram analisados amostras nos ralos do abate.

No Mato Grosso, *L. monocytogenes*. foi detectada em 06/23 (26,08%) amostras de sala de desossa, 01/03 (33,33%) cortes cárneos, 04/08 (50%) de câmaras-frias e 01/10 (10%) de sala de matança.

Em relação aos sítios de amostragem, em sala de desossa foram verificadas 02/09 (22,22%) positivas em roletes das esteiras, 03/05 (60%) em ralos e 01/04 (25%) em evaporadores. Em cortes cárneos, apenas os cortes sem embalar foram positivos (01/03; 33,33%). Em câmaras-fria, 02/04 (50%) amostras de ralos e 02/04 (50%) de evaporadores foram positivas. Nas salas de matança, 01/04 (25%) de rolete de pele foram positivas. Ausência de *Listeria* spp. foi observada em esteiras de salas de desossa, meias-carcaças e ralos dassalade matança, ressaltando-se que não foram analisadas amostras de cortes cárneos embalados a vácuo neste Estado.

Na Bahia, três amostras positivas para *L. monocytogenes* foram identificadas, sendo 02/06 (33,33%) de salas de desossa e 01/03 (33,33%) meias-carcaças. Não foram detectadas amostras positivas em câmaras-frias e salas de matança. Não foram pesquisadas amostras de cortes cárneos neste Estado. Considerando os sítios de amostragem, na sala de desossa foram verificas 02/02 (100%) positivas em evaporadores enquanto que, em meias-carcaças, 01/02

(50%) resfriada. Amostras negativas foram observadas em esteiras e ralos de salas de desossa, ralos de câmaras-frias, meias-carcaças quentes. Não foram analisadas amostras de roletes de pele.

No Pará, apenas uma amostra positiva para *L. monocytogenes* foi identificada, presente em rolete de pele (01/01,100%), na sala de matança. Amostras das demais fontes analisadas mostraram-se negativas. Não foram analisados cortes cárneos neste Estado.

Em Minas Gerais, *Listeria* spp. não foi detectada em nenhuma das fontes analisadas, devendo-se ressaltar que a amostragem consistiu em apenas quatro amostras.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Distribuição de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* nas diferentes fontes

Os resultados obtidos evidenciam a presença e disseminação de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em todas as fontes analisadas, devendo-se levar em consideração, também, a presença de *Listeria* spp. em percentuais elevados neste trabalho.

Em salas de desossa, câmaras-frias e em meias-carcaças foram obtidos os maiores percentuais de *Listeria* spp. (23,33%) (TABELA 1), enquanto que os de *L. monocytogenes* foram observados em câmaras-frias (20%) e salas de desossa (15,83%) (TABELA 1). Deve-se observar que estes ambientes são ricos em matéria orgânica e que a higienização ocorre, em salas de desossa, no final das atividades do dia e ao final de cada turno, diferente dos procedimentos adotados em salas de matança, enquanto que as câmaras-frias são lavadas e sanitizadas apenas uma vez ao mês, justificando a diferença de percentuais encontrados nestas três fontes e os elevados percentuais descritos em salas de desossa e câmaras-frias.

A própria sistemática de lavagem e sanitização adotada contribui para a formação de biofilmes, característica utilizada por bactérias do gênero *Listeria* (BERESFORD et al., 2001) nesses ambientes e também nos equipamentos aí instalados, como roletes de esteira, esteiras, evaporadores, dentre outros, contribuindo para a perpetuação da bactéria no ambiente e nesses equipamentos, que têm a remoção da matéria orgânica e a ação de agentes sanitizantes dificultadas como consequência da formação desses biofilmes (TAKHISTOV & GEORGE, 2004).

Isso justificaria os elevados percentuais nesses ambientes já citados e nos equipamentos que compuseram os sítios amostrados, assim como nos ralos, todos eles com elevadas frequências de ocorrência, tanto do gênero quanto de *L. monocytogenes*, superiores a praticamente todos os demais sítios de amostragem. Convém acrescentar que as práticas de limpeza e sanitização

adotadas nesses ambientes acima mencionados também contribuem para o acúmulo de matéria orgânica nos ralos, que por sua vez proporciona a redução na oxigenação, criando um nicho bastante propício para bactérias psicrotróficas e facultativas, o que atende perfeitamente aos requisitos e características de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*, gerando como consequência a colonização desses ralos e a manutenção da bactéria no ambiente de produção.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam a característica psicrotrófica de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* (GERMANO & GERMANO, 2008), tendo sido verificadas os menores percentuais em salas de matança e os mais elevados em amostras procedentes de ambientes com temperaturas baixas, como foi verificado em salas de desossa e câmaras-frias.

Adicionalmente, 55 amostras positivas para *Listeria* spp. (ANEXO, QUADRO 1-5), eram provenientes de sítios de amostragem de salas de desossa, câmaras-frias, meias-carcaças resfriadas e cortes cárneos. Por esta capacidade de desenvolvimento em baixas temperaturas, pode-se esperar a sobrevivência do patógeno por longos períodos nos alimentos e nesses ambientes com temperaturas de refrigeração (GERMANO & GERMANO, 2008).

Em cortes cárneos, os percentuais obtidos para *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* foram próximos (Tabela 1), embora os do gênero tenham sido ligeiramente superiores, no entanto todos podem ser considerados elevados. Ressaltam-se os níveis mais elevados de *Listeria* spp. em cortes sem embalar e níveis idênticos de *L. monocytogenes* em cortes sem embalar e embalados a vácuo. Estes achados devem servir de alerta às autoridades sanitárias e demandam das indústrias medidas rígidas de controle do patógeno.

Embora em percentuais próximos, em cortes cárneos sem embalar as freqüências de ocorrência de *Listeria* spp. foram superiores aos das meias-carcaças resfriadas e, no caso de *L. monocytogenes* também foram superiores os embalados a vácuo. Isto pode ser atribuído ao fato das meias-carcaças serem levadas até a sala de desossa por propulsão manual, ou seja, pode ter ocorrido a recontaminação pelos manipuladores e também pelo contato com a superfície das esteiras, uma vez que estas apresentaram níveis de contaminação elevados.

Deve-se chamar a atenção para o papel que os roletes de esteiras aparentemente possuem na alimentação da contaminação dessas esteiras por *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* e, como consequência, da própria carne.

Os resultados aqui obtidos em cortes cárneos são superiores aos descritos por SAMADPOUR et al. (2006), que verificaram a presença de *L. monocytogenes* em 18/516 (3,5%) amostras de cortes cárneos, analisados pela técnica de PCR, com diferentes pares de “primers”. Essa diferença de percentual pode ser atribuída aos “primer” utilizados

Por outro lado, são inferiores aos de MENA et al. (2006), que verificaram a presença de *L. monocytogenes* em 17,7% dos cortes cárneos analisados, embora os autores tenham utilizado métodos bacteriológicos em suas análises. Deve-se ressaltar que a amostragem destes autores consistiu de apenas 17 amostras, justificando a diferença entre os resultados.

Os percentuais de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em cortes cárneos podem ser considerados elevados, assim como em meias-carcaças quentes e resfriadas, embora os índices de *Listeria* spp. nas quentes tenham sido bastante elevados e superiores aos 13,33% (TABELA 1) obtidos nas resfriadas. Além disso, *Listeria* spp. foi verificada em níveis superiores aos da espécie.

Os resultados obtidos por PICCHI et al. (1999) foram superiores aos detectados neste trabalho, tendo detectado *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em 96% e 20% de quartos dianteiros bovinos.

Ao se compararem os resultados de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em meias-carcaças quentes (33,33% e 16,67%, respectivamente) (TABELA 1) com os observados em roletes de pele (6,67%) (TABELA 1) observa-se que as diferenças obtidas indicam que à medida em que aumentaram as manipulações ao longo do fluxograma de abate, a contaminação superficial das meias-carcaças também aumentou. Isto porque como originalmente a microbiota da superfície de meias-carcaças bovinas é coincidente com a da pele (PARDI et al 2006), não seria de se esperar diferenças tão acentuadas entre as freqüências na superfície das meias-carcaças e em roletes de pele, sugerindo que uma intensa contaminação cruzada esteja ocorrendo.

Possivelmente esta contaminação esteja se dando através dos manipuladores, do uso de utensílios e equipamentos contaminados e/ou de falhas operacionais no abate, principalmente as relacionadas à evisceração. Esses microrganismos, permanecendo superfície das meias-carcaças durante o abate, contaminam o ambiente e podem comprometer toda a produção (TAKHISTOV & GEORGE, 2004).

Consideram-se principais fontes de contaminação e/ou disseminação dos microrganismos, a contaminação cruzada entre pele, manipuladores, equipamentos e ambiente durante o fluxograma de abate, sendo reservados à pele e conteúdo intestinal o papel de principais fontes de contaminação de meias-carcaças bovinas e como pontos críticos na tecnologia do abate as operações de esfola e evisceração (PARDI et al. 2006).

Quando se comparam os percentuais de *Listeria* spp. em meias-carcaças quentes, estes se reduzem acentuadamente após o resfriamento, o mesmo ocorrendo com *L. monocytogenes*, embora no caso desta última a intensidade de queda seja bem menor, em torno de 4%, ao invés dos 20% de redução observados no gênero.

Esta redução tão intensa poderia ser parcialmente justificada pelos efeitos adversos sinérgicos exercidos pela queda do pH aos valores finais da carne e pelo ressecamento superficial das meias-carcaças, principalmente nos casos em que esta seja muito acentuada, uma vez que a redução na camada de água livre é proporcional à intensidade da dessecação, soma-se a estes, o fato da atividade de água ( $a_w$ ) também se reduzir (ICMSF, 2003).

Considerando que *Listeria* spp. é um gênero composto por espécies psicrófilas, com alta resistência às baixas  $a_w$  e acidez, sendo *L. monocytogenes* inclusive ácido-resistente (ICMSF, 2003), esta redução nos índices em meias-carcaças quentes e resfriadas não se justificaria por atuação individual dos fatores acima, no entanto, considerando seus efeitos adversos em associação, é possível que isto justifique, ao menos parcialmente as diferenças obtidas. Vale ressaltar que as meias-carcaças quentes e resfriadas aqui analisadas não foram as mesmas.

Por outro lado, sabe-se que algumas indústrias frequentemente lançam mão do uso de ácidos orgânicos para descontaminar meias-carcaças ou mesmo cortes, em concentrações variadas, com a finalidade de reduzir os níveis de contaminação inicial. Embora esta prática não seja legal no Brasil, cuja legislação proíbe a descontaminação de carnes frescas, alguns autores sugerem em seus trabalhos que este procedimento venha sendo adotado pelas indústrias brasileiras.

RIOS (2005) constatou a ocorrência de meias-carcaças em dois matadouros-frigoríficos em Goiânia, GO, com pHs variando de 5,4 a 7,3 nas quentes e de 5,4 a 6,2 nas resfriadas de um dos estabelecimentos, enquanto que nas do outro variaram de 6,1 a 7,0 nas quentes e de 5,0 a 6,42 nas resfriadas. Os resultados de pH inferiores aos valores preconizados para meias-carcaças quentes e resfriadas levou a autora a sugerir que as meias-carcaças analisadas tenham sido submetidas a algum processo de descontaminação, provavelmente com ácidos orgânicos, nos dois estabelecimentos de origem das amostras.

RAUECKER et al (2005) constataram a descontaminação com ácido orgânico em cortes cárneos de um dos estabelecimentos de procedência das amostras aqui analisadas, tendo detectado a presença de inibidores nos cortes analisados.

Os resultados obtidos no presente trabalho são preocupantes dadas as freqüências de ocorrência obtidas para *L. monocytogenes*. No entanto, se alguns estabelecimentos estiverem realmente se utilizando de tais produtos, a preocupação seria intensificada pois os efeitos exercidos por essas substâncias sobre a microbiota natural da carne e o conseqüente favorecimento e seleção de microrganismos resistentes, como é o caso de alguns gêneros pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, bactérias ácido-láticas e as esporuladas, encontram-se devidamente comprovados (HOLLEY & GIL, 2006), ressaltando-se que o emprego de ácidos orgânicos na indústria cárnea poderá levar ao desenvolvimento de cepas extremamente patogênicas e ácido-tolerantes, como já descrito para *E. coli* O157:H7 e *Salmonella*.

Em salas de matança foram detectados os menores índices de *Listeria* spp. (10%) e *L. monocytogenes* (10%) (TABELA 1), tendo sido verificada maior

freqüência de ocorrência de ambas em roletes, notando-se ainda que os percentuais obtidos em ralos foram baixos, enquanto que os de roletes podem ser considerados elevados. Estes resultados são justificados pelo fato da sala de matança ser constantemente lavado com água, muitas vezes com água quente ou vapor, ao longo do abate, o que contribui para que a contaminação dos ralos seja inferior à dos roletes de pele, higienizados apenas após o término do abate.

Em se tratando dos percentuais de *L. monocytogenes* obtidos nas cinco fontes analisadas, os resultados obtidos podem ser considerados elevados e preocupantes devido ao fato de se tratar de uma bactéria patogênica, que pode gerar sérios riscos à saúde pública.

Embora tenha sido detectada em meias-carcaças e cortes, que são carnes “in natura”, e não em produtos prontos para consumo, normalmente os mais associados a surtos (FDA, 2003), estes achados não representam menor risco ou importância, uma vez que a carne fresca usualmente é utilizada como matéria-prima para uma grande variedade desses produtos, como massa pronta de quibe cru, hambúrgueres, almôndegas, dentre outros, ressaltando-se ainda a freqüência do consumo da carne ou derivados cárneos não suficientemente cozidos. Estes aspectos são corroborados pelos resultados de MANTILLA et al. (2007), que verificaram a presença de *L. monocytogenes* em 50% de 30 amostras de carne bovina moída.

Os resultados obtidos neste trabalho se pareceram aos de FANTELLI & STEPHAN (2001), embora estes tenham analisado carne bovina moída pelo método bacteriológico convencional, detectaram 10,75% de *L. monocytogenes*.

Os resultados obtidos neste trabalho são compatíveis com os de SAKATE, (2004), que objetivou determinar a freqüência de ocorrência de *L. monocytogenes* em diversas etapas de abate de um matadouro-frigorífico bovino no Estado de São Paulo através da PCR. Em se tratando dos locais onde foram verificados maiores percentuais, SAKATE encontrou maior freqüência em áreas frias, ou seja, salas de desossa, câmaras-frias e cortes cárneos, de forma semelhante ao aqui observado, mas os percentuais obtidos por ele, 5,23% de amostras positivas, foram inferiores ao deste trabalho. Este foi o único artigo

brasileiro localizado na literatura que trata da presença de *L. monocytogenes* em estabelecimentos de abate.

## 6.2 Eficiência dos pares de “primers” utilizados para a detecção de *L. monocytogenes* nas fontes em estudo

O total de amostras positivas para *L. monocytogenes* obtida nesse trabalho só foi possível devido à associação dos dois “primers” utilizados, apesar da baixa eficiência apresentada pelo par LL5/LL6.

Os resultados obtidos no presente trabalho revelaram um elevado desempenho do par LM1/LM2 para detecção de *L. monocytogenes* no total analisado, uma vez que seu uso permitiu a identificar 92,45% das amostras positivas, enquanto que o par LL5/LL6 exibiu uma eficiência que pode ser considerada baixa (TABELA 2). Apesar disso, com sua utilização foram identificadas adicionalmente quatro amostras positivas que não foram detectadas com o primeiro par (ANEXO, QUADRO 1-5), elevando de 49 para 53 o total de amostras positivas, com o conseqüente aumento de percentual para os 14,72% aqui descritos (TABELA 1), ao invés dos 13,61% que seriam verificados com o uso apenas do par LM1/LM2.

Aparentemente trata-se de uma diferença pequena, mas que não pode ser ignorada quando se pensa na necessidade de reduzir a ocorrência de resultados falso-negativos. A importância disto pode ser facilmente ilustrada, ou entendida, quando o raciocínio é feito em relação ao diagnóstico clínico da listeriose humana, por exemplo. De forma semelhante, em amostras de ambiente de plantas processadoras, mas especialmente em alimentos, este fato é relevante quando se considera que a veiculação alimentar de *L. monocytogenes* constitui a principal forma de transmissão da bactéria ao homem (GERMANO & GERMANO, 2008), adicionalmente à gravidade da doença e às elevadas taxas de letalidade relatadas (ARRUDA et al., 2007).

Considerando as fontes de detecção, os melhores resultados desempenhados pelo par LM1/LM2 foram observados em salas de matança, de desossa e câmaras-frias (100%; 94,73% e 91,67%) (TABELA 2), devendo-se ressaltar que a totalidade de amostras positivas nas fontes só foi identificada em salas de matança. Já nos sítios amostrados foram detectadas todas as positivas de ralos, roletes e esteiras de salas de desossa, de cortes cárneos sem embalar, de evaporadores de câmaras-frias, de meias-carcaças resfriadas e de ralos de salas de matança e roletes de pele.

Eficiência um pouco menor do par LM1/LM2 foi exibida em cortes cárneos e meias-carcaças (87,5%) (TABELA 2), sendo seu pior desempenho verificado em evaporadores de salas de desossa e cortes embalados a vácuo (75%) (TABELA 2).

Pode ser que esta redução no desempenho destes “primers” seja em parte devida à presença de células que com maior grau de injúria, já que em fontes como meias-carcaças e cortes cárneos espera-se uma maior população devido à natureza do substrato (PARDI et al. 2006), outro fator a considerar, neste caso em relação aos evaporadores, seria uma contaminação inicial em número reduzido, associada ao método de coleta das amostras, por “swabs”.

A análise dos resultados apresentados na Tabela 2 mostra que os “primers” LL5/LL6 se mostraram insatisfatórios para a detecção de *L. monocytogenes* nas fontes analisadas e no total da amostragem.

Com os “primers” acima o maior percentual exibido foi verificado em câmaras-frias (66,67%) (TABELA 2), enquanto que nas demais sua eficiência foi significativamente menor, em especial em amostras de salas de matança. Já em sítios como evaporadores de salas de desossa, cortes cárneos embalados a vácuo, ralos e evaporadores de câmaras-frias, seu desempenho foi notavelmente melhor, tendo identificado de 60% a 75% (TABELA 2) das positivas, ao contrário do observado em cortes cárneos sem embalar e em ralos de salas de matança, sítios em que não foram obtidos sinais de amplificação.

Estes resultados também reforçam a importância de se utilizarem mais de um par de “primers” para detecção da bactéria nas fontes em estudo e

implicam ainda na necessidade de serem avaliados outros, objetivando melhorar a sensibilidade da técnica. Estes aspectos encontram respaldo na literatura, conforme já demonstrado por vários autores ao tratarem das dificuldades referentes à detecção de microrganismos em alimentos pela técnica de PCR (DUFFY et al., 1999; GOLSTEYN et al., 1991), particularmente bactérias Gram-positivas (DUFFY et al., 1999; GOLSTEYN et al., 1991).

Aparentemente os “primers” LL5/LL6 apresentaram melhor desempenho em fontes em que a bactéria estaria menos sujeita a efeitos injuriantes ou naquelas supostamente com maior contaminação, como verificado em evaporadores de salas de desossa, evaporadores e ralos de câmaras-frias e em cortes cárneos embalados a vácuo, sendo de mais fácil crescimento durante o enriquecimento das amostras, o que concorre para aumentar o número de células presentes, compensando o baixo limiar de detecção que, ao que parece, estes “primers” exibiram nas outras fontes.

Neste trabalho empregou-se o enriquecimento não seletivo em caldo soja-trypticase a 28°C/18h. Porém, considerando os resultados obtidos, seria viável avaliar períodos mais prolongados de incubação a fim de proporcionar a máxima detecção de *Listeria* presente, através do revigoramento das células presentes, que ocorre quando de enriquecimento mais longo. Estes aspectos são corroborados pelos resultados de RIOS (2005), que constatou que o pré-enriquecimento das amostras para detecção de *Escherichia coli* O157:H7 por PCR mostrou-se necessário para detecção da bactéria nas amostras estudadas, tendo sido comparativamente superior ao PCR realizado com extração direta, sem pré-enriquecimento. A autora também verificou que a incubação das amostras por 18h foi mais eficiente para detectar a bactéria, comparativamente ao período de 4h, que se mostrou insuficiente para detecção em superfície de meias-carcaças.

Essas diferenças de percentuais obtidos pelos diferentes pares de “primers” também foram evidenciadas por RAUECKER, (2007), que ao pesquisar a presença de *Clostridium estertheticum* em diversas fontes de frigoríficos, com a utilização de três pares de primers, verificou índices de positividade de 78,64%, 57,28% e 36,89% para cada par de “primer”.

Outro ponto a considerar seria avaliar os efeitos do enriquecimento não seletivo durante um período curto, seguido de uma etapa de enriquecimento seletivo, em função do tipo de amostra a analisar.

Os resultados sugerem que este par foi mais apto para detectar *L. monocytogenes* em amostras oriundas de ambientes com baixa temperatura e com menor possibilidade de ocorrência de graus mais acentuados de injúria, conforme se infere dos resultados descritos na Tabela 2, não tendo se mostrado apto para ser utilizado em fontes com temperaturas elevadas e/ou com pequeno número de bactérias aptas a crescer. Pode-se observar na mesma Tabela que, na maioria das vezes, as fontes em o LL5/LL6 foi melhor em desempenho, a do par LM1/LM2 foi pior. Isto foi observado em amostras de câmaras-frias (ralos) e sala de desossa (evaporadores), por exemplo.

Convém ressaltar que neste trabalho não foram avaliados os limiares de detecção dos “primers” em razão de se ter isolado o DNA das amostras enriquecidas e não da bactéria em cultura pura, já que nas primeiras a população presente é mista. Por outro lado, os resultados de limiares determinados com o microrganismo em cultura pura não correspondem aos verdadeiros limiares apresentados quando são utilizados DNAs extraídos diretamente das amostras ou apenas enriquecidas ou pré-enriquecidas.

### 6.3 Distribuição de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* nos matadouros-frigoríficos de origem das amostras

Das positivas para *Listeria* spp. no estabelecimento B, todas as fontes analisadas apresentaram resultados elevados, com exceção de cortes cárneos, que não apresentou amostras positivas. E das positivas para *L. monocytogenes*, somente amostras de salas de desossa e meias-carcaças mostraram percentuais elevados, 15,62% e 14,28%.

No estabelecimento C, todas as fontes apresentaram percentuais elevados, tanto para *Listeria* spp. quanto para *L. monocytogenes*, principalmente câmaras-frias (50%), para ambas.

Levando em consideração a baixa amostragem dos estabelecimentos D e E, alguns sítios apresentaram elevados percentuais para *Listeria* spp., como salas de desossa, meias-carcaças e salas de matança no estabelecimento D e salas de desossa, cortes cárneos e meias-carcaças no estabelecimento E das positivas para *L. monocytogenes*, somente salas de desossa e salas de matança apresentaram percentuais elevados no estabelecimento D, enquanto que cortes cárneos e meias-carcaças no estabelecimento E.

Estes resultados não são suficientes para classificar os Estados analisados de acordo com os percentuais observados devido a baixa amostragem dos Estados do Pará, Bahia e Minas Gerais, mas são fundamentais para avaliar a disseminação dos microrganismos no país.

Os resultados obtidos são preocupantes, pois a presença do microrganismo é indicativa de falhas operacionais e contaminação ambiental, ocorrendo em todos os estabelecimentos analisados, independente do porte.

#### 6.4 Distribuição de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* segundo a origem geográfica das amostras

Devem ser observados com cautela os percentuais acima descritos, uma vez que a amostragem, na maioria das fontes e sítios analisados nos Estados do Pará, Bahia e Minas Gerais, consistiram de reduzidos números de amostras. Por outro lado, estes resultados são importantes por evidenciarem a presença de bactérias do gênero *Listeria* em todas as fontes incluídas neste trabalho e na maioria dos sítios de coleta.

Pode-se considerar que os percentuais obtidos de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em todos os estado foram elevados, principalmente se tratando dos percentuais de *L. monocytogenes*, por se tratar de uma bactéria patogênica com exceção do Estado de Minas Gerais, que não apresentou amostras positivas

em nenhuma fonte analisada. Não se pode afirmar que a ausência do microrganismo observada em Minas Gerais é conclusiva, devido ao reduzido número de amostras analisadas provenientes desta região.

O Estado com maior percentual de amostras positivas para *Listeria* spp. foi o Estado do Mato Grosso, seguido pelo Estado do Mato Grosso do Sul, São Paulo, Goiás, Bahia e Pará, percentuais elevados dos dois últimos, mas com pequena amostragem. Mesmo os Estados da Bahia e Pará, com amostragem pequena e com apenas três e uma amostras positivas respectivamente, deve ter a importância deste achado ressaltada, dada a necessidade de se ressaltar a presença do microrganismo nesses Estados.

Nos Estados de Goiás, Pará e São Paulo os percentuais foram inferiores aos verificados nos demais, tendo variado de 13,84% a 16,34%, valores que foram próximos entre os Estados. Mesmo estes percentuais serem inferiores aos demais Estados, eles não podem ser considerados baixos.

Os percentuais de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*, no estado de São Paulo foram considerados próximos variando de 12,42% a 16,34% (TABELA 4) respectivamente. A mesma proximidade de resultados foi observado nos Estados de Goiás, Pará e Bahia. Nos Estados do Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, a diferença entre esses percentuais foram maiores.

A diferença de percentuais obtidos em cada Estado é justificada pela localização dos estabelecimentos como pode ser observada no Anexo.

O Estado com maior índice de positividade é o Estado do Mato Grosso, sendo que das 50 amostras analisadas, 31 são procedentes do estabelecimento A, estabelecimento este com o maior número de amostras positivas.

Pode-se notar também que o Estado do Mato Grosso do Sul, foi obtido alto percentual de amostras positivas, 42 das 71 amostras analisadas neste Estado são de procedência também do estabelecimento A, fazendo com que o percentual do estado se elevasse.

O Estado de Goiás foi o Estado com menor percentual de positivos, justificado também pelo fato de sua amostragem ter sido composta de sua maioria

do estabelecimento B, estabelecimento com menos porcentagem de amostras positivas.

O mesmo se repete com as amostras positivas para *L. monocytogenes*, nos diferentes estados, a seqüência de maior positividade confere com a de *Listeria* spp., Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Goiás. Os estados da Bahia e Para, também apresentaram índices de positividade elevados, mas devido ao numero reduzido de amostras analisadas, não são classificados juntamente com os demais. O que justifica essa diferença entre os estados, também é a procedência dessas amostras.

Considerando as amostras positivas para *Listeria* spp. no Estado de São Paulo, são considerados elevados os percentuais em todas as fontes, exceto salas de matança. No entanto podem ser considerados baixos os percentuais obtidos em ralos e roletes de salas de matança, evaporadores de câmaras-frias e evaporadores de sala de desossa, porcentagens variando de 5,55% a 9,09%.

Considera-se bastante elevados os percentuais obtidos em meias-carcaças, em especial as quentes, ralos de câmaras-frias e roletes da desossa. No entanto vale ressaltar o pequeno número de amostragem em algumas fontes, como cortes carneos, câmaras-frias e salas de matança.

No Estado do Mato Grosso do Sul, elevados percentuais de *Listeria* spp. foram obtidos em todas as fontes, exceto em câmaras-frias. Dentre os sítios analisados, esteiras da desossa, cortes embalados a vácuo, meias-carcaças quentes e resfriadas, foram os sítios com maiores percentuais no Estado.

No Estado de Goiás, todas as fontes apresentaram elevados percentuais de *Listeria* spp. com exceção dos cortes cárneos, cujos percentuais chegaram a 10%. Elevados percentuais foram observados principalmente em ralos e evaporadores das câmaras-frias e evaporadores da desossa.

No Estado do Mato Grosso, todas as fontes apresentaram altos índices de positividade para *Listeria* spp., com exceção da sala de matança. Alguns sítios apresentaram maiores percentuais, ralos da desossa (60%), evaporadores da desossa (50%), cortes sem embalar (66,67%), ralos e evaporadores das câmaras-frias (50%) cada.

Considerando as amostras positivas para *L. monocytogenes* no Estado de São Paulo, todas as fontes apresentaram percentuais elevados, com exceção das salas de matança (6,67%) (TABELA 4), no entanto podem-se considerar baixos os percentuais obtidos em ralos de salas de desossa e meias-carcaças resfriadas.

No Estado do Mato Grosso do Sul, todas as fontes analisadas apresentaram percentuais elevados, com exceção das câmaras-frias, mas alguns sítios como esteiras de desossa, e cortes cárneos não embalados apresentaram percentuais mais elevados que a média (50%) (TABELA 4).

Das amostras positivas para *L. monocytogenes* no Estado de Goiás, somente as amostras de câmaras-frias, meias-carcaças e salas de matança apresentaram percentuais elevados, levando em consideração que algumas fontes consistiram de pequenas amostragens.

No Estado do Mato Grosso, amostras de salas de desossa, cortes cárneos e câmaras-frias apresentaram percentuais elevados.

## 7. CONCLUSÕES

- *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* estão amplamente disseminadas nas fontes e sítios estudados, em níveis que podem ser considerados elevados; sendo que *Listeria* spp. apresentou percentuais mais elevados em todas as fontes e sítios, que *L. monocytogenes*;
- As maiores frequências de ocorrências de *Listeria* spp. foram observadas em salas de desossa, câmaras-frias e meias-carcaças, enquanto que as de *L. monocytogenes* em salas de desossa e câmaras-frias;
- O par de “primer” LM1/LM2 revelou maior eficiência que o LL5/LL6, no entanto a associação dos dois aumentou os níveis de detecção e foi necessária para identificar a totalidade de amostras positivas neste trabalho;
- O par LL5/LL6 não se mostrou satisfatório para detecção de *L. monocytogenes* nas fontes analisadas, sendo oportuna a avaliação de outros “primers” para detecção da bactéria nessas fontes;
- Os resultados obtidos indicam a necessidade de se avaliarem períodos mais prolongados de incubação, sendo oportuno avaliar os efeitos do enriquecimento não-seletivo, seguido de uma etapa de pré-enriquecimento seletivo;
- A presença de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* foi observada em percentuais elevados em todos os matadouros-frigoríficos amostrados, encontrando-se amplamente difundida nos mesmos;
- *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* mostraram-se amplamente distribuída em todos os Estados analisados, com exceção de Minas Gerais, em percentuais elevados, embora os maiores índices tenham sido verificados no Mato grosso do Sul.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAM, M., SHLUTER, D., VUCKOVIC, D., WRABER, B, DORIC, M. DECKERT, M. Murine model of pregnancy-associated *Listeria monocytogenes* infection. **FEM Immunol Medicine Microbiology**. v. 35, p. 177-182, 2003.
2. ACHA, P. N., SZYERES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 2 ed. Washington: OMS/OPS, 989P. 1986.
3. ACHA, P. N., SZYERES, B. Bacterioses y Micosis. In:- **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3 ed, parte 1, v.1, Washington: OPS, 2001.
4. AGUADO, V., VITAS, A., GARCIA-JALON, I. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. **Journal Food Microbiology**. p. 341-347, 2004.
5. ANTUNES, P., REU, C., SOUZA., J. C.; PESTANA, N., PEIXE, L. Incidence and susceptibility to antimicrobial agents of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* isolated from poultry carcasses in Porto, Portugal, **Journal of Food protection**. v. 65, n.12, p.1888-1893, 2002.
6. ARRUDA, G. A. Perfil genotípico de cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de alimentos: Análise crítica das técnicas de PCR e PFGE e importância para Saúde Pública. São Paulo, 108f. **Tese** (Doutorado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, USP, São Paulo, 2006.
7. BARBALHO, T. C. F., *Listeria* em abatedouros de frangos: ocorrência, disseminação e proposição de um método rápido para confirmação e identificação das espécies. 73p. **Dissertação (mestrado em Nutrição)** – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2002.
8. BARBALHO, T. C. F., ALMEIDA, P. F., ALMEIDA, R. C. C., HOFER, E. Prevalence of *Listeria* spp. at a poultry processing plant in Brazil and a phage test for rapid confirmation of suspect colonies. **Food Control**, v.16, p.211-216, 2006.
9. BEJ, A. K., MAHBUBANI, M. H., BOYCE, M. J., ATLAS, R. M. Detection of *Salmonella* sp. In oysters by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, 60(1): 368-373,1994.
10. BERSOT, L. S., LANDGRAF, M., FRANCO, D. D. G., DESTRO, M. T. Production of mortadella: behavior of *L. monocytogenes* during processing and storage conditions. **Meat Science**. v.57, p.19-26, 2001.

11. BRASIL – ANVISA – Agencia Nacional de vigilância sanitária. **Resolução – RCD no. 12**, de 02 de janeiro de 2001 – Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos.
12. 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.
13. BEUMER, R. R., HAZELEGER, V. C. *Listeria monocytogenes*: Diagnostic Problems. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, p.191-197, 2003.
14. BOGGS, G.D., WHITWAN, R.E., HALE, L. M., BRISCOE, R. P., KAHN, S. E. Outbreak of Listeriosis Associated with homemade Mexican-style cheese – North Carolina. **Morbidity and Mortality weekly report**. v.50, n.26, 2001.
15. BOURRY, A.; POUTREL, B.; ROCOURT, J. Bovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes*: characteristics of natural and experimental infections. **Journal Medical Microbiology**, v.43, n.2, p.125-32, 1995.
16. BUCHANAN, R. L. Advances in cultural methods for the detection of *Listeria monocytogenes*. In: MILLER, A. J., SMITH, J. L., SOMKUTI, G. A. **Foodborne listeriosis**, New York: Elsevier, p.85-95, 1990.
17. BUNNING, V. K.; DONNELLY, C. W.; PEELER, J. T.; BRIGGS, E. H.; BRADSHAW, J. G.; CRAWFORD, R. G.; BELIVEAU, C. M.; TIERNEY, J. T. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* within bovine milk phagocytes. **Appl. Environ. Microbiology**, v.54, n.2, p.364-70, 1988.
18. BURKHALTER, P. W., MULLER, C., LUTHY, J., CANDRIAN, U. Detection of *Salmonella* spp. in Eggs: DNA Analyses, Culture Techniques, and Serology. **Journal of AOAC International**, 78(6): p. 1531-1537, 1995.
19. CHASSEIGNAUX, E., TOQUIN, M. T., RAGIMBEAU, C., SALVAT, G., COLIN, P., ERMEL, G. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from the environment, raw meat and raw products in two poultry-and pork-processing plants. **Journal of Applied Microbiology**. v. 91, n.5, p. 888-889, 2001.
20. CISTERNAS, A. V., LAGOS, N. N., GARCIA, C. C., DIAZ, J. T. Infección por *Listeria monocytogenes* y embarazo con buen resultado perinatal. **Rev. Chil. Obstet. Ginecol**. V. 67, cap. 3, p.237-241, 2002.
21. CUCHRIESER, C., RUSNIOK, C., KUNST, F., COSSAT, P. GLASE, P. Comparison of the genome sequence of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. **FEMS Immunol Med Microbiol**. v. 35, p. 207-213, 2003.

22. CASARORRI, V. T., GALLO, C.R., CAMARGO, R. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo Minas Frescal comercializados em piracicaba – SP. **Archivos latinoamericanos de Nutrition**, v.44, p.158-163, 1994.
23. CASTRO, A. F. P. Listeria. In: TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, cap.26, p.131-132, 1989.
24. CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION. **Preliminary Foodnet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through-food – 10 States, United States, 2005**.
25. CHIARINI, E. *Listeria monocytogenes* em amadouras de aves: marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação. São Paulo, 145f. **Tese** (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, 2007.
26. DEVER, F. P., SCHAFFNER, D. W., SLADE, P. J. Methods for the detection of foodborne *Listeria monocytogenes* in the U. S. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v.13, n.4, p.263-292, Dec., 1993.
27. DOGANAY, M. Listeriosis: Clinical presentation. **FEMS Immunol Medical Microbiology**. v.35, p. 173-175, 2003.
28. DOROZYNSKI, A. Seven die in French *Listeria* outbreak. **British Medical Journal**, v.320, p.6001, 2000.
29. DOUMITH, M., BUCHRIESER, C., GLASER, P., JACQUET, C., MARTINS, P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. **Journal Clinical Microbiology**. Aug. p.3819-2822, 2004.
30. DUFFY, G. CLOAK, O., SHERIDAN, J. BLAIN, I. McDOWELL, D. The development of a combined surface adhesion and polymerase chain reaction technique in the rapid detection of *Listeria monocytogenes* in meat and poultry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 49, p.151-159, 1999.
31. ERICSSON, H., EKLOW, A., DANIELSSON-THAM, M. L., LONGAREVIC, S., MENTZING, L. O., PERSSON, I., UNNERSTAD, H., THAM, W. An outbreak of Listeriosis suspected to have been caused by Rainbow trout. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n.11, p.2904-2907, Nov., 1997.
32. FANTELLI, K., STEPHAN, R. Prevalence and characteristics of shigatoxin-producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland. **Journal Food Microbiology**. v.55, n.3, p.476-511, 1991.
33. FARBER, J. M., HARWIG, J. The Canadian position on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. **Food Control**, v.85, p.301-306, 2003.

34. FARBER, M. PETERKIN, P. I., *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v. 55, n.3, p.476-511, 1991.
35. FLEMING, D. W., COCHI, S. L., MacDONALD, K. L., BRUNDUM, J., HAYES, P. S., PILIKAYTIS, B. D., HOLMES, M. B., AUDURIER, A., BROOME, C. V., REINGOLD, A. L. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. **New England Journal of Medicine**, v.312, p.404-407, 1985.
36. FDA/CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION; USDAS/FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Draft Assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Disponível em: <http://www.foodsafety.gov/> e <http://cfsan.fda.gov/>, acessados em janeiro de 2003.
37. FORSYTHE, D., FRANCIOSA, G., POURHABAN, M., GIAFRANCESCHI, M., AURELI, P. Genetic typing of human and food isolates of *Listeria monocytogenes* from episodes of listeriosis. **Europe Journal Epidemiology**. v. 14, p.205-210, 1998.
38. GERMANO & GERMANO, **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2008.
39. GILLESPIE, I. A., MCLAUCHLIN, J. GRANT, K. A., LITTLE, C. L., MITHANI, V., PENMAN, C., LANE, C., REGANT, M. Changing Pattern of Human Listeriosis. England and Wales, 2004. **Emergency Infections Diseases**. v.12, n. 9, Disponível em: [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid). Acesso em 23 nov. 2007.
40. GOLSTEYN, T. E. J., KING, R. K., BURCHAK, J., GANNON, V. P. J. Sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* in milk and group beef with polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, 57(9), p.2576-2580, 1991.
41. GRIF, K., HEIN, I., WAGNER, M., BRANDI, E., MPAMUGO, O. McLAUCHLIN, J. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* in the feces of healthy Austrian. **Wien Klin Wochenschr**. V. 113, cap. 19, p.737-742, 2001.
42. HOF, H. Therapeutic options. **FEMS Immunology Medical Microbiology**. v. 35, p.203-205, 2003.
43. HOFER, E. Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 31, p. 173-177,1998.

44. HOLKO, I., URBANOVÁ, J., KANTIKOVA, M., PASTOROVA, K., KMEAT, V. PCR, Detection of *Listeria monocytogenes* in milk and milk products and Differentiation os suspect Isolates. **Acta Veterirary Brno**. v. 71, p.125-131, 2002.
45. ICMSF. **Microrganisms in foods**. Microbiological testing in food safaty managementy. Kluwer Academic/ PLENUM Press, New York, 2003.
46. JAY, J. M. **Modern food microbiology**. Gaithersburg: Aspen Publishers. p. 485-505, 2000.
47. JAY, J. M. Listerioses de origem animal. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto Alegre, Artmed, cap.25, p.517-542, 2005.
48. JEONG, D. K., FRANK, J. F. G. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms with microorganisms isolated from milk and dairy processing environments. **Journal of Food Protection**. Des Moines, v. 57, p. 576-586, 1994.
49. JITRAPAKDEE, S., TASSANAKAJON, A., BOONSAENG, V. et al. A simple, rapid and sensitive detection of Salmonella in food by polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, 9(6): p.375-382, 1995.
50. JONES, D. D., LAW, R., BEJ, A. K. Detection of Salmonela sp. In oysters using polymerase chain reactions (PCR) and gene probes. **Journal of Food Science**, 58(6): p.1191-1197, 1993.
51. KASNOWSKI, M. C. *Listeria spp. Escherichia coli*. Isolamento, identificação, estudo sorologico e antimicrobianos em corte de carne bovina (alcatra), inteira e moída. Niterói, RJ, 110f. **Dissertação** (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal). Universidade Federal Fluminense, UFF. Niterói, RJ, 2004.
52. KERR, K. G., DEALLER, S. F., LACEY, R. W. Materno-fetal from cook-chil food. **Lancet**, ii: 1133,1188.
53. KOSARK, N., DAUBE, G. GHAFIR, Y., CHAHED, A., JOLLY, S., VINDEVOGEL, H. An efficient sampling technique used to detect four foodbourne pathogens on pork and beef carcasses in nine Belgian abattoirs. **Journal of Food Protection**,v. 61, n. 5, p. 535-541, 1998.
54. LACIAR, A. L., HASUOKA, R. P., CORREA, S. M., MIRANDA, A. M., CENTORBI, O. N. P. Symptomatic hydrocephalus in a newborn infected with *Listeria monocytogenes*. **Brazilian Journal of microbiology**, v.31, p.09-11, 2000.
55. LAWRENCE, L. M., GILMOUR, A. Incidence of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* in a poltry products and their rapid confirmation by Multiplex PCR. **Appl Environ Microbiology**. v. 60, p. 4600-4604, 1994.

56. LINNAN, M. J., MASCOLA, L., LOU, X. D., GOULET, V., MAY, S., SALMINEN, C., HILD, D. W., YONEKURA, M. L., HAYES, P., WEAVER, R., AUDURIER, A., PLIKAYTIS, B. D., FANNIN, S. L., KLEKS, A., BROOME, C. V. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. **New England Journal of Medicine**, v.319, p.823-828, 1988.
57. LOUGUERCIO, A. P. E. et al.. *Listeria monocytogenes*: um importante patógeno de origem alimentar. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 80-81, p. 39-48, 2001
58. LUDEN, J. M., AUTIO, T.J., SJOBERG, A. M., KORKEALA, H. J. Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. **Journal of Food Protection**. v.66, n. 11, p. 2062-2069, 2003.
59. MAIJALA, R. LYYTIKAINEN, O., JOHANSSON, T., AUTIO, T., AALTO, T., HAAVISTO, L., HONKANEN-BUZALSKI, T. Exposure of *Listeria monocytogenes* within an epidemic caused by butter in Finland. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v.70, p.97-109, 2001.
60. MANTILA, S. P. S. *Listeria* spp. em carne bovina pré-moida: isolamento, sorologia, sensibilidade das cepas aos antimicrobianos e relação com a presença de sulfito de sódio. Niterói, 114f. **Dissertação** (Mestrado em Higiene veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de origem animal) – Faculdade de Ciências Veterinária, UFF, Niterói, 2006.
61. MARTH, E. H. Diseases Characteristic of *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, v. 42, n. 51, p.165-168, 1998.
62. McLAUHLIN, J., MICHELL, R. T., SMERDON, W. J., JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. **Int Journal Food Microbiology**. v. 92, p. 15-23, 2004.
63. MENA, C., ALMEIDA, G., CARNEIRO, L., TEIXEIRA, P., HOGG, T., GIBBS, P. A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. **Food Microbiology**, v.21, p.213-216, 2004.
64. OLIVEIRA, A. N. Bacterias do Genero *Listeria* em Leite e derivados no comércio Varejista de Goiânia Goiás. Belo Horizonte, 101f. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, 1993.
65. PEELER, J. T., HOUGHTBY, G. A., RAINOSEK, A. P. The most probable number technique. In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of Methods for the microbiological Examination of Foods**. 3.ed Washington: Apha, 1992. cap.6, p.105-120.

66. PETERS, C. DOMANN, E., DARBOUCHE, A., CHAKRABORTY, T., MILEKE, M. E. A. Tailor host immune responses to *Listeria* by manipulation of virulence genes – the interface between innate and acquired immunity. **FEMS Immunology Medical Microbiology**. v. 35, p.243-253, 2003.
67. PIATTI, R. M, ROJAS, M. V. R., OTUKI, A. K., BALDASSI, L. Presença de *Listeria monocytogenes* em amostras de caprinos com sintomatologia nervosa. **Arq. Inst. Biol.** p.71, 2004
68. PICCHI, V., RAMOS SILVA, E. O. T., SOUZA, S. L. P., BALIAN, S. C. Isolamento e identificação de *Listeria* spp. em quartos dianteiros de bovinos desossados. **Higiene Alimentar**, v.13, n.63, p.38-42, 1999.
69. RAUECKER, U, N. *Clostridium estertheticum* e *C. gasigenes* em carnes bovinas refrigeradas, equipamentos e ambiente de matadouros-frigoríficos de diferentes estados brasileiros, Goiânia, 67f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, UFG, Goiania, 2007.
70. RIJSENS, N., VLAEMYNCK, G., ROUSSAU, R., HERMAN, L., JANNES, G. Unidentified *Listeria*-like bacteria isolated from cheese. **Lett. Appl. Microbiology**. v. 27, p. 198-202.
71. RIOS, E, R. Detecção de *E. coli* O157:H7 em superfícies de meias-carcaças de bovinos abatidos em estabelecimento sob inspeção federal em Goiânia-GO. Goiânia, 72f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, UFG, Goiania, 2005.
72. RYSER, E. T., MARTH, E. H. Listeriosis in animals. **Listeria, Listeriosis, and Food Safety**. New York: Copyright, cap. 3, p.33-44, 1991.
73. SAKATE, R. I., MOSCARDI-JUNIOR, E., LANDGRAF, M., FRANCO, B. D. G. M., PINTO, J. P. A. N., DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes* in kosher beef carcasses. In: **XV International Symposium on Problems of Listeriosis**. Uppsala, Suécia, 2004.
74. SAMADPOUR, M. ET AL. Incidence of enterohemorrhagic *E. coli*, *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in retail fresh ground beef, prouts and mushrooms. **Journal of Food Protection**. v. 69, n.2, p.441-443, 2006.
75. SCHLECH, W. F., LAVIGNE, P. M., BARTOLUSSI, R. A., ALLEN, A. C., HALDANE, E. V., WORT, A. J., HIGHTOWE, A. W., JOHNSON, S. E., KING, S. H., NICHOLLS, E. S., BROOME, C. V. Epidemic listeriosis evidence for transmission by food. **New England Journal of Medicine**. v. 308, n.4, p. 203-206, 1983.

76. SCHWAB, J. P., EDELWEISS, M. I. A. Identificação de *Listeria monocytogenes* em placentas humanas e espécimes de aborto pela técnica de imunistoquímica. **Jornal Brasileiro de patologia e medicina laboratorial**. v. 39, n. 2, p.111-114, 2003.
77. SEELIGER, H. P. R, JONES, D. Genus *Listeria*. In: SNEATH, P. H. A., MAIR, N. S., SHAPE, M. E. **Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Willians e Wilkins, v.2, p.1235-1245, 1996.
78. SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C. A., SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de Análises Microbiológicas de Alimentos**,1. ED., São Paulo: Varela, p.134-139. 1997.
79. SILVA, W. P., LIMA, A. S., GANDRA, E. A., ARAUJO, M. R., MACEDO, R. P., DUVALL, E. H. *Listeria* spp. no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, **Ciência Animal**. v. 34, n.3, 2004.
80. SOMER, L. KASHI, Y. A PCR method based on 16S rRNA sequence fo simultaneous detection of the genus *Listeria* and the species *Listeria monocytogenes* in food products. *Journal Food Protection*. v 66, p. 1658-1665, 2003.
81. TAKHISTOV, P., GEORGE, B. Early events and pattern formation in *Listeria monocytogenes* biofilmes. **Biofilms**, v.1, p.351-359, 2004.
82. TOBIA, M. B., MENGONI, G. B., PELLON, H. S. *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp. em productos termoprocessados. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 29, 1997.
83. TOMPKIN, R. B. Control of *Listera monocytogenes* in the food-processing environment. **Journal of Food Protection**. v. 65, n.4, p. 709-725, 2002.
84. TREMOULET, F., DUCHÉ, O., NAMANE, A., MARTINIE, B. Comparison of protein patterns of *Listeria monocytogenes* grow in biofilm or in planktonic mode by proteomic analysis. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 210, p. 25-31, Abr., 2002.
85. VAZQUEZ-BOLAND, J. A., KUHN, M., BERCHE, M., CHAKRABORTY, T., DOMINGUEZ-BERNAL, G., GOEBEL, G. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinats. *Rev*. v. 14, p.584-640, 2004
86. VITAS, A. I., AGUADO, V. GARCIA-JOLON, I. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **International Journal of Food Microbiology**. v. 90, p. 349-356, 2004.

87. YUCEL, N., CITAK, S., ONDER, M. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. **Food Microbiology**, v. 22, p.2-3, 2005.
88. WARBURTON, D. W., FARBER, J. M., BABIUK, T. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. In: CANADA. Health and Welfare (ed.), **Compendium of analytical methods: laboratory procedures of microbiological of foods**, Ottawa: Poliscience, 1991.
89. WATKINS, J., SLEATH, K. P. Isolated and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage sludge, and river water. **Journal of Applied Bacteriology**, n. 50, p. 1-9, 1981.