UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Listeria monocytogenes na cadeia produtiva
de alimentos: da produção primária ao
consumidor final

Maria Teresa Destro

*Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo, para
Concurso de Livre-Docência junto ao
Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental.*

São Paulo
2006

A Mario e Ida,
À Martha Rosa,
Ao Álvaro,

Por tudo o que vocês representam.

Agradecimentos

- Aos meus alunos, que geraram boa parte dos dados aqui apresentados;
- Aos amigos de outras Universidades com quem tenho desenvolvido trabalhos;
- À Lina Casale Aragon-Alegro, Ana Eucares von Laer; Vinicius Buccelli Ribeiro; Gabriela Palcich, e Ângela Maria de Oliveira Lima pela ajuda inestimável no preparo desta tese;
- Às manas Landgraf (Mariza e Maria Eloíza) pela amizade, carinho e pelo apoio em todas as horas;
- À Bernadette Franco e Marina Martinez, pelo companheirismo e apoio;
- Ao Flávio Alterthum, pela amizade, carinho, apoio, incentivo e paciência;
- Ao Fernando Moreno, e ao Jorge Mancini pelo incentivo e apoio;
- À Kátia e Lúcia, pela cooperação;
- À FAPESP, CAPES, CNPq pelas bolsas e auxílios concedidos;
- Aos colegas do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF-USP;
- A todos que direta, ou indiretamente cooperaram para este trabalho:

Muito Obrigada!

Índice de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática da pato-fisiologia da infecção por <i>Listeria monocytogenes</i> segundo Vázquez-Boland	10
Figura 2 - Ciclo de infecção por <i>L. monocytogenes</i>	13
Figura 3 - Organização física e transcricional dos principais genes de virulência de <i>L. monocytogenes</i>	14
Figura 4 – Medidas para controle de <i>Listeria</i> em uma planta processadora de alimentos	44
Figura 5 - Teste empregando imunocromatografia/ imunoprecipitação	51
Figura 6 – Representação esquemática de um teste ELISA sanduíche	52
Figura 7 – Testes ELISA	52

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Ocorrência de <i>Listeria</i> sp e <i>L. monocytogenes</i> (Lm) em alguns alimentos brasileiros	31
Tabela 2 – Frequência de <i>Listeria monocytogenes</i> (Lm) em queijos macios, em alguns estudos conduzidos em diferentes países	34
Tabela 3 – Dados selecionados sobre a ocorrência de <i>Listeria monocytogenes</i> (Lm) em queijos macios no Brasil	35

Prefácio

Listeria monocytogenes é uma bactéria quem vem chamando a atenção dos microbiologistas de alimentos há pouco mais de duas décadas, após a comprovação de sua capacidade em causar doença em humanos via alimentos.

Apesar do grande número de estudos realizados ao redor do mundo buscando entender a biologia e a ecologia deste patógeno, além do seu comportamento na cadeia produtiva de alimentos, ainda há vários pontos obscuros que necessitam de esclarecimentos.

Dados publicados sobre *Listeria monocytogenes* em nosso país vêm aumentando nos últimos anos, entretanto ainda são escassos e normalmente se baseiam apenas na detecção do patógeno em alimentos.

Na tentativa de contribuir para um melhor conhecimento sobre este microrganismo em nosso meio, escrevi esta tese, que reflete nossos estudos sobre *L. monocytogenes* desde o mestrado até os trabalhos mais recentes de orientandos do programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e de outras Universidades.

Os trabalhos utilizados para o preparo desta tese estão citados no texto e, aqueles de nossa autoria, relacionados em anexos.

1. Introdução

Apesar de todos os esforços realizados pelas autoridades de saúde, indústrias e órgãos de fiscalização, as enfermidades transmitidas por alimentos (ETA) continuam a ocorrer, tanto no Brasil como em outros países.

Nos Estados Unidos, onde os dados estatísticos sobre ETA estão mais facilmente disponíveis, sabe-se que, de 1996 a 1998, quando os casos de ETA começaram a ser monitorados no país através da FoodNet, houve, até 2005, uma diminuição na incidência de infecções causadas por *Campylobacter*, *Listeria*, *Salmonella*, entre outros patógenos. Entretanto, este declínio ocorreu antes de 2005, e ficou estável, como no caso de *Campylobacter*, desde 2001. Quanto a *Listeria monocytogenes*, o que se nota é que, após um declínio até 2002, a incidência de infecções de origem alimentar por este patógeno voltou a aumentar, atingindo, em 2005, a cifra de 3 casos/milhão de habitantes. Isso representa um aumento de 2,7 casos/milhão se comparado a 2004 (CDC, 2006; Anônimo, 2006). O objetivo nacional de saúde do país era atingir 2,5 casos /milhão até 2005, o que não foi conseguido.

Estes números americanos podem ser ainda mais elevados, se levarmos em consideração que a maioria dos casos de ETA não é relatada ou mesmo diagnosticada. Isso porque a maioria da população não procura ajuda médica

e, para aqueles que procuram, muitas vezes não são solicitados exames microbiológicos (Anônimo, 2005).

A listeriose humana tem características muito peculiares, como longo período de incubação e tropismo pelo sistema nervoso central, o que torna difícil a elucidação de casos de surtos de origem alimentar.

Como forma de prevenção da disseminação de listeriose por alimentos, há que se conhecer melhor as características deste microrganismo, seus fatores de virulência, seu comportamento em alimentos e no ambiente de produção e processamento destes alimentos. Também, deve-se considerar a educação dos consumidores sobre os riscos e as medidas preventivas que eles podem e devem tomar.

Passado e presente

Listeria monocytogenes é um microrganismo conhecido há 80 anos por veterinários e imunologistas. Entretanto, desde a primeira descrição por Murray e colaboradores, em 1926, do *Bacterium monocytogenes* e a publicação por Seeliger, em 1961, da primeira compilação dos estudos existentes sobre *Listeria* e a doença por ela causada, os conhecimentos sobre esta bactéria eram restritos a poucos especialistas.

Mesmo após o esforço de Seeliger, não se observou uma grande preocupação por parte dos microbiologistas ou mais especificamente dos microbiologistas de alimentos, com esta bactéria. Imunologistas, por outro lado, a usavam como sistema modelo para estudos sobre imunidade mediada por células T.

Somente após a publicação por Schlech et al. (1983) de informações sobre um surto de listeriose humana, ocorrido em 1981 em Halifax, Canadá, causado por salada de repolho ("coleslaw"), é que *L. monocytogenes* começou a ser tratada como patógeno de origem alimentar e se tornou preocupação para a indústria de alimentos.

Essa preocupação não se deve somente ao fato de a maioria dos casos de listeriose humana ser causada pelo consumo de alimentos contaminados (Slutsker, Schuchat, 1999), mas principalmente à natureza ubíqua deste microrganismo. Essa ampla disseminação faz com que *Listeria* seja um problema em toda a cadeia produtiva de alimentos, desde a fazenda até a mesa. Animais, além de poder desenvolver listeriose (Gitter, 1989), podem ser hospedeiros do microrganismo, como acontece, por exemplo, com as aves de corte (Bailey et al., 1990).

Atualmente, muitos países possuem políticas relacionadas com a presença de *L. monocytogenes* em alimentos. Essas políticas podem variar da “tolerância zero”, como é o caso dos EUA, até limites aceitáveis, dependendo do grupo de alimentos, como acontece no Canadá.

Visando garantir a inocuidade dos alimentos, as indústrias estão implantando sistemas de gerenciamento, baseados em procedimentos padrão de higiene operacional (PPHO), boas práticas de fabricação (BPF), análise de risco e pontos críticos de controle (HACCP), e, mais recentemente, a busca de certificação, baseada em norma de reconhecimento internacional como a ISO 22.000 (ISO, 2005).

Índice

Prefácio	i
1. Introdução	01
2. <i>Listeria monocytogenes</i>	14
3. <i>L. monocytogenes</i> e os alimentos	20
4. Avaliação de métodos para detecção de <i>Listeria</i> em alimentos	48
5. Considerações finais	57
5. Referências	59
Anexos	75

2. *L. monocytogenes*

2.1. Características do microrganismo

Listeria é um parasita intracelular facultativo, com forma de bastonete pequeno, Gram positivo, anaeróbio facultativo e, segundo a classificação do Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt, 1994), pertence ao grupo 19 (bastonetes gram-positivos, regulares, não esporulados) juntamente com *Lactobacillus*, *Brochothrix*, *Carnobacterium*, entre outros. São bactérias móveis por flagelos peritríqueos, sendo a motilidade em geral expressa a 20 – 25°C, mas não a 37°C (Holt, 1994).

As bactérias do gênero *Listeria* são capazes de se multiplicar numa ampla faixa de temperatura e possuem atividade fermentativa sobre carboidratos, produzindo lactato sem produção de gás quando metabolizam glicose. Produzem catalase, mas não oxidase, e apresentam resultados positivos tanto no teste de Voges-Proskauer como no de vermelho de metila. O conteúdo G+C do DNA é de 36-42 mol% (Holt, 1994).

São seis as espécies atualmente aceitas como pertencentes ao gênero: *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. grayi* (Rocourt, 1999). *L. monocytogenes* é a principal espécie patogênica a humanos e animais (Rocourt, Seeliger, 1985; Farber, Peterkin, 1991) e *L. ivanovii* e *L. seeligeri* já foram relacionadas a casos de doenças em humanos. As demais espécies, porém, nunca o foram (Pagotto et al., 2006).

Os isolados de *Listeria* podem ser divididos em sorotipos (17) baseados nos antígenos somáticos e flagelares e são identificados, empregando-se o esquema alfa-numérico proposto por Seeliger e Höhne em 1979. Este esquema estabelece que os números (1/2, 3, 4, etc.) descrevem os antígenos somáticos, enquanto as letras (a, b, c, etc.) referem-se aos antígenos flagelares. Os isolados de *L. monocytogenes* podem pertencer a 14 sorotipos, a saber, 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 (Graves et al., 1999; Rocourt et al., 2000).

Os estudos realizados por Hofer et al. (2006) indicam que, aqui no Brasil, também os sorotipos 4b e 1/2a foram os mais freqüentes dentre os isolados de *Listeria monocytogenes* examinados por eles no período de 1969 a 2000.

A sorologia de *Listeria*, ao contrário do que ocorre com outros gêneros bacterianos, não tem função na identificação de isolados, porque diferentes espécies de *Listeria* podem apresentar perfis sorológicos idênticos. Mesmo tendo importância epidemiológica e apesar da existência de soros comerciais (Denka Senken, Japão), a sorologia de *L. monocytogenes* ainda é restrita a alguns laboratórios ao redor do mundo, pois o custo e dificuldade de aquisição destes soros impedem seu uso rotineiro.

2.2. A doença

Listeriose é considerada por muitos como uma zoonose, mas humanos podem ser considerados hospedeiros secundários do patógeno. Apesar de a principal via de contaminação de humanos ser a ingestão de alimentos contaminados (Farber, Peterkin, 1991), a transmissão através do contato com animais infectados também já foi descrita (McLauchlin, Low, 1994).

Kathariou (2002), entretanto, discorda da classificação “genérica” de listeriose como zoonose. Segundo esse pesquisador, a transmissão zoonótica de listeriose invasiva nunca foi documentada, o que coloca em discussão se seria ou não uma zoonose.

A listeriose humana é muito semelhante à dos demais mamíferos. Em adultos, a doença pode se manifestar tanto como forma invasiva como não invasiva. A doença invasiva é caracterizada por sintomas severos e os mais freqüentes são a meningite e a encefalite (Slutsker, Schuchat, 1999). Em mulheres grávidas, a listeriose pode levar ao parto prematuro e aborto, e causar no bebê sepse e meningite neonatal.

A forma invasiva de listeriose acomete principalmente mulheres grávidas, no terceiro trimestre da gravidez, indivíduos imunodeficientes, principalmente com câncer, transplantados, portadores de HIV, sob terapia imunossupressiva, além daqueles com mais de 65 anos (McLauchlin et al., 2004).

A forma não invasiva resulta em gastroenterite febril, conforme relatado por Schlech (1997) e por Dalton et al. (1997), e parece não afetar grupos populacionais específicos.

Somente o conhecimento profundo sobre o patógeno e sobre as populações de risco permitirá que sejam desenvolvidas estratégias adequadas para o controle dessa infecção nos diferentes grupos de indivíduos.

Assim como ocorre com outras bactérias, também existe para *Listeria monocytogenes* a figura do portador intestinal (Farber, Peterkin, 1991). Esses portadores podem ser pessoas saudáveis, mulheres grávidas, pacientes em hemodiálise ou que sofreram transplante renal, e pacientes com gastroenterite (Rocourt, Cossart, 1997). A taxa de portadores na população em geral varia entre 5-10% (Farber, Peterkin, 1991) e a importância destes indivíduos na epidemiologia das listerioses ainda não está estabelecida.

Também não está estabelecida a dose infecciosa de *L. monocytogenes*, seja para a síndrome invasiva ou para a não invasiva. Dados derivados de surtos ou casos esporádicos sugerem que esta dose seja elevada ($>10^6$ células). Por outro lado, há relatos de surtos provocados por populações tão baixas quanto $<10\text{UFC/g}$ de alimento (Valk et al., 2001).

Vázquez-Boland et al. (2001b) sugerem que a informação, relacionada à elevada população de *L. monocytogenes* encontrada nos alimentos envolvidos em surtos e casos esporádicos, seja interpretada com cuidado e levantam hipótese para explicar estes valores elevados. Segundo eles, como o período de incubação da listeriose invasiva e o tempo decorrido entre o diagnóstico da

doença e a análise dos alimentos consumidos são longos, o microrganismo pode ter multiplicado-se no alimento mantido sob refrigeração e atingido essa população.

Dados derivados de estudos realizados com camundongos, infectados experimentalmente via oral, mostraram uma DL_{50} relativamente alta de 10^9 células (Audurier et al., 1980; Okamoto et al., 1994).

Deve-se, entretanto, lembrar que a dose de infecção pode variar dependendo da patogenicidade e virulência da cepa envolvida e dos fatores de risco dos indivíduos expostos, além do tipo de alimento veiculador do patógeno. Alimentos ricos em gorduras, por exemplo, podem conferir a *Listeria monocytogenes* uma proteção às condições do ambiente estomacal ou durante a invasão do trato intestinal (Buchanan et al., 2000).

O período de incubação, no caso de gastroenterite febril, é de aproximadamente 20h após a ingestão de alimentos (Dalton et al., 1997), e para a forma invasiva pode chegar a até 20-30 dias (Linnan et al., 1988; Riedo et al., 1994).

Apesar da baixa morbidade associada à listeriose (aproximadamente 3 casos/ 10^6 habitantes/ano nos EUA) (CDC, 2006), a mortalidade relacionada à infecção é muito elevada, podendo em alguns casos atingir 50% (Rocourt et al., 2000). Com isso, listeriose é, dentre as ETA, a que causa maior número de mortes (Mead et al., 1999).

São poucos os relatos de casos de listeriose no nosso país e nunca foram relacionados ao consumo de alimentos. Os relatos encontrados referem-se a meningite, aborto, endocardite e isolamento a partir de material abortado (Hofer et al., 1998; Hofer et al., 1999; Hofer et al., 2000; Hofer et al., 2006; Landgraf et al., 1999; Schwab et al., 2003).

Num estudo retrospectivo (ANEXO 1), analisando 13 isolados de *L. monocytogenes*, enviados ao Laboratório Regional do Instituto Adolfo Lutz em Campinas e provenientes de casos clínicos ocorridos entre 1995-2005 naquela região, verificou-se a predominância de sorotipo 4b (77%), seguido de 1/2a (15%) e uma cepa 1/2b (8%). Esses isolados foram sensíveis a ampicilina, gentamicina, trimetopim e vancomicina, com o emprego do método de microdiluição (MIC). Cinco dos isolados apresentaram resistência intermediária ao sulfametoxazol e dois, ambos provenientes do mesmo paciente, foram

resistentes. Esse último dado é preocupante, porque a associação entre trimetropin e sulfonamidas é a terapia de escolha para tratamento de pacientes com intolerância à penicilina. Foram três os clones encontrados a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e as enzimas Apa I e Ascl, mas não se verificou relação espacial ou temporal entre as cepas. Infelizmente não havia dados epidemiológicos relativos aos casos e a fonte de exposição ao patógeno também não foi determinada.

Sabe-se que o relato de ETA em nosso país é deficiente, mesmo para as doenças mais freqüentes como as salmoneloses, já que não são de notificação compulsória (a exceção de botulismo). As avaliações de surtos são algumas vezes realizadas, quando envolvem grande número de pessoas, mas, mesmo assim, a fonte desta ETA freqüentemente não consegue ser identificada.

Se isso ocorre com causas mais comuns, o que se dirá com relação a *L. monocytogenes*? Apesar dos esforços feitos, muitos laboratórios de saúde pública ainda não fazem a pesquisa desse patógeno em amostras clínicas ou de alimentos e muitos médicos não estão alertas para a importância deste patógeno.

Uma sugestão para melhorar esse cenário seria a capacitação, real, dos laboratórios de saúde pública do país para fazer o isolamento e identificação de *L. monocytogenes*, entre outros patógenos. A seguir, através de mais treinamento, da conscientização dos técnicos e aporte de recursos, poder-se-ia estabelecer um sistema nacional que permitisse a genotipagem desses isolados e auxiliasse na identificação de surtos ou casos esporádicos de ETA, como já ocorre em outros países.

Espera-se que a aquisição, por parte do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de um equipamento automatizado para ribotipagem de bactérias sirva como incentivo ao Ministério da Saúde ou à ANVISA para iniciar um banco de dados sobre patógenos causadores de ETA em nosso país.

2.3. Patogênese e determinantes de virulência

A patogênese de *L. monocytogenes* é talvez a mais bem estudada dentre os patógenos de origem alimentar (Vázquez-Boland et al., 2001b; Kathariou, 2002; Dussurget et al., 2004).

L. monocytogenes é um microrganismo com excelente capacidade infectante, porque é capaz de atravessar barreiras protetoras gastro-intestinais, materno-fetais e sangue-cerebrais (Pagotto et al., 2006).

A listeriose típica inicia-se com a ingestão do microrganismo e sua sobrevivência às defesas não-específicas do sistema imunológico no trato gastro-intestinal. No intestino ocorre multiplicação e o microrganismo é excretado pelas fezes. A seguir, invade o epitélio intestinal e/ou das placas de Peyer, entra nos linfonodos mesentéricos e é disseminado, através da corrente sangüínea ou linfática, para o fígado e vesícula (Vázquez-Boland, et al., 2001b)

Essa etapa inicial de colonização do hospedeiro acontece rapidamente. O longo período de incubação necessário para o desenvolvimento da doença, após ingestão do microrganismo, não tem explicação. Ele pode indicar que a colonização dos tecidos do hospedeiro possa envolver uma fase silenciosa, sub clínica, ainda desconhecida (Vázquez-Boland et al., 2001a).

As bactérias circulantes (90%) são rapidamente eliminadas da corrente sangüínea, no fígado e na vesícula, por macrófagos residentes, entretanto as sobreviventes multiplicar-se-ão nos hepatócitos. Se o sistema imunológico do hospedeiro estiver ativo, 5 a 7 dias pós-infecção, já não se encontra *L. monocytogenes* nos órgãos (Vázquez-Boland et al., 2001b).

Se a infecção não for controlada por uma resposta imunológica adequada no fígado, como pode ocorrer com indivíduos imunodeficientes, a proliferação de *L. monocytogenes* nesse órgão pode levar à sua liberação na corrente sangüínea e, então, infectar uma variedade de tecidos. Sabe-se, porém, que *L. monocytogenes* tem tropismo para o sistema nervoso central e úteros grávidos (Vázquez-Boland et al., 2001b).

Na figura 1, tem-se a representação esquemática da pato-fisiologia da infecção por *Listeria monocytogenes*.

Figura 1: Representação esquemática da pato-fisiologia da infecção por *Listeria monocytogenes* segundo Vázquez-Boland (2001b).

Até alguns anos atrás, acreditava-se que o tropismo de *L. monocytogenes* pela placenta e a supressão da resposta imune-celular localizada da placenta (que é importante para evitar a rejeição do feto) fossem os principais fatores para a elevada suscetibilidade de mulheres grávidas à listeriose (Vázquez-Boland et al., 2001b).

Entretanto, trabalho de Backardjiev et al. (2006), utilizando porquinhos da índia prenhes como modelo de transmissão vertical do patógeno, apresenta uma outra explicação. Eles verificaram que a transferência da bactéria para a placenta é baixa (proporção 10^3 - 10^4 :1 entre fígado/vesícula e placenta), mas que esta única célula é capaz de se multiplicar rapidamente (atingindo a proporção 1:1, 24h pós-infecção). Uma vez colonizada, a placenta se torna um

foco de infecção e passa a enviar a bactéria para órgãos da mãe. Assim, o número elevado de *Listeria* na mãe não seria causado pela imunossupressão, mas sim pelo contínuo efluxo de *L. monocytogenes* a partir da placenta. Esse processo só poderia ser interrompido pela expulsão dos tecidos infectados (placenta e feto), através de aborto ou nascimento prematuro, como meio de garantir a sobrevivência da mãe. Os autores, entretanto, destacam que algumas questões ainda precisam ser esclarecidas, dentre elas se *L. monocytogenes* é transportada da placenta até os demais órgãos da mãe, através de monócitos ou de macrófagos (sabe-se que elas são transportadas “protegidas”).

São vários os fatores de virulência que *L. monocytogenes* tem que utilizar, na jornada intracelular, para sobreviver às defesas do sistema imunológico do hospedeiro.

Detalhes sobre o assunto podem ser encontrados nas revisões preparadas por Vázquez-Boland et al. (2001b) e por Dussurget et al. (2004). Aqui serão abordados apenas alguns aspectos gerais sobre o assunto.

Nos estudos em que foram empregadas culturas de tecidos para estudar o processo invasivo de *L. monocytogenes*, esta infecção acontece em 5 estágios bem definidos (Portnoy et al., 1992; Kuhn; Goebel, 1999):

1. Internalização do patógeno pela célula hospedeira
2. Fuga do vacúolo
3. Multiplicação da bactéria no citoplasma da célula hospedeira
4. Movimentação da bactéria no citoplasma por causa da polimerização de filamentos de actina da célula hospedeira em um dos polos da bactéria. Essa “cauda de cometa” direciona a bactéria para a célula hospedeira adjacente.
5. Após a destruição do vacúolo de dupla membrana que a circunda, *L. monocytogenes* está pronta para iniciar um novo ciclo de infecção.

Os genes de virulência essenciais para cada etapa do processo invasivo de *L. monocytogenes* já foram identificados e outros têm sido descritos. Na figura 2, microfotografias eletrônicas mostram as diferentes fases do ciclo intracelular de *L. monocytogenes* e os fatores de virulência envolvidos em cada etapa.

Para que ocorra a internalização de *L. monocytogenes*, há necessidade da presença de internalina A, proteína codificada pelo gene *inlA*, que interage com a E-caderina da célula epitelial do intestino. Após esta interação, o microrganismo induz sua captura pela célula hospedeira (Gaillard et al., 1991; Mengaud et al., 1996) (Estágio 1). Internalina B (gene *inlB*) está relacionada à penetração em outros tipos de células, como por exemplo hepatócitos (Dramsi et al., 1995).

Uma vez dentro da célula hospedeira, a bactéria escapa do vacúolo através da ação conjunta da listeriolisina O (LLO) com duas fosfolipases C (fosfotidilinositol – PI-PLC; fosfotidilcolina – PC-PLC). As PLCs atuam em sinergia com LLO na lise dos vacúolos (primários e secundários) (Camilli et al., 1993; Gedde et al., 2000). LLO também é fundamental para a sobrevivência e multiplicação intracelular do patógeno (Kuhn, Goebel, 1999) (Estágio 2). Os genes responsáveis pela codificação dessas enzimas são *hly* (LLO), *plcA* (PI-PLC) e *plcB* (PC-PLC). PC-PLC, uma lecitinase, é ativada por uma metaloprotease produzida pelo gene *mpl*.

A proteína ActA, produto do gene *actA*, é necessária para a movimentação intracelular e para a disseminação célula-célula (Estágio 4). Esta proteína induz a polimerização da actina presente no citoesqueleto da célula hospedeira, primeiramente como uma “nuvem” ao redor da bactéria, que depois se rearranja em um dos polos da bactéria para formar uma cauda de actina (Tilney, Portnoy, 1989; Kocks et al., 1992; Vázquez-Boland et al., 2001b).

Ao atingir a célula adjacente, a bactéria estará em um vacúolo de dupla membrana. Após a dissolução do vacúolo (Estágio 5) pela ação de LLO, PI-PLC e PC-PLC, a bactéria estará pronta para iniciar um novo ciclo.

A regulação destes genes de virulência está sob controle do fator de transcrição PrfA, codificado pelo gene *prfA*. Pelo que se sabe, PrfA é o único regulador identificado em *Listeria* spp. diretamente envolvido no controle da expressão dos genes de virulência (Vázquez-Boland et al., 2001b). Na figura 3, está a organização física e transcricional dos genes de virulência abordados neste item.

Os genes *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* e *plcB* estão agrupados em um *cluster*, conhecido como “cluster dos genes de virulência dependentes de PrfA”

(Chakraborty et al., 2000) ou, mais recentemente, como LIPI-1 (*Listeria* pathogenicity island 1 – ilha de patogenicidade 1 de *Listeria*) (Kreft, Vázquez-boland, 2001; Vázquez-Boland et al., 2001a). Além deles, 2 outros genes, *inlA* e *inlB*, são regulados por PrfA (Vázquez-Boland et al., 2001b).

Figura 2 – Ciclo de infecção por *L. monocytogenes*. 1. entrada; 2. lise do vacúolo; 3. multiplicação intracelular; 4. movimento intracelular e cauda de cometa; 5 e 6 – disseminação célula-célula; 7 e 8. formação e lise do vacúolo de dupla membrana. Os fatores de virulência envolvidos em cada etapa estão indicados. (fonte: Dussurget et al., 2004).

Figura 3 – Organização física e transcricional dos principais genes de virulência de *L. monocytogenes*. + efeito positivo na transcrição; - efeito negativo na transcrição (Pagotto et al., 2006).

A regulação da expressão do próprio *prfA* é muito complexa e envolve múltiplos transcritos de mRNA, mecanismos de retroalimentação (“feedback”) estimulatórios ou inibitórios, regulação pós-transcricional e uma interação inespecífica com cofatores de baixo peso molecular (Dickneite et al., 1998; Kuhn, Goebel, 1995). Reconhecidamente, o PrfA é capaz de ativar transcricionalmente promotores que contêm uma seqüência palindrômica (PrfA box) como aquela localizada nos operadores Pr_{plc} e Pr_{hly} do *operon* transcrito de forma divergente, conforme mostrados na Figura 3.

Já foi demonstrado que fatores externos à bactéria podem afetar a expressão dos genes de virulência ou a atividade do PrfA como, por exemplo, a temperatura (Leimeister-Wachter et al., 1992; Johanson et al., 2002); crescimento em presença de carvão ativado no meio de cultura (Ripio et al., 1996); tipo de carboidratos fermentáveis presente (Ripio et al., 1996), entre outros.

Também a exposição de *Listeria monocytogenes* a situações de estresse sub-letal, durante a produção de alimentos ou durante sua entrada no organismo, pode afetar sua capacidade em causar doença. Estudos têm

indicado que células do patógeno expostas a essas condições de estresse são mais virulentas que aquelas que não o foram (Kathariou, 2002).

Diversos genes de virulência de *L. monocytogenes* são reprimidos a temperaturas inferiores a 25°C, por exemplo, num alimento mantido sob refrigeração, porém esta repressão não afeta sua expressão após a infecção. O que se verifica é que algumas cepas recuperam esta habilidade mais rapidamente que outras, o que talvez seja relevante para o processo infeccioso (Kathariou, 2002).

Chico-Calero *et al.* (2002) verificaram que, quando o ambiente está favorável ao desenvolvimento da bactéria, ela utiliza as fontes de carbono convencionais, o que automaticamente leva à inibição da produção do fator PrfA e conseqüente diminuição da expressão dos fatores de virulência. Quando o ambiente está inóspito, como no interior da célula de mamíferos, o microrganismo utiliza hexose fosfato como fonte de energia e inicia-se a expressão dos fatores de virulência.

Um dos poucos estudos brasileiros que avaliou fenotipicamente a expressão de genes de virulência de *L. monocytogenes* foi conduzido por Silva *et al.* (2001) (Anexo 2). Nesse estudo, verificou-se que as 207 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de diferentes tipos de queijos brasileiros pertenciam aos 3 sorotipos mais freqüentemente envolvidos em surtos de ETA (1/2a, 1/2b e 4b) e que, dentre estas cepas, 171 (82,7%) tinham a capacidade de produzir lecitinase (PC-PLC), enquanto a totalidade delas produzia hemolisina (LLO). Um terceiro marcador de virulência (absorção de vermelho congo) foi também avaliado, mas não está relacionado especificamente a algum gene de virulência de *L. monocytogenes*. Verificou-se que 146 (70.5%) cepas tinham a capacidade de adsorver o corante.

Apesar do grande avanço ocorrido no conhecimento da patogênese celular de *L. monocytogenes*, no seqüenciamento total do DNA da bactéria com identificação de muitos genes que estão relacionados à virulência do microrganismo, mas sem terem seu papel definido, pouco se conhece da interação entre patógeno-hospedeiro, durante a passagem pelo trato gastrointestinal e a infecção.

Estudo desenvolvido na França pelo grupo coordenado por Cossart mostrou que os camundongos, que sempre foram utilizados como modelo para estudo de patogênese e infecção causada por *L. monocytogenes*, não são adequados para estudos de interação patógeno-hospedeiro (Lecuit et al., 2001).

Isso porque a E-caderina das células epiteliais do intestino dos camundongos não interage com a internalina A, produzida por *L. monocytogenes*, responsável pelo processo de invasão. Com isto, a DL₅₀ elevada para camundongos e já apresentada neste estudo (item 2.2) precisa ser revista.

O emprego de camundongos transgênicos que expressem E-caderina humana pode auxiliar no entendimento dos diferentes estágios da infecção humana por este patógeno e explicar por que as infecções sistêmicas são raras, apesar da frequente exposição de humanos à bactéria.

2.4. Genética populacional e virulência

A caracterização da genética populacional de *L. monocytogenes* tem sido realizada com o emprego de uma variedade de métodos moleculares para a subtipagem dos isolados. Wiedman (2002 a e b) realizou uma revisão detalhada desses métodos e verificou que todos eles indicam que *L. monocytogenes* pode ser separada em três grupos genéticos, ou linhagens, conforme ele e seus colaboradores já haviam verificado em 1997 (Wiedman et al., 1997). Com o aprofundamento desses estudos, o grupo conseguiu caracterizar melhor as cepas de cada linhagem.

O grupo genético I (Linhagem I) compõe-se de isolados dos sorotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e, e a maioria das cepas analisadas pertencia a isolados clínicos humanos originários principalmente de surtos epidêmicos (Jeffers et al., 2001).

O grupo genético II (linhagem II) é composto por isolados pertencentes aos sorotipos 1/2a, 3a, 1/2c e 3c, com cepas provenientes principalmente de alimentos (Gray et al., 2004).

Isolados de *Listeria monocytogenes* com características genéticas ou fenotípicas atípicas pertencem à linhagem III, sendo mais comum sua identificação entre isolados de animais com listeriose clínica (Jeffers et al., 2001; Gray et al, 2004).

Esses dados sugerem que possa existir um grupo de cepas de *L. monocytogenes* (Linhagem I), ou mesmo subgrupos desta linhagem, que têm maior probabilidade de causar doença em humanos, quando presentes nos alimentos, do que cepas da linhagem II. Estudos de expressão fenotípica de características relacionadas à virulência, realizados com cultura de tecidos, também têm indicado que cepas da Linhagem I são mais virulentas que aquelas da linhagem II (Wiedman, 2002 a).

É interessante notar que à Linhagem I pertencem cepas dos sorotipos "b", "d" e "e", e à Linhagem II pertencem os "a" e "c". Pagotto et al. (2006) levantam a hipótese que possam existir genes sorotipo-específicos que expliquem a maior capacidade dessas linhagens em causar doença.

Estudos relacionados à genética populacional de *L. monocytogenes* têm demonstrado, ainda, que os isolados pertencentes ao sorotipo 4b podem ser sub-divididos em 3 clones, sendo 2 deles relacionados a diversos surtos de listeriose humana (Jeffers et al., 2001; Kathariou, 2002). O terceiro clone foi identificado em cepas relacionadas a 2 surtos de listeriose ocorridos nos EUA e causados pelo consumo de salsicha e "deli meat" (Kathariou, 2002).

Gray et al. (2004) compararam a frequência destes 3 grupos clonais entre isolados clínicos humanos e isolados de alimentos e verificaram que eles são significativamente mais comuns no primeiro grupo de isolados que no segundo. Esses resultados indicam que certos grupos clonais podem apresentar características feno-e genotípicas que lhes dão uma capacidade diferenciada em causar doença em humanos.

As cepas pertencentes à Linhagem III possuem um ancestral comum com as da Linhagem I, porém apresentam características genéticas distintas (Gray et al., 2004). Apesar de serem de interesse nos estudos relacionados à evolução ou genética da população desta espécie bacteriana e de serem relacionadas à infecção de animais, essas cepas parecem ter pouca importância como contaminantes de alimentos (ILSI, 2005).

A maioria dos estudos de patogenicidade de *L. monocytogenes* é realizada com o emprego da cepa EGD, uma linhagem virulenta e comum a muitos laboratórios ou, então, cepas de coleção de cultura, como a NCTC 7973, ambas sorotipo 1/2a. Entretanto, em estudos realizados por Behari; Youngman (1998), verificou-se que Lm7973 apresenta 2 mutações no *prfA* que levam a um comportamento anômalo destas cepas.

Assim, apesar do nível de detalhamento existente até o momento, os dados gerados não fornecem subsídios para o perfeito entendimento sobre o potencial de virulência de “isolados de campo” e a possibilidade de um determinado isolado causar doença (Kathariou, 2002).

Pensando nisso, desenhou-se um estudo empregando cepas de *L. monocytogenes*, recém isoladas de alimentos e/ou ambiente de planta processadora de alimentos brasileiros, e também cepas isoladas de casos clínicos, para avaliar sua potencialidade em causar doença.

Parte desse estudo desenvolvido por C.D. Cruz (Anexo 3), sob nossa orientação e de M.B. Martinez, foi realizada no Brasil e parte na University of Bristol, com a cooperação de J.A. Vázquez-Boland. Para tanto, foram selecionadas 2 cepas sorotipo 4b (uma de ambiente de processamento e uma de caso clínico ocorrido no Brasil), uma cepa de sorotipo 1/2b e uma 1/2c isoladas de alimentos que foram submetidas simultaneamente aos diferentes testes. Como controles, empregaram-se as cepas P14, isoladas em um surto de listeriose ocorrido na Espanha, e P14A, um mutante espontâneo que expressa constantemente PrfA e é fortemente hemolítico (Ripio et al., 1997). Ambas cepas controle são do sorotipo 4b.

Os resultados obtidos até o momento indicam que as cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 4b de origem clínica apresentam maior capacidade de invadir macrófagos murinos J774 e de sair deles, 24h após infecção, que as cepas 1/2. Possuem também maior capacidade de invadir células epiteliais derivadas de rim bovino (MDBK) e fibroblastos de camundongo (L929). Apresentam também maior citopatogenicidade e capacidade de proliferação tanto em células MDBK como em HeLa. Entretanto, a cepa 1/2c (Linhagem II) tem apresentado alguns resultados surpreendentes. Apresenta, também, forte atividade fosfolipídica e hemolítica; capacidade de proliferação em células MDBK semelhante à cepa 4b clínica; citopatogenicidade em fibroblastos

murinos maior que a 4b clínica, mas não em células MDBK e HeLa. Em muitos desses testes, o desempenho dela foi semelhante ao controle P14A.

Os resultados indicam que a patogenicidade das cepas não é dependente de sorotipo, mas que aquelas que já estiveram envolvidas em casos de doença/surtos têm alguma característica especial que as torna mais virulentas. Outros estudos ainda devem ser realizados para caracterizar melhor estas cepas.

3. *L. monocytogenes* e os alimentos

A ocorrência de listeriose de origem alimentar é relatada principalmente em países industrializados e com poucos, ou nenhum relato em países em desenvolvimento. Entretanto, não se sabe se isso reflete diferentes taxas de exposição, hábitos alimentares, suscetibilidade do hospedeiro ou falta de sistemas de pesquisa e informação de dados (FAO, 1999).

Os alimentos considerados de risco elevado para a transmissão de listeriose são aqueles que têm potencial para contaminação por *L. monocytogenes*; são capazes de permitir a multiplicação de *L. monocytogenes*; são prontos para o consumo e têm vida de prateleira longa em temperatura de refrigeração (Rocourt *et al.*, 2000; ILSI, 2005).

A fim de prevenir a contaminação e a multiplicação de *L. monocytogenes* nos alimentos, há necessidade de empregar uma abordagem baseada em risco que considere a cadeia produtiva como um todo, desde a produção primária até o consumidor final. Isso exige esforço conjunto dos diversos setores envolvidos com a produção do alimento e com a educação do consumidor.

Para que estratégias para redução da contaminação e multiplicação de *L. monocytogenes* nos alimentos sejam elaboradas, é necessário conhecer a importância deste micorganismo para os alimentos; sua distribuição no ambiente, nas plantas de processamento e nas residências de um dado país. O desenvolvimento de estratégias baseadas na extrapolação de dados de um

outro país pode levar à elaboração de planos de combate ao patógeno que se mostrem ineficazes.

A presença de *L. monocytogenes* em alimentos pode ser derivada da matéria prima que é contaminada, ainda no campo, por insumos, água, etc. Ela pode também ocorrer pela contaminação durante ou pós- processamento, uma vez que o microrganismo possui a capacidade de colonizar plantas processadoras de alimentos e se estabelecer em nichos a partir dos quais, continuamente ou intermitentemente, contamina os alimentos.

Dentre os patógenos não esporulados veiculados por alimentos, *L. monocytogenes* é o que tem mais condições de sobreviver e multiplicar em condições ambientais extremamente desfavoráveis. Além disto, possui capacidade de formar biofilmes que a torna um pesadelo para a indústria de alimentos.

Avanços nas técnicas de processamento, conservação, embalagem, distribuição e armazenamento de alimentos têm permitido à indústria produzir uma grande variedade de produtos com vida útil cada vez mais longa e com características mais semelhantes ao alimento *in natura*. Com isso, as chances de haver elevadas populações de *L. monocytogenes* no alimento, no momento do consumo, ficam bastante aumentadas.

3.1. Fatores físicos e químicos e sua influência sobre *L. monocytogenes*

Revisões bastante completas sobre estes parâmetros podem ser encontradas em Lou; Yousef (1999) e ICMSF (1996). Como muitos destes parâmetros já foram estabelecidos há vários anos, estas referências serão utilizadas como base para esse item.

As informações apresentadas a seguir devem ser avaliadas com cuidado, pois muitos dos estudos foram realizados em meios de cultura ou em alimentos artificialmente contaminados com cepas recém-ativadas. Isso não representa a situação encontrada em um alimento naturalmente contaminado, principalmente no que diz respeito ao estado fisiológico da célula bacteriana.

Também deve-se levar em consideração as variações de comportamento das diferentes cepas utilizadas e as interações existentes entre os diversos fatores, quando se tem um sistema tão complexo como o alimento.

3.1.1. Temperatura

A temperatura a que um alimento é exposto pode ser letal aos microrganismos presentes ou pode permitir, ou não, sua multiplicação. Temperaturas $<10^{\circ}\text{C}$ ou $>65^{\circ}\text{C}$ são consideradas pelo Código Sanitário do Estado de São Paulo (Portaria CVS 6/99) como adequadas para a manutenção dos alimentos (São Paulo, 1999).

L. monocytogenes pode se multiplicar numa ampla faixa de temperatura que varia de $<0^{\circ}\text{C}$ a 45°C , dependendo da cepa e do meio em que ela se encontra, mas a temperatura ótima está entre $30-37^{\circ}\text{C}$ (Lou; Yousef, 1999; Rocourt, 1999).

O trabalho de Barbosa et al. (1994) mostrou variação significativa na taxa de crescimento de 39 cepas de *L. monocytogenes*, especialmente a temperatura de refrigeração. A fase *lag* para estas 39 cepas variou entre 69.8 e 270h a 4°C , e entre 36,5 e 68,9h a 10°C . Eles verificaram que a cepa de *L. monocytogenes* Scott A, uma cepa comumente utilizada em estudos envolvendo alimentos, apresentou a mais longa fase *lag* a 4°C .

Este dado é de extrema importância pois, dependendo da cepa empregada num teste desafio (*challenge test*), podem-se ter resultados e tirar conclusões que podem afetar a inocuidade do alimento.

L. monocytogenes pode sobreviver ao congelamento e ao armazenamento nesta condição por longos períodos, quando em alimentos. O emprego de congelamento rápido a -50°C , seguido de armazenamento a -18°C por 240-300 dias, teve efeito muito pequeno sobre a população viável de *L. monocytogenes* nos diversos alimentos avaliados (Gianfranceschi, Aureli, 1996).

O comportamento de *L. monocytogenes* frente ao tratamento térmico foi motivo de conflito entre pesquisadores por vários anos, como consequência de resultados controversos obtidos em diferentes estudos. Entretanto, em 1988,

baseada em dados de estudos realizados por diferentes grupos de pesquisadores, a Organização Mundial da Saúde (OMS) concluiu que a pasteurização é um processo seguro para a redução da população de *L. monocytogenes* em leite cru (WHO, 1988).

Estudos relacionados ao tratamento térmico, que utilizam, porém, outras matrizes alimentícias como por exemplo, produtos cárneos e ovos, também foram realizados e os resultados foram compilados por Farber; Peterkin (1999) e por Cox et al. (1999). Nesses estudos, os resultados são bastante variados e dependem principalmente do tipo e composição do alimento (p. ex. peito de frango ou embutido) e do tipo de tratamento empregado (calor seco ou calor úmido).

O Código Sanitário do Estado de São Paulo estabelece que a temperatura de 74°C seja atingida no interior dos alimentos submetidos ao processo de cocção, mas admite também o emprego de 65°C/15' ou 70°C/2' (São Paulo, 1999). O Departamento de Agricultura dos EUA (USDA), através do Food Safety and Inspection Service (FSIS), estabelece que, para considerar produtos cárneos ou pescados cozidos, deve-se atingir entre 63-74°C no ponto mais frio, dependendo de sua composição (FSIS, 2006). Esses valores, entretanto, não visam especificamente a inativação de *L. monocytogenes*.

Vale lembrar que, apesar de sensível ao tratamento térmico aplicado aos produtos, *L. monocytogenes* é muitas vezes neles reintroduzida por contaminação pós-processamento.

3.1.2. Atmosfera envolvendo o alimento

Por ser uma bactéria anaeróbia facultativa, *L. monocytogenes* pode se multiplicar tanto em presença como em ausência de oxigênio. A capacidade de multiplicação em baixas tensões de O₂, associada à estocagem refrigerada, faz deste patógeno um problema principalmente para alimentos embalados a vácuo ou em atmosfera modificada, e mantidos sob refrigeração. É o caso p.ex., de produtos cárneos fatiados (salame, presunto) e frutas e hortaliças minimamente processadas.

Se, por um lado, o emprego de atmosfera modificada, ativa ou passivamente, inibe boa parte da microbiota aeróbia responsável por problemas de deterioração do produto, por outro lado facilita a multiplicação de patógenos como *L. monocytogenes*.

Assim, o emprego de atmosfera modificada ou de embalagem a vácuo, mesmo combinado com baixas temperaturas, não tem efeito sobre *L. monocytogenes* se outras barreiras não forem utilizadas.

3.1.3. Processamento não térmico de alimentos

Dentre os processamentos físicos não térmicos, empregados para a redução da contaminação de alimentos, pode-se destacar a irradiação, o emprego de campos elétricos pulsados de alta intensidade (*high-intensity pulsed electric fields*) e a alta pressão. Esses processos, apesar de ainda terem aplicação restrita, vêm ganhando importância.

A irradiação gama é, sem sombra de dúvida, o mais estudado desses processos não térmicos e nos últimos 5 anos uma grande quantidade de artigos sobre o assunto voltou a ser publicada.

Estudos têm demonstrado que, de maneira geral, *L. monocytogenes* apresenta uma radio-resistência superior às células vegetativas de outros patógenos, tanto Gram-positivos como Gram-negativos, quer seja em meios de cultura ou em alimentos (Kamat et al., 2000; Dhokane et al., 2006). Essa rádio-resistência é dependente de diferentes fatores como a cepa, a fase do crescimento bacteriano em que a bactéria se encontra, o alimento (sua composição, estado físico, etc.) (Sommers et al., 2005; Sommers et al., 2003; Zhu et al., 2005).

Os valores D_{10} (dose necessária para inativar 90% da população microbiana) relatados variam de 0.18 a >2.0 kGy (ICMSF, 1996).

Estudos avaliando a eficiência da utilização da irradiação na redução da população de *L. monocytogenes* em hortaliças minimamente processadas estão sendo conduzidos no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF-USP, mas os resultados ainda são preliminares.

3.1.4. pH

Assim como ocorre com os demais parâmetros, a faixa de pH que permite a multiplicação de *L. monocytogenes* é muito ampla, variando entre 4,3 (Farber et al., 1989) e 9,6 (Lou; Yousef, 1999), mas o pH ótimo está entre 6 e 8 (ICMSF, 1996).

A multiplicação de *L. monocytogenes* em pHs ácidos ocorre quando a temperatura de incubação está próxima da ótima (30-37°C) e a longa fase lag é superada. O tipo de ácido presente também tem grande influência na multiplicação deste patógeno (Lou; Yousef, 1999).

Porém, quando se avalia a sobrevivência do patógeno em meios ácidos, o comportamento é ligeiramente diferente. *L. monocytogenes* sobrevive por períodos mais longos em meios com pHs mais baixos quando mantida sob refrigeração ($T < 5^{\circ}\text{C}$) (Parrish; Higgins, 1989). Esta informação é significativa principalmente quando se trata de iogurtes, queijos e produtos cárneos fermentados como o salame.

3.1.5. Atividade de água (a_w)

Também para este parâmetro *L. monocytogenes* tem um comportamento diferenciado, podendo se multiplicar em valores de a_w tão baixos quanto 0,90, sendo, dentre os patógenos causadores de ETA, superado apenas por *S. aureus*. Como a maioria das espécies bacterianas, a a_w ótima para a multiplicação está acima de 0,97.

O agente empregado para a redução da a_w tem influência direta na multiplicação do patógeno. Assim, quando se utiliza NaCl, a menor atividade de água que permite a multiplicação do patógeno é 0,92 ($\approx$ 12% NaCl; 39,4% sucrose) e de 0,90, quando o agente é o glicerol.

Apesar de não se multiplicar em a_w inferior a 0,90, *L. monocytogenes* pode sobreviver por períodos longos nessa condição, além de apresentar resistência térmica mais elevada (Lou; Yousef, 1995). Com isto, *L. monocytogenes* é um problema para as indústrias que manufaturam alimentos com elevadas concentrações de açúcares (como xarope de glicose) ou para a

indústria cárnea, uma vez que pode sobreviver em salames com a_w de 0,79 a 0,86 por até 84 dias quando mantidos a 4°C (Johnson et al., 1988).

3.1.6. Componentes antimicrobianos dos alimentos

Alguns componentes dos alimentos, sejam eles adicionados, formados durante o processamento, ou naturalmente presentes, podem possuir atividade antimicrobiana contribuindo assim para a conservação do alimento.

Entretanto, não se deve esquecer que a preservação de um alimento é resultado de uma combinação multifatorial e nenhum destes componentes listados atua sozinho.

Dentre os ingredientes intencionalmente adicionados aos alimentos e com propriedades antimicrobianas, o cloreto de sódio é, sem sombra de dúvidas, importante e sua relação com *L. monocytogenes* foi apresentada no item a_w (apesar de sua atuação não ser restrita à diminuição da a_w).

Os ácidos orgânicos e seus sais também são agentes antimicrobianos estudados há tempos. Sabe-se que sua forma não dissociada interfere com os processos metabólicos da célula bacteriana. O efeito anti-listeria dos ácidos orgânicos depende tanto do tipo de ácido presente quanto de sua concentração, mais do que do pH da solução/ alimento.

Nitrito de Sódio, agente antimicrobiano de importância principalmente para a indústria cárnea, tem efeito listerostático dependente do pH do meio/ alimento. Testes realizados por McClure et al. (1991) e por Buchanan et al. (1994) mostraram que em pHs $\geq 6,0$ até mesmo 400µg/ml de nitrito de sódio não apresentam atividade anti-listeria. Entretanto, em pHs $< 6,0$, 50µg/ml foram ativos.

O emprego de bactérias lácticas (BAL), de BAL produtoras de bacteriocinas (bacBAL) ou de bacteriocinas purificadas, no controle de *L. monocytogenes* em alimentos, tem sido muito estudado.

As BAL atuam competindo por nutrientes e/ou através da produção de compostos como ácidos fracos, peróxido de hidrogênio, diacetil ou mesmo de bacteriocinas (Lou, Yousef, 1999). As bacteriocinas podem atuar de diversas maneiras, mas em geral desestabilizam a membrana citoplasmática das células

sensíveis, aumentando a permeabilidade desta membrana e dissipando a força próton-motriz pela formação de poros (Jack et al., 1995).

Como a adição de bacteriocinas aos alimentos está sujeita a restrições de legislação e a adição de BAL não, por serem consideradas seguras (GRAS – general regarded as safe), diversos estudos têm sido conduzidos buscando-se encontrar, em diferentes produtos alimentícios, onde *L. monocytogenes* pode ser um problema, BAL endógenas com capacidade de produzir bacteriocina. Além de estarem adaptadas ao produto, estas BAL não devem alterar as características sensoriais destes alimentos.

Buscando avaliar a possibilidade de emprego de bacBAL no controle de *L. monocytogenes* em alimentos, destacam-se aqui dois estudos desenvolvidos.

No primeiro (Anexo 4), *Lactobacillus sake* 2a, uma bacBAL isolada de lingüiça frescal no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF-USP (DeMartinis; Franco, 1997), foi utilizada na produção de lingüiça frescal artificialmente contaminada com *L. monocytogenes*. As lingüiças foram embaladas em atmosfera modificada, armazenadas sob refrigeração (6°C) e examinadas semanalmente por até 28 dias. Verificou-se que, em presença de *L. sake* 2a, tanto as amostras embaladas em 100% CO₂ como aquelas embaladas em 50% CO₂/50%N₂ apresentaram populações significativamente menores que os controles ($p < 0,05$), indicando efeito sinérgico entre embalagem e bacBAL (Liserre et al., 2002).

No segundo estudo (ANEXO 5), avaliou-se *in vitro* a efetividade de uma cepa de *Carnobacterium piscicola* (C2), uma BAL isolada de surubim defumado, sobre uma cepa de *L. monocytogenes* também isolada do produto. Utilizou-se três sistemas modelo que foram mantidos a 10°C, temperatura considerada de abuso para refrigeração em países de clima temperado, mas não rara em países tropicais. O crescimento da cepa de *L. monocytogenes* foi inibido pela cepa C2 por causa da produção de bacteriocina, mas não pela cepa bacteriocinogênica controle (*C. piscicola* A9b⁺) em caldo de peixe (peptona de peixe, extrato de levedura, NaCl), enquanto nos outros dois sistemas (suco de salmão e suco de surubim) tanto C2 como A9b⁺ foram efetivas na inibição do patógeno. Esse estudo reforça a importância de se

isolar e avaliar cepas bioprotetoras específicas para cada produto alimentício (Alves et al., 2005).

3.1.7. Estresse

Na natureza, as bactérias estão sujeitas a várias fontes de estresse ambiental, tais como variações de temperatura, condições oxidativas ou ácidas, falta de nutrientes. Essas condições de estresse levam-nas a desenvolver respostas estresse-induzidas.

L. monocytogenes não é exceção a essa regra. No ambiente de processamento, nos alimentos ou mesmo *in vivo* durante a infecção, *L. monocytogenes* está exposta a muitos sinais de estresse que não só desencadeiam uma maior resistência às condições ambientais desfavoráveis, como também afetam a patogenicidade do microrganismo (Kathariou, 2002).

A resposta de *L. monocytogenes* a um tipo de estresse, por exemplo, pH sub-letal, leva-a a desenvolver não só maior tolerância a pHs baixos, como também a maior resistência térmica, maior resistência a doses letais de peróxido de hidrogênio, ao NaCl e a etanol (Lou; Yousef, 1999).

Isso indica que existe um intrincado mecanismo relacionado aos diferentes tipos de resposta do patógeno ao estresse. A adaptação e sobrevivência de *L. monocytogenes* às diferentes condições não letais e o seu efeito sobre a virulência são decorrentes da indução de expressão de uma série de genes que já foram identificados. Apesar disso, estudos ainda precisam ser realizados para identificar o impacto das etapas de processamento que promovem esta adaptação e o potencial aumento de virulência de *L. monocytogenes*.

3.2. Ocorrência e comportamento de *Listeria monocytogenes* em alimentos

Numerosos estudos sobre a ocorrência de *L. monocytogenes* em alimentos têm sido realizados ao redor do mundo, desde que se comprovou a veiculação do patógeno através de alimentos.

Um dos aspectos interessantes desse microrganismo é que não se pode afirmar que exista alimento mais ou menos suscetível à contaminação por essa bactéria. *Listerias* já foram isoladas de carnes de bovinos, suínos, aves, frutos do mar e de seus derivados crus ou prontos para o consumo; de leite e derivados, principalmente queijos macios e também de ovos. Também já o foram de vegetais, tais como hortaliças e frutas, saladas prontas para o consumo e brotos de vegetais. No livro *Listeria, Listeriose and Food Safety*, há capítulos inteiros dedicados a cada um destes grupos de alimentos (Ryser, 1999a e b; Farber; Peterkin, 1999; Cox et al., 1999; Jinnemann et al., 1999; Brackett et al., 1999).

Aqui no Brasil, os estudos sobre ocorrência de *Listeria* em alimentos começaram a ser realizados em 1986. Nosso trabalho de mestrado (Anexo 6) foi o primeiro sobre o assunto. Neste estudo, avaliou-se a presença de *Listeria* sp em amostras de carne moída, salsichas a granel, lingüiça frescal e queijo minas frescal adquiridas no comércio varejista de Campinas, SP. Examinaram-se também amostras de leite cru e leite pasteurizado colhidas em uma usina processadora na mesma cidade. Verificou-se que *Listeria monocytogenes* estava presente entre 65 e 80% das amostras de produtos cárneos e em 10% das amostras de queijo minas, mas não estava presente nas amostras de leite, tanto cru como pasteurizado (Destro et al., 1991).

Até 5 anos atrás, ainda eram escassos os dados sobre a ocorrência desta bactéria em alimentos brasileiros. Num levantamento feito pelos alunos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF-USP, verificou-se que entre 1990 e 2000 foram publicados, ou apresentados em congressos na forma de posteres, somente 29 trabalhos sobre o assunto realizados por pesquisadores brasileiros. A partir de 2000, o número de pesquisadores que desenvolvem estudos com o patógeno aumentou bastante, o que é muito bom.

Na Tabela 1, há dados sobre a ocorrência de *Listeria* sp e de *L. monocytogenes* em alimentos brasileiros, derivados de alguns estudos nos quais participamos e que foram apresentados em congressos ou publicados.

Uma vez que os resultados referentes à pesquisa de *L. monocytogenes* em leite, obtidos no mestrado, eram derivados de amostras colhidas num curto período de tempo (janeiro a maio 89), foi decidido avaliar se a presença deste

microorganismo em leite tinha caráter sazonal (Anexo 7). Para isto, avaliou-se mensalmente, durante o período de um ano, a presença de *L. monocytogenes* em amostras de leite cru e pasteurizado, dos tipos B e C, colhidas numa usina de processamento na cidade de São Paulo. Verificou-se que *L. monocytogenes* estava presente em 21 (9,5%) das amostras de leite cru (7 tipo B e 14 tipo C), mas em nenhuma das de leite pasteurizado. Com relação à sazonalidade, notou-se que o isolamento de *L. monocytogenes* foi mais freqüente nas amostras de leite cru tipo B durante os meses de outubro 89-janeiro 90 e julho-setembro 90, sem que tenha havido isolamento do gênero no período entre fevereiro e junho daquele ano. Esses resultados indicam uma correlação entre mês de produção e ocorrência de *L. monocytogenes* em leite cru tipo B. Por outro lado, durante todo o período isolou-se *Listeria* sp em todas as amostras de leite C (Moura et al., 1993).

Nota-se, pelos dados apresentados na Tabela 1 e também no texto, que *L. monocytogenes* é, em nosso país, um patógeno de importância principalmente para alimentos de origem animal prontos para o consumo como os embutidos ou o peixe gravlax. Por outro lado, leite pasteurizado e saladas prontas para o consumo, que em outros países mostram-se frequentemente contaminados, aqui não o são.

Antes que se possa tirar qualquer conclusão com relação a esse comentário, dois pontos importantes devem ser considerados. Nos embutidos, fatiados nos pontos de venda (presunto, mortadela) ou comprados a granel, como foi o caso de salsicha, deve-se levar em consideração que a contaminação possa ter ocorrido no ponto de venda e não ser proveniente do produtor.

Com relação às saladas prontas para o consumo (Anexo 8), apesar de baixa ocorrência de *L. monocytogenes*, elas apresentaram de maneira geral baixa qualidade higienico-sanitária com 74,4% das amostras em desacordo com a legislação vigente (Brasil, 2001) quer pela presença de populações excessivas de coliformes fecais, quer pela presença de *Salmonella*.

Tabela 1 - Ocorrência de *Listeria* sp e *L. monocytogenes* (Lm) em alguns alimentos brasileiros.

Amostra (nº)	<i>Listeria</i> sp %	<i>Lm</i> %	Fonte
Camarão (178)	50	18%	Destro, Piva, Leitão, Landgraf, 1994
Lingüiça frescal (44)	86	-	Paschoal, Destro, 1997
Queijo Minas frescal (40)	7,5	-	
Peito de frango (30)	80	-	
Salmão "in natura" (25)	-	48	Silvestre, Destro, 1999
Mortadela (30)	-	26,7	Bersot et al., 2001
Nuggets de frango (25)	100	100	Rodrigues et al., 2002
Mortadela fatiada embalada a vácuo (45)	-	100	Bersot et al. (Anexo 12)
Salmão Gravlox (resfriado, 25)	-	15	Kinoshita et al., 2000
(congelados, 25)	-	35	
Queijo coalho (84)		19	Branco et al., 2003
Presunto	65	50	Aragon et al., 2005
Salsicha	40	30	
Carne moída	97,5	67,5	
Salame fatiado embalado a vácuo (45)	-	6,7	Sakate et al., 2003
Saladas de hortaliças minimamente processadas (181)	4	0,6	Fröder et al. (Anexo 8)
Carcaças Kosher de bovinos			Sakate et al., 2004
Lingüiça mista frescal (5)	100	100	von Laer et al., 2005

Além de avaliar a ocorrência de *Listeria monocytogenes* em produtos finais, é importante que seja conhecido seu comportamento durante o processamento de alimentos e avaliada a influência da formulação, ingredientes e da microbiota presente.

Com este intuito, realizaram-se dois estudos buscando entender o comportamento de *L. monocytogenes*, durante o processamento de embutidos cárneos, e um outro estudo, relacionado ao comportamento do patógeno em queijo minas frescal, que esta sendo realizado.

No estudo feito com mortadela (Anexo 9), buscou-se avaliar 3 hipóteses que poderiam explicar a elevada freqüência de contaminação encontrada no produto no comércio: 1. a presença de população elevada de *L. monocytogenes* na matéria prima que permitiria a sobrevivência de algumas células após a cocção; 2. efeito protetor que as diferentes formulações poderiam ter sobre a resistência térmica do microrganismo; e 3. recuperação e multiplicação durante a estocagem de células injuriadas por tratamento térmico sub-letal.

Assim, empregando-se 2 formulações diferentes ("top" e "pop") prepararam-se as massas que foram contaminadas com 2 níveis de *L. monocytogenes* (10^0 - 10^1 UFC/g e 10^2 - 10^3 UFC/g) e que, após embutimento, foram cozidas até que se atingisse 74°C no ponto mais frio. Após resfriamento, parte das mortadelas foi estocada a 7°C e parte a 25°C por até 30 dias. A população de *L. monocytogenes* foi avaliada empregando-se a técnica do número mais provável (NMP/g), a cada 10 dias, do dia zero (24h após produção) até dia 30 e também no produto não cozido para se determinar a população inicial.

Os resultados mostraram que, independentemente da população inicial do patógeno e da formulação do produto, *L. monocytogenes* foi eliminada com o tratamento térmico empregado, sem que tenha ocorrido influência dos sais de cura e/ou do teor de gordura na resistência térmica do patógeno. A possibilidade de ocorrência de injúria sub-letal também foi descartada, pois mesmo após 30 dias de armazenamento a 7°C ou a 25°C, a população de *L. monocytogenes* permaneceu <0,3NMP/g. Concluiu-se que o tratamento térmico adequado, seguido de manipulação cuidadosa pós-processamento, elimina o risco de veiculação de listeriose por este produto (Bersot et al, 2001).

No outro estudo (Destro et al., 1998) (Anexo 10 a e b), avaliou-se a eficiência de dois tipos de culturas iniciadoras, empregadas na preparação de salames, no controle de *Listeria monocytogenes* no produto. Para tanto, preparou-se a massa de salame tipo Milano, contaminou-se com *L. monocytogenes* (10^3 UFC/g) e dividiu-se a massa em 2 lotes, agregando-se a um deles cultura iniciadora Flora Carn LC (cultura em teste) e ao outro, Flora Carn SL 200 (cultura padrão), ambas da CHR Hansen (Dinamarca). O processamento foi repetido 3 vezes. Durante o processo de maturação, que durou aproximadamente 30 dias, avaliou-se diariamente a_w , pH e quebra do produto, e a cada 3 dias, avaliou-se a presença de *L. monocytogenes*.

Os resultados mostraram que, durante todo o processo de maturação até o produto estar pronto para comercialização, *L. monocytogenes* pode ser isolada dos salames controle, mas não daqueles produzidos com a cultura teste. Com base nestes resultados, pode-se concluir que, se *L. monocytogenes* estiver presente em número elevado na matéria prima e se culturas iniciadoras que não produzam bacteriocina forem empregadas na produção de salames, o produto pode veicular o patógeno.

Apesar de os resultados encontrados neste estudo com salame serem interessantes, mais estudos devem ser feitos para que se avalie a população do patógeno encontrada no produto final. A determinação desta população no produto final pode ajudar a determinar o risco desse alimento causar listeriose.

Listeria monocytogenes é encontrada em queijos macios ao redor do mundo em percentagens que variam de 2 a 46%, conforme pode ser visto na Tabela 2, sendo que na maioria dos estudos a positividade é elevada. No Brasil sua frequência em queijo macio também é variável, entre 0 e 41% (Tabela 3). Entretanto, na maioria dos estudos esta frequência é bem baixa.

Por outro lado, as populações de coliformes (totais ou fecais) nesses queijos brasileiros são bastante elevadas. Estudos recentes de Rocha et al. (2006) mostraram que ainda hoje as populações de coliformes totais e coliformes fecais variam entre 10^4 - 10^8 e 10^2 - 10^7 UFC/g, respectivamente, após 7 dias da data de produção dos queijos.

Levando em consideração estas duas informações, planejou-se um estudo que está sendo realizado por L.C. Aragon-Alegro (Anexo 11) que está

avaliando se a presença de coliformes influencia no comportamento de *L.monocytogenes* em queijo minas frescal.

Tabela 2 – Frequência de *Listeria monocytogenes* (Lm) em queijos macios, em alguns estudos conduzidos em diferentes países.

País de origem	País do estudo	Nº amostras	Nº (%) Lm +	Fonte
UK + outros	Inglaterra	220	23 (10)	Pini, Gilbert, 1988
Diferentes países UE	Noruega	90	10 (11)	Rorvick & Yndestad, 1991
Marrocos importados	e Marrocos	47	4(8,5)	ElMarrakchi et al., 1993
Diferentes origens UE	Suécia	302 (past.)★	7 (2)	Loncarevic et al., 1995
		31 (cru)♦	13 (42)	
Portugal	Portugal	63	29 (46)	Pintado et al., 2005

★queijos preparados com leite pasteurizado

♦ queijos preparados com leite cru

Foram produzidos queijos com população de coliformes similar ao encontrado no mercado (10^7 UFC/ml) e dois níveis de contaminação com *L. monocytogenes* (10^5 /ml ou 1cel/ml). Na produção dos queijos, foi empregada acidificação direta com ácido láctico ou a adição de culturas lácticas e os produtos foram incubados a temperatura de refrigeração (5°C), em abuso de temperatura de refrigeração (12°C) e em regime simulando feiras livres (incubação a 25°C/8h seguida de 5°C/16h). Os resultados obtidos até o momento indicam que em presença de coliformes fecais há uma tendência de manutenção da população de *L. monocytogenes* nos níveis iniciais de contaminação, independente da temperatura de incubação ou do tipo de tecnologia para a produção dos queijos. Entretanto, esta diferença fica mais visível nos queijos incubados a 12°C e naqueles submetidos aos ciclos de

temperatura. Verificou-se que este comportamento não é devido à produção de substâncias inibidoras pelos coliformes (bacteriocinas), mas pode ser decorrente de competição pelo substrato, ou da produção de quantidades elevadas de ácido láctico por este grupo de microrganismos.

Tabela 3 – Dados selecionados sobre a ocorrência de *Listeria monocytogenes* (Lm) em queijos macios no Brasil.

# amostras	# (%) Lm +	Fonte
20	2 (10)	Destro et al., 1991
20	0	Cassaroti et al., 1994
17	7 (41,2) - artesanal	Silva et al., 1998
30	1 (3,3) - industrial	
58	0	Corbia et al., 2001
50	4 (8)	Vieira et al., 2001
84	16 (19)	Branco et al., 2003

A capacidade de *L. monocytogenes* multiplicar em alimentos prontos para o consumo mantidos sob refrigeração é também causa de preocupação, uma vez que, de acordo com o modelo preditivo desenvolvido conjuntamente pelo Health and Human Services (HHS) e pelo USDA (USDHHS, 2003), a maioria (82,9%) dos casos de doença está associada ao consumo de alimentos que contêm elevadas populações do patógeno. Além disto, a maioria dos surtos ou casos esporádicos ocorreram pelo consumo de alimentos que podem sustentar a multiplicação de *L. monocytogenes* (ICMSF, 2002).

Para estabelecer medidas que previnam a multiplicação do patógeno, deve-se primeiramente conhecer o seu comportamento em um dado alimento para, a seguir, tomar medidas para minimizar ou evitar essa multiplicação, reduzindo assim a exposição da população de risco ao microrganismo.

No trabalho realizado por Bersot et al. (Anexo 12), avaliou-se a capacidade de multiplicação de *L. monocytogenes* naturalmente presente em mortadela fatiada, embalada a vácuo e armazenada sob refrigeração. Amostras do produto foram colhidas no dia da produção e embalagem, transportadas ao laboratório e armazenadas a 5°C por até 40 dias, segundo prazo de validade estabelecido pela empresa produtora. A cada 10 dias determinou-se a população de *L. monocytogenes* em três amostras, com uso da técnica dos tubos múltiplos (número mais provável – NMP). O experimento foi repetido 3 vezes. Verificou-se que, apesar de a população inicial ser baixa nos três experimentos (-1,52 – 0,04 log NMP/g), populações entre 1,37 – 2,01 log NMP/g foram atingidas após 40 dias de armazenamento, indicando um incremento populacional médio de 2,47 ciclo log. Os resultados obtidos indicam que *L. monocytogenes* pode multiplicar em mortadela fatiada embalada a vácuo e armazenada sob refrigeração, podendo este produto ser um risco para a população sensível.

Diversas soluções podem ser buscadas para minimizar a possibilidade de contaminação, eliminar as possíveis células presentes e também prevenir a multiplicação de *L. monocytogenes* nesse produto. A primeira é evitar sua contaminação durante a etapa de fatiamento, evitando a ocorrência de contaminação cruzada. O uso de tratamento listericida, tal como irradiação ou emprego de pressão ultra-alta (*ultra-high pressure*) após o envase, seria uma forma de eliminar o patógeno presente no produto. Um outra opção seria a reformulação do produto, adicionando-se ingredientes que possam inibir a multiplicação do patógeno, sem interferir nas características sensoriais do produto. Também pode-se pensar no emprego de embalagens ativas.

No estudo desenvolvido por Kinoshita et al. (ANEXO 13 a e b), amostras de salmão *Gravlax* (ou *gravad*), fatiado, embalado a vácuo e armazenado sob refrigeração, foram examinadas. As amostras, naturalmente contaminadas com *L. monocytogenes*, foram coletadas no dia da embalagem e transportadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF-USP, onde foram armazenadas a temperatura inferior a 8°C, até o final de sua vida-de-prateleira (90 dias segundo o produtor). A cada 15 dias determinou-se, em quatro amostras, a população de *L. monocytogenes*, empregando-se a técnica do

NMP e a população de bactérias láticas por "pour plate". Avaliaram-se também parâmetros sensoriais (cor e odor) que foram usados como critérios para identificar a deterioração. Observou-se que várias amostras apresentaram sinais de deterioração após o 60º dia de armazenamento, não sendo por isso submetidas à análise microbiológica. A população média inicial de BAL foi de 10^4 UFC/g, atingindo em 15 dias 10^7 UFC/g e mantendo-se constante durante toda a vida útil do produto. Já a população inicial média do patógeno foi de 0,07 NMP/g e verificou-se que ela sofreu uma diminuição durante a estocagem. As evidências permitem concluir que essa diminuição na população de *L. monocytogenes* foi devida à elevada população de BAL e que nesse produto, mesmo próximo ao fim de sua vida útil, *L. monocytogenes* não representa um risco à saúde do consumidor.

Nesses dois estudos empregaram-se amostras naturalmente contaminadas com *L. monocytogenes*, mas são poucos os estudos que empregam esta abordagem. Usualmente utiliza-se a inoculação artificial do produto final com cepas de coleções de cultura ou cepas provenientes do mesmo tipo de alimento.

Acredita-se que haja prós e contras com relação ao uso de amostras artificialmente contaminadas. Quanto a vantagens, têm-se a uniformidade na população bacteriana presente nas diversas unidades analíticas e a certeza de que estas contêm o patógeno alvo, minimizando assim a tomada de amostras.

Como desvantagens, tem-se principalmente o estado fisiológico das células bacterianas, que nos experimentos com inoculação estão em condições fisiológicas ótimas, o que não retrata a realidade daquelas endógenas ao alimento ou do ambiente de processamento. Com isso, as células inoculadas têm vantagens competitivas sobre a microflora normal do produto. Assim, as condições que permitem a multiplicação de um determinado microrganismo em um alimento artificialmente contaminado nem sempre são as mesmas para um alimento naturalmente contaminado.

3.3. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* na produção primária e em linhas de produção de alimentos no Brasil

Conforme abordado anteriormente, *Listeria monocytogenes* tem a capacidade de colonizar unidades de processamento de alimentos. A identificação dos nichos onde a bactéria se encontra dentro da planta é conseguida através de amostragens ambientais e análise destas amostras. Em algumas empresas, poucas áreas podem se mostrar contaminadas com *L. monocytogenes*, ficando simples determinar os locais que merecem maior atenção. A amostragem de produto em diferentes etapas do processamento também auxilia na tomada de medidas preventivas e de ações corretivas.

Entretanto em outras, múltiplos locais podem abrigar o patógeno, ficando difícil determinar qual a fonte primária de contaminação. Nesses casos, há necessidade de se empregar ferramentas mais sensíveis que permitam a identificação dos pontos de contaminação (*hot spots*), como por exemplo, os métodos de subtipagem molecular (ILSI, 2005). Com esses métodos, pode-se determinar em que etapa do processamento uma determinada cepa é introduzida no alimento, facilitando assim a tomada de medidas para sua eliminação. Somente com essa abordagem pode-se tentar minimizar a contaminação dos alimentos pelo patógeno.

A análise de produto final, que é válida para algumas circunstâncias, como por exemplo, na avaliação da qualidade de produtos importados, tem aplicação restrita para o controle de *L. monocytogenes*, pois este microrganismo está heterogeneamente distribuído no produto e normalmente sua população é baixa (ILSI, 2005).

Para elaborar esse item, buscaram-se, em base de dados nacionais e internacionais, trabalhos sobre ocorrência de listerias tanto na produção primária como em ambientes de processamento de alimentos no Brasil, mas só dois trabalhos publicados foram encontrados (Destro et al., 1996; Silva et al., 2004).

Estudar a disseminação de *Listeria monocytogenes* em uma planta processadora de camarões e avaliar a possibilidade do emprego de métodos moleculares neste estudo foram objetivos do trabalho de Destro et al. (1996) (Anexo 14). Para tanto, foram examinadas amostras de camarão em diversas

etapas do processamento, amostras ambientais (superfícies sem contato com o produto), de equipamentos (superfícies em contato com o produto), de mãos de manipuladores, de água e gelo.

Dentre as 363 amostras examinadas, isolou-se *L. monocytogenes* de 64 (17,6%) o que originou 480 isolados do patógeno. Dentre esses isolados, foram selecionados 115 representativos das diversas amostras positivas que foram submetidos à sorotipagem e tipagem molecular, empregando-se os métodos de amplificação aleatória do polimorfismo do DNA (RAPD – *random amplified polymorphic DNA*) e de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE – *pulsed-field gel electrophoresis*), com dois primers e duas enzimas, respectivamente.

A primeira conclusão foi que os métodos moleculares poderiam ser ferramentas importantes para avaliar a disseminação de contaminação em plantas processadoras de alimentos. Afirmar isso hoje pode parecer totalmente irrelevante, mas deve-se lembrar que, quando esse trabalho foi realizado, nunca haviam sido utilizados esses métodos para tal finalidade.

A seguir, combinando-se os resultados obtidos com ambos os métodos de tipagem, verificou-se que a contaminação do produto final com *L. monocytogenes* era devida a cepas de determinado perfil genético presentes no camarão já no desembarque. Essas cepas eram possivelmente provenientes do ambiente marinho ou decorrentes de contaminação cruzada ocorrida nos barcos de pesca. Essas mesmas cepas eram transmitidas para os manipuladores e estes, ao contrário do que se podia imaginar, não tiveram papel importante na disseminação de outros tipos genéticos de *L. monocytogenes* para o produto final.

Verificou-se também que todas as cepas de origem ambiental estavam restritas àquele tipo de amostras, não sendo disseminadas ao produto. Já cepas provenientes da água e de utensílios apresentavam perfis genéticos em comum, indicando a transferência de contaminação entre estes dois tipos de amostras.

Os resultados indicaram que pode ocorrer uma adaptação dos diferentes tipos genéticos de *L. monocytogenes* a nichos ou habitats específicos dentro da planta. Uma vez que existiam diferentes fontes do microrganismo na planta em questão, admitiu-se que a eliminação do patógeno do produto final poderia ser uma tarefa muito difícil, se não impossível, mas enfatizou-se a importância

da aplicação de sistemas de gerenciamento de perigos como o HACCP (análise de perigos e controle de pontos críticos).

No trabalho de Silva e colaboradores (2004), avaliou-se a presença de *Listeria* sp em um total de 41 amostras coletadas em linhas de produção de lingüiça mista frescal de três frigoríficos de Pelotas, RS. Foram examinadas amostras de matéria prima, de superfície de equipamentos e de produto final e *L. monocytogenes* foi detectada em 33,3% das amostras de carne bovina e carne suína; em 20% das amostras de gordura suína e em 16,7% do produto final, não tendo sido encontrada em amostras de carne de aves mecanicamente separada (CMS). O patógeno também foi encontrado em 50% das amostras colhidas na superfície dos misturadores, em 33,3% das amostras de moedor e em 25% das de embutideira. Os autores enfatizam a necessidade de readequação das práticas de limpeza e sanificação das plantas de processamento examinadas.

Outros trabalhos foram realizados avaliando-se a disseminação de *L. monocytogenes* em plantas processadoras de alimentos.

Rodrigues et al. (Anexo 15 a e b) avaliaram a disseminação de *L. monocytogenes* em uma linha de processamento de *nuggets* congelados de frango, analisando amostras de produto em diferentes etapas do processamento, amostras de equipamentos, de manipuladores e de ambiente. Amostras de ingredientes também foram avaliadas.

Eles verificaram que *L. monocytogenes* esteve presente em 249/413 (60,3%) das amostras examinadas, tendo sido o microrganismo isolado de 144/155 (92,9%) das amostras de produto e em 100% das ambientais.

A tipagem genética dos 253 isolados de *L. monocytogenes* com o emprego de RAPD e dois primers gerou 50 perfis que puderam ser agrupados em 4 *clusters* (A a D), sendo que aos *clusters* A e B pertenceram somente cepas do sorogrupo 1 (1/2a e 1/2c). Os *clusters* C e D continham cepas dos sorotipos 4a, 4b, 4ab, 4c e 1/2b (Andrigheto et al., 2001) (Anexo 16).

Verificou-se que a matéria prima (peito de frango) já chegava à planta processadora portando subtipos de *L. monocytogenes* resistentes às condições de processamento, sendo detectadas nas diversas etapas do mesmo até o produto final (*nuggets* pré-fritos e congelados). Esses subtipos foram também capazes de colonizar o ambiente. Com isso ficou difícil estabelecer se eles

eram mais adaptados ao produto ou se ocorria re-contaminação do mesmo através da superfície de equipamentos/ ambiente.

Equipamentos e ambiente mostraram ser importantes para a contaminação do produto através da introdução neste de cepas pertencentes a subtipos não encontrados na matéria prima e que foram capazes de resistir ao processamento. Estes subtipos foram encontrados mesmo no produto final.

Manipuladores não introduzem novos subtipos de *L. monocytogenes* no produto ou no ambiente de processamento, porém podem contribuir para a contaminação cruzada entre estes.

O mapeamento da contaminação por *L. monocytogenes* de uma planta processadora de lingüiça mista frescal, empregando-se sorologia e PFGE, foi realizada por von Laer et al. (Anexo 17).

Amostras de matéria prima, de produto final, de mãos de manipuladores, de superfícies de equipamentos e ambiente foram examinadas quanto à presença do patógeno.

Do total de 69 amostras examinadas 17(24,6%) apresentaram-se contaminadas com *L. monocytogenes*, sendo que a espécie não foi isolada das amostras de matéria prima. Os 83 isolados obtidos foram submetidos à sorotipagem e houve predomínio de cepas 1c (71,1%), seguido de 1b(12,1%) e 4b (2,4%); parte das cepas (14,5%) pertencia ao sorogrupo 1. Essas cepas foram também subtipadas por PFGE, empregando-se as enzimas Apal e Ascl e a combinação dos resultados gerou 22 perfis.

Uma vez que *L. monocytogenes* não estava presente na matéria prima, mas sim em todas as amostras de produto final, e que as cepas isoladas dessas amostras apresentavam uma variedade de perfis genéticos, vários deles encontrados também em amostras de equipamentos e nas mãos dos manipuladores, concluiu-se que a contaminação do produto final é decorrente da contaminação cruzada por equipamentos e manipuladores.

Os quatro trabalhos anteriores foram realizados com produtos que ainda seriam submetidos à cocção antes do consumo, o que poderia eliminar a população de *L. monocytogenes* presente. Entretanto, não se pode deixar somente nas mãos do consumidor a responsabilidade pela eliminação do

patógeno do alimento. Sabe-se que, se o tratamento térmico empregado não for adequado, pode ocorrer a sua sobrevivência.

A presença de *L. monocytogenes* no produto que ainda será submetido à cocção não é causa de preocupação *per se*, mas pode levar à contaminação de equipamentos, como geladeiras, ou de utensílios levando à contaminação cruzada, se boas práticas não forem empregadas.

No trabalho realizado por Cruz et al. (Anexo 13b), estudou-se a disseminação de *L. monocytogenes* em linha de processamento de salmão *gravlax*, produto que não passa por etapa listericida desde o processamento até o consumo.

Na primeira etapa do trabalho, F. A. Silvestre avaliou a presença de *Listeria* spp em diversas etapas da produção de salmão *gravlax*, da matéria prima ao produto final (*gravlax* fatiado, embalado a vácuo), armazenado sob refrigeração ou congelamento (Silvestre, Destro, 1999). Ela avaliou também sua presença em amostras de ambiente, utensílios, mãos de manipuladores, e de ingredientes de cura (NaCl, açúcar, pimenta branca) e condimento (endro-dill).

Das 415 amostras analisadas, *L. monocytogenes* foi isolada de 157 (38%), sendo a maior frequência de amostras positivas encontrada entre as ambientais (43%), seguida das amostras de produto (41%), manipuladores (34%) e utensílios (32%). Não se isolou o microrganismos dos ingredientes de cura e condimentos.

Dentre os 429 isolados de *L. monocytogenes*, selecionaram-se 181, representativos das diversas etapas de processamento e diferentes tipos de amostra, para submeter à tipagem molecular por PFGE com as enzimas Apal e Ascl. Esses isolados foram também sorogrupo e pertenciam aos sorogrupos 1 (132 cepas) e 4 (49 cepas). Combinando-se os resultados obtidos com as duas enzimas e avaliando-se a relação genética entre os 60 perfis encontrados, verificou-se a ocorrência de 6 *clusters* (A a F), sendo que ao *cluster* A pertenciam 120 das 181 cepas avaliadas.

Com relação à distribuição, ao longo da linha de processamento, dos subtipos encontrados, verifica-se um comportamento muito similar ao encontrado para os *nuggets* de frango. Cepas de um determinado perfil

genético já chegam à planta com os filés de peixe importados do Chile e, a partir deles, passam aos utensílios e ao ambiente. Esse mesmo perfil foi encontrado no pescado, em todas as etapas do processamento, até o produto final (resfriado/ colgado,) e também em mãos dos manipuladores.

Utensílios, ambiente e manipuladores contribuem para a contaminação do produto, quer seja pela introdução no mesmo de cepas pertencentes a subtipos não encontrados na matéria prima, quer seja pela transferência constante de determinados perfis.

Pode-se concluir que, pela variedade de perfis encontrados numa mesma amostra, a planta em questão apresentava múltiplas fontes de contaminação. Além disso, aventou-se a hipótese de que alguns desses perfis fossem “residentes”, ou seja, tivessem colonizado o ambiente da planta passando a fazer parte dele.

Essa hipótese foi confirmada com o trabalho de Alves et al. (2005) (Anexo 5) que compararam os perfis genéticos das cepas isoladas no estudo de Silvestre, e tipadas por Cruz, com as de *L. monocytogenes* isoladas por Alves, quatro anos depois, a partir de amostras de filé de surubim defumado, embalado a vácuo e processado na mesma planta processadora. Eles verificaram que as cepas de Alves apresentavam o mesmo perfil RAPD que as cepas de Silvestre, mesmo empregando quatro *primers* diferentes. Esse é o primeiro relato de ocorrência de cepa persistente em linha de processamento no Brasil.

Os resultados destes dois últimos trabalhos são extremamente preocupantes, pois indicam que esses produtos, prontos para o consumo, à base de pescados, podem ser importantes veículos de *L. monocytogenes*.

Medidas de controle que minimizem a contaminação de produto com *L. monocytogenes* devem ser tomadas por todas as plantas processadoras de alimentos, mas principalmente por aquelas que produzem produtos prontos para o consumo.

A implantação de PPHO é fundamental para que se evite a instalação de cepas residentes ou para que se elimine aquelas que já estão presentes no ambiente/ equipamentos.

A combinação de diversas medidas deve ser usada para minimizar a entrada de *L. monocytogenes* em uma planta. Esta combinação pode ser simplificada pela equação da *Listeria* (ILSI, 2005) apresentada na figura 4.

Entretanto, PPHO, GMP e HACCP só surtirão efeito se efetivamente implantados, com comprometimento da alta direção da empresa com a inocuidade dos alimentos e com treinamento constante dos colaboradores sobre a importância destes sistemas. Por outro lado, se forem empregadas apenas para o cumprimento de exigências legais, ou de clientes, sem que a empresa tenha a cultura da importância de produzir alimento inócuo, estes sistemas não trarão garantia alguma para o consumidor.

Figura 4 – Medidas para controle de *Listeria* em uma planta processadora de alimentos (Equação da *Listeria*) (ILSI, 2005)

Para se poder controlar a presença de *Listeria* no produto final, há que se avaliar sua presença em todas as etapas de produção, da fazenda à mesa. Os dados de Rodrigues et al. haviam indicado que as principais cepas de *L. monocytogenes* contaminando os nuggets de frango eram originárias da matéria prima (peito de frango). Buscando entender em qual etapa do processamento as carcaças se contaminavam com *L. monocytogenes* se planejou-se um estudo, que ainda está em fase de finalização (Chiarini et al., Anexo 18).

Nesse estudo, dois abatedouros com igual capacidade de abate de frangos e atendendo aos mesmos requisitos de mercado externo, mas utilizando sistemas de evisceração diferentes (manual - M e automático - A), foram examinados quanto à presença do patógeno em amostras ambientais, de equipamentos, água, manipuladores e de produto nas diversas etapas, desde a pendura dos animais até os cortes congelados armazenados por 3 meses.

Das 869 amostras examinadas, 155 (17,8%) continham o patógeno, mas nenhuma das amostras coletadas das caixas de transporte dos animais foram positivas, indicando que os mesmos não excretavam *L. monocytogenes* em suas fezes.

Os tipos sorológicos dos isolados foram identificados por PCR e verificou-se que na planta A houve predomínio do sorotipo 4b/4d/4e (61,6% dos isolados) enquanto na M o predomínio foi de 1/2a/3a (73%). Outro dado interessante foi a maior frequência de isolamento de *L. monocytogenes* nas mãos dos trabalhadores na planta com evisceração automática.

Dos 2728 isolados obtidos, 221 foram identificados como *L. monocytogenes* e foram submetidos à tipagem por PFGE, empregando-se as enzimas Apal e Ascl. A combinação dos resultados obtidos com a PFGE gerou 11 grupos genéticos, sendo que dois dos pulsotipos estavam presentes nos dois abatedouros. Não se conseguiu estabelecer uma origem comum para estas cepas idênticas presentes em ambos abatedouros, uma vez que eles distam aproximadamente 330km um do outro; são de empresas diferentes e não há possibilidade de receberem aves de mesmos fornecedores.

A análise do perfil de resistência a antimicrobianos realizada mostrou que as terapias usualmente empregadas para o tratamento de listeriose seriam efetivas no controle destas cepas, caso infectassem humanos.

Supondo que a produção de bovinos sob confinamento pudesse facilitar a disseminação de patógenos entre os animais, preparou-se um estudo com o intuito de avaliar a presença de diferentes patógenos (inclusive *L. monocytogenes*) em novilhos criados em sistema de confinamento (Programa do novilho superprecoce- UNESP Botucatu). Coletaram-se amostras do ambiente de confinamento antes da entrada dos animais; de fezes dos animais,

de água dos bebedouros, ração, ingredientes da ração, durante todo o período de confinamento (Sakate et al., Anexo 19a e b). Depois, conforme os animais foram enviados para abate, foram examinadas carcaças dos mesmos no dia do abate e após 24h sob refrigeração (superfícies interna – face medial e externa – face lateral das carcaças). Examinaram-se também amostras de facas de sangria, de esfola e de serra de carcaças e ambiente de abate (Frigorífico A).

Listeria monocytogenes foi isolada em somente 16 (2,5%) das 645 amostras examinadas, sendo 14 delas carcaças após refrigeração e 2 de amostras ambientais do abatedouro (piso e parede da câmara frigorífica).

Esses resultados indicaram que o confinamento dos bovinos não elevou o risco de contaminação e disseminação de *L. monocytogenes*, como havíamos suposto que ocorreria, e que a contaminação ocorria nos matadouros.

Assim, uma segunda etapa do estudo foi desenvolvida estudando-se a distribuição de *L. monocytogenes* nas diversas etapas do abate, desde a sangria até os cortes prontos para comercialização (Frigorífico B). Um total de 516 amostras ambientais, de utensílios e equipamentos, de mãos de manipuladores e de carcaças/ peças de carne foi examinado. *L. monocytogenes* foi detectada em 27 (5,2%) amostras e somente 3 delas eram provenientes da área suja (2 carcaças após sangria e 1 amostra de piso da área de sangria). As demais eram de ambiente de câmara fria, equipamentos/ utensílios da área de desossa ou de peças de carne.

Dos dois frigoríficos, obtiveram-se 180 isolados de *L. monocytogenes* que foram submetidos à identificação de grupos sorológicos por PCR e a subtipagem por PFGE. Enquanto no frigorífico A houve predomínio de cepas 1/2c (41,4%), seguidas de cepas 4b (35,6%), no B o predomínio foi de cepas 1/2b (43,3%), seguido de 1/2c (24,4%).

Pela análise do perfil de macro-restrição e avaliação das relações filogenéticas das cepas, verificou-se a existência de 7 grupos, sendo 2 deles comuns a ambos frigoríficos. Verificou-se também que cepas de determinados perfis genéticos e presentes no ambiente/ utensílios/ utensílios, passam a contaminar as peças de carne. Os dados obtidos indicam que para os dois matadouros a área de maior contaminação das carcaças está na área limpa após o túnel de enxágüe.

A solução dos problemas de contaminação por *L. monocytogenes* nas diferentes empresas, de abatedouros a processamento de alimentos prontos para o consumo, passa sempre por melhorias no sistema de limpeza e sanificação, melhoria de estrutura física, emprego de PPHO, GMP e HACCP além de treinamento de funcionários, conforme anteriormente comentado.

Entretanto, os resultados dos trabalhos de Chiarini e Sakate mostram que na área limpa dos abatedouros a frequência de isolamento de *L. monocytogenes* é muito maior que na área suja. Resultados semelhantes obtidos junto a empresas brasileiras processadoras de carnes ou de derivados de leite (comunicação pessoal) indicam também que a ocorrência de *Listeria* sp é maior quando a população de, p. ex. coliformes ou outro indicador, é mais baixa.

Uma vez que não se pretende sugerir às empresas processadoras de alimentos que negligenciem os procedimentos de limpeza e sanificação para minimizar o risco de *Listeria* no ambiente, e consequentemente no produto, fica a pergunta: como solucionar esse problema?

Um idéia que parece promissora vem sendo desenvolvida pela equipe de M. Doyle (Zhao et al., 2004; Zhao et al., 2006) e consiste no emprego de exclusão competitiva para controlar a presença de *Listeria monocytogenes* em ambientes de processamento de alimentos. Inicialmente eles selecionaram cepas provenientes de ralos de plantas processadoras de alimentos que possuísem atividade anti-listeria e escolheram os isolados identificados como *Lactococcus lactis* subsp *lactis* e *Enterococcus durans* como os que apresentavam melhores características. A seguir, inocularam drenos e ralos de abatedouros de aves com uma mistura desses 2 microrganismos e observaram uma significativa redução na população de *Listeria* naqueles locais durante as 5 semanas de avaliação, tanto nos locais refrigerados como nos em temperatura ambiente.

4. Avaliação de métodos para detecção de *Listeria* em alimentos

A variedade de métodos existentes para a detecção de *Listeria* em alimentos é enorme, de métodos convencionais àqueles empregando a PCR em tempo real.

Para a escolha de um método a ser adotado deve-se levar em consideração alguns parâmetros entre eles a adequação do método à matriz alimentícia que se irá analisar, a existência de um reconhecimento internacional (ISO ou AOAC, p. ex.), a facilidade de emprego e confiabilidade do resultado, e não menos importantes, o custo e a idoneidade do fornecedor.

Usualmente em nosso país a escolha de métodos microbiológicos é baseada nas recomendações da *Food and Drug Administration* americana, através do *Bacteriological Analytical Manual* (BAM); do *Food Safety and Inspection Services* do Departamento de Agricultura americano 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 International.

Quando se trata de análises fiscais, ou para atender especificações de ministérios, algumas regras devem ser seguidas. Para as análises realizadas

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

Já aquelas análises realizadas para atender as especificações do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento devem seguir as metodologias apresentadas na Instrução Normativa nº 62 (Brasil, 2003). Nesta Instrução fica estabelecido que somente métodos aprovados por eles podem ser empregados.

Sempre que um laboratório vai adotar um novo método ou meio de cultura, este deve passar por uma verificação interna de sua eficiência, comparando-se os resultados obtidos com este novo método/meio com aqueles do método tradicionalmente empregado no laboratório. Isto é necessário para que se avalie a influência que a microflora endógena do alimento possa ter neste método/ meio, além de fornecer informações importantes para o laboratório sobre a percentagem de resultados positivos e negativos falsos, além de sensibilidade e especificidade. Esta verificação interna é necessária mesmo para aqueles kits comerciais que possuem reconhecimento AOAC.

A metodologia convencional para análise de *Listeria* em alimentos é demorada e envolve diversas etapas. Usualmente ela consta de procedimentos de enriquecimento seriado, empregando o enriquecimento primário da amostra em meio pouco seletivo, seguido do enriquecimento secundário em meio seletivo. O isolamento da bactéria é feito por semeadura do crescimento em pelo menos dois ágar seletivo-diferenciais. A seguir, as colônias suspeitas são submetidas a diferentes avaliações bioquímicas para identificação da espécie. Este processo é longo e trabalhoso, levando de cinco a 10 dias para a obtenção dos resultados.

Muitas vezes a obtenção de resultados negativos não reflete a realidade, pois o microrganismo pode apresentar injúria sub-letal não conseguindo se recuperar no caldo de enriquecimento, ou pode estar em números inferiores à 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; Petran, Swanson, 1993).

A busca de resultados mais rápidos e confiáveis tem levado ao desenvolvimento de testes não convencionais para a pesquisa de *Listeria* em alimentos. Alguns são espécie-específicos mas a maioria é gênero-específico. Geralmente eles empregam formatos já utilizados para detecção de outros organismos (ou suas toxinas), com seus componentes alterados para detecção específica de *Listeria*. Todos estes testes requerem um enriquecimento primário, para aumentar seletivamente a população alvo para níveis detectáveis (Rocourt, 1999).

Dentre os diferentes tipos de testes existentes pode-se destacar aqueles que empregam ensaios imunológicos ou aqueles que empregam características genéticas e a reação de polimerização em cadeia (PCR).

Os ensaios imunológicos baseiam-se na reação específica entre antígeno-anticorpo e podem ser encontrados em diversos formatos tais como, testes imunoenzimáticos, imunocaptura, de imunoprecipitação, imunocromatografia, aglutinação de partículas, esferas paramagnéticas cobertas com anticorpos, entre outros (Robison, 1997).

Os testes que empregam a imunocromatografia/ imunoprecipitação usualmente são encontrados como aparatos de uso único. São testes que utilizam anticorpos altamente específicos para *Listeria*, estando parte deles ligada à superfície de partículas móveis (p. ex. látex) coradas, e outra parte imobilizada. O aparato possui 3 janelas: uma, na qual se coloca a amostra enriquecida que por capilaridade, migra até a janela de resultado do teste, onde se encontram os anticorpos imobilizados, e continua a migração até a janela controle. Se *Listeria* estiver presente na amostra, o complexo antígeno-anticorpo-partícula de látex se forma na primeira janela indo ao encontro dos anticorpos imobilizados, formando a primeira linha de precipitação. As partículas de látex, carregando ou não o antígeno, continuam a migrar até encontrar a linha de anticorpos não específicos, formando a linha de controle. Na figura 5 tem-se um exemplo de teste de imunocromatografia/ imunoprecipitação.

Nos testes imunoenzimáticos (ELISA) os anticorpos de captura estão usualmente adsorvidos em uma matriz sólida. A amostra enriquecida é

colocada em contato com a superfície que contém os anticorpos e, se os antígenos estiverem presentes, ligam-se aos anticorpos. A seguir, um conjugado, formado por um segundo anticorpo ligado a uma enzima é adicionado e liga-se ao antígeno presente. Um substrato específico à enzima é adicionado e, ao reagir com ela, gera um produto usualmente colorido cuja intensidade pode ser verificada visualmente ou com auxílio de espectrofotômetro (Robison, 1997). Esse tipo de ELISA é conhecido como “ELISA sanduíche” (figura 6).

Os testes que empregam a imunocaptura utilizam os anticorpos para “separar” o antígeno de interesse do meio em que ele está. Esses anticorpos específicos recobrem a superfície de bastões plásticos (*dipsticks*) e, ao serem colocados em contato com uma mistura de antígenos, o antígeno alvo liga-se ao anticorpo imobilizado e pode ser isolado pela remoção do bastão. Uma vez separado fisicamente da microbiota competidora, o microrganismo é submetido a enriquecimento seletivo e depois submete-se o bastão a um teste ELISA sanduíche. Na figura 7 tem-se um exemplo de teste empregando essa tecnologia.

Figura 5 - Teste empregando imunocromatografia/ imunoprecipitação.

Figura 6 – Representação esquemática de um teste ELISA sanduíche
(Fonte: www.users.rcn.com)

a

Figura 7 – Testes ELISA. a - ELISA sanduíche; b – teste de imunocaptura seguida de ELISA sanduíche

Rodrigues et al. (2002) (Anexo 15) compararam a eficiência de um teste empregando imunocromatografia, o *Listeria rapid test* (Oxoid, Inglaterra) para a detecção de *Listeria* sp em amostras de origens diversas, colhidas em uma indústria de processamento de *nuggets* de frango. *Listeria* sp foi detectada em 267 (64,7%) das 413 amostras empregando-se o *Listeria rapid test* e, em 271 (65,6%) amostras, com o emprego da metodologia convencional. Verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos com o teste imunológico e o tradicional, independentemente da origem da amostra.

No estudo conduzido por Aragon-Alegro et al. (Anexo 20) dois testes imunológicos tiveram sua eficiência para detectar *Listeria* comparada com a da metodologia convencional. Os testes empregados foram o *Listeria visual immunoassay* (VIA) (Tecra®, Austrália) que é um teste ELISA sanduíche, e o Visual Immunoprecipitate Assay for *Listeria* (VIP®) (BioControl, EUA), que como o próprio nome indica é um teste de imunoprecipitação. As amostras testadas (120) foram carne moída, presunto e salsicha e verificou-se que a matriz alimentícia pode influenciar o desempenho dos métodos, uma vez que a amplitude do intervalo de confiança foi muito maior para as amostras de carne crua que para as de produtos cozidos. Entretanto, não se verificou diferença estatisticamente significativa entre o desempenho do método convencional e o dos ensaios imunoenzimáticos.

O segundo grupo de métodos não convencionais que vêm ganhando importância é o dos métodos que empregam a amplificação do DNA cromossômico pela PCR. Rapidamente, esses métodos requerem o emprego de dois *primers* específicos (pequenos oligonucleotídeos fita simples, complementares ao DNA e com orientação oposta) que flanqueiam a região do DNA alvo a ser amplificada e, pela ação da enzima DNA polimerase, sintetizam uma cópia desta região do DNA por eles delimitada. Como a reação é repetida de 20 a 40 vezes, ocorre um aumento exponencial no número de cópias do DNA alvo.

A grande vantagem dos métodos que empregam essa tecnologia é a estabilidade das seqüências que não sofrem influência de condições ambientais ou de cultivo.

O primeiro teste comercial empregando a tecnologia da PCR foi o BAX™ *system for screening Listeria monocytogenes* (Qualicon). A primeira versão do teste, de 1995, foi uma simplificação dos procedimentos que se empregava para a PCR até então, pois com ele não era necessária a preparação de reagentes específicos para lise celular ou mesmo o preparo de mistura de reação da PCR, uma vez que todos os reagentes eram fornecidos pelo fabricante prontos ou em forma de *pellets*. Com isso, os riscos de erros no preparo da mistura de reação ou os problemas com síntese de *primers*, tão comuns naquela época, eram evitados. A detecção dos fragmentos amplificados era realizada por eletroforese em gel de agarose e a avaliação da presença/ ausência do patógeno, por avaliação visual do gel.

Em novembro de 2000, a Qualicon lançou a versão automatizada do BAX® que permite a detecção, em tempo real, da presença do patógeno. Segundo a empresa, os *primers* utilizados são altamente específicos para a detecção de *L. monocytogenes*, com baixa possibilidade de ocorrência de reações cruzadas com outras espécies do gênero (User's Guide, 2000).

Como no kit antigo, são necessárias duas etapas de enriquecimento da amostra, que são feitas em meios seletivos, segundo protocolo específico para o tipo de alimento. A seguir, as amostras são combinadas com a solução de lise e tratadas quimicamente para liberação do DNA. Os reagentes necessários para a PCR e mais o corante *SYBR Green*, peletizados e pré-distribuídos em tubos de reação, são reidratados com a amostra lisada. Esses tubos são transferidos para o termociclador/detector onde ocorre simultaneamente a amplificação do fragmento de DNA específico e a detecção do mesmo através de emissão de sinal fluorescente. O programa existente no equipamento interpreta os dados e os resultados são mostrados no monitor como símbolos positivos e negativos (User's Guide, 2000).

No Brasil o MAPA, conforme Instrução Normativa nº 40, de 12/12/2005 (Brasil, 2005), aprovou o sistema como método oficial para a detecção de *Listeria monocytogenes* em amostras de alimentos, água e *swabs* ambientais.

Tanto o BAX original, como a versão automatizada, foram utilizados nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos da FCF-USP. No mesmo trabalho de Rodrigues et al. (2002) (Anexo 15) citado anteriormente, realizou-se a avaliação da eficiência do sistema BAX™ manual. Das 408 amostras

examinadas, *L. monocytogenes* foi detectada em 141 (34,6%) empregando-se o BAX™ e em 247 (60,5%) pelo método convencional, verificando-se assim, uma baixa correlação entre o método de cultivo e o BAX™. Os resultados indicaram também uma forte influência no tipo de amostra na eficiência do teste, sendo o pior resultado obtido para amostras de produtos (*nuggets* de frango). Essa baixa eficiência não pôde ser explicada.

Buscando estudar a ocorrência de *L. monocytogenes* em 181 amostras de hortaliças minimamente processadas Fröder et al (Anexo 8) empregaram o BAX® automatizado em paralelo com o método convencional e encontraram, com ambos, apenas uma amostra (0,6%) positiva para o patógeno. Entretanto, pelo método convencional, 14 amostras apresentaram crescimento de colônias suspeitas de *Listeria* nos meios de isolamento seletivo, tornando obrigatória a realização de testes bioquímicos para sua identificação. Dos 82 isolados submetidos à especiação, somente 6, provenientes da única amostra positiva, foram identificados como *L. monocytogenes*. Esses resultados indicam ser o BAX de mais fácil execução que a metodologia convencional, e com a possibilidade de obter resultados mais rapidamente.

Os resultados desses três estudos indicam que os métodos alternativos testados podem ser utilizados para a avaliação rápida da presença de listérias, em amostras de produtos alimentícios, ou mesmo em ambiente de processamento como ficou provado para o *Listeria rapid test*.

A vantagem de seu emprego está no tempo usualmente menor para a obtenção de um resultado negativo, que é considerado definitivo. Porém, quando o resultado é positivo, seja para *Listeria* sp, como é o caso dos testes imunológicos, como para *L. monocytogenes*, caso do teste que emprega PCR, ele é sempre considerado presuntivo. Com isso, ainda há necessidade de se submeter a amostra à semeadura em ágar seletivo e, o não isolamento do microorganismo pelos métodos convencionais deve ser relatado como ausência dele.

Acredita-se que essa exigência deva ser revista num futuro próximo visto que esses novos métodos podem ser mais sensíveis que os convencionais. Além disso, pode dar uma segurança maior ao consumidor o fato de a ocorrência de resultados negativos falsos ser muito baixa e ocorrer mais

freqüentemente a detecção de um “positivo falso”, ou seja, positivo pelo método alternativo, mas não pelo convencional.

5. Considerações finais

A importância de *L. monocytogenes* para alimentos no Brasil parece já bem estabelecida, mas determinar medidas para controlar sua presença, e multiplicação, desde a matéria prima até o consumidor final, ainda necessita de estudos.

O controle da presença de *L. monocytogenes* na matéria prima ou produtos crus é difícil, se não impossível, devido ao caráter ubiqüitário do microrganismo. Mas pode-se evitar o aumento da população e a introdução de novos subtipos durante o preparo de alimentos.

As grandes indústrias de alimentos vêm tentando minimizar o risco de veiculação de *L. monocytogenes* através de seus produtos prontos para o consumo, o que é muito bom, porém este risco ainda existe. Mas não se sabe como as pequenas e micro-empresas processadoras de alimentos estão tratando o problema.

Outro gargalo é o comércio varejista. Esse elo da cadeia precisa se fortalecer mais. O risco de contaminação bacteriana de produtos alimentícios, principalmente os prontos para o consumo, nessa etapa de comercialização não pode ser menosprezado. Em etapas como fracionamento do produto pode ocorrer contaminação do mesmo através de equipamentos e utensílios indevidamente sanificados, práticas inadequadas de manipulação ou mesmo por falta de cuidados higiênicos por parte dos responsáveis por esses fracionamentos. Abordagens específicas para solucionar estes tipo de contaminação ainda devem ser implementadas.

A responsabilidade dos consumidores com relação à inocuidade dos alimentos deve também ser ressaltada. De nada adianta a indústria, ou o varejo, tomarem todos os cuidados necessários para fornecer um alimento inócuo se nós, consumidores, não evitarmos que o produto seja recontaminado em nível doméstico, ou que microrganismos que por ventura estejam presentes, venham a se multiplicar.

É certo que a população de risco suscetível a listeriose alimentar representa uma faixa pequena da população, restrita a imuno-comprometidos e mulheres grávidas, mas este grupo precisa receber esclarecimentos sobre os riscos associados ao consumo de determinados alimentos. Campanhas educativas precisariam ser implementadas.

Pode-se alegar que não existem relatos de casos de listeriose alimentar em nosso país, o que é verdade, mas quase não temos relatos de ETA de outras etiologias.

Será que listeriose não é importante em nosso meio, ou só não é pesquisada rotineiramente? Num estudo piloto realizado em Porto Alegre, RS, de 10 placentas humanas provenientes de abortos examinadas, *L. monocytogenes* foi detectada em 5 (Schwab, Edelweiss, 2003). De onde teriam vindo estas listérias que infectaram as mães?

Muitas perguntas ainda permanecem sem resposta. Estudos ainda têm que ser feitos para que se entenda, por exemplo, o comportamento de *L. monocytogenes* em produtos alimentícios brasileiros e assim se tente reduzir a possibilidade de contaminação/ multiplicação. Estudar os isolados de *L. monocytogenes* brasileiros que apresentam características fenotípicas e genotípicas diferentes das de outros países, também poderá gerar informações importantes sobre esse patógeno. Obter dados relacionados a casos de listeriose de origem alimentar em nosso país também é fundamental para que se conheça a real importância de *L. monocytogenes* em nosso meio.

Somente com a obtenção de dados específicos para o nosso país é que se poderá pensar em desenvolver modelos próprios de avaliação de risco e assim tentar garantir a saúde do consumidor.

6. Referências Bibliográficas

Alves, V.F.; De Martinis, E.C.P; Destro, M.T.; Fonnensbech-Vogel, B.; Gram, L. Antilisterial activity of a *Carnobacterium piscicola* isolated from Brazilian smoked fish (Surubim [*Pseudoplatystoma* sp.]) and its activity against a persistent strain of *Listeria monocytogenes* isolated from surubim. **J. Food Prot.**, 68(10):2068-2077, 2005.

Anônimo. A taste of food poisoning. Washington Post, 05/07/2005. <http://www.washingtonpost.com> Consulta em 27/04/2006.

Anônimo. US fails to meet goal on *Listeria* as rate rises. Reuters. <http://today.reuters.com/news> Consulta em 27/04/2006.

Aragon-Alegro, L.C., Wittmann, C.R.P., Landgraf, M., Franco, B.D.G.M., Destro, M.T. Detection of *Listeria* sp in meat and meat products using Tecra *Listeria* visual immunoassay and biocontrol visual immunoprecipitate assay for *Listeria* immunoassays and a cultural procedure. **J. Rapid Methods Automation Microbiol.**, v.13, p.204-212, 2005

- Audurier, A.; Pardon, P.; Marly, J.; Lantier, F. Experimental infection of mice with *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. **Ann. Microbiol.**, 1318: 47-57, 1980.
- Bailey, J.S.; Fletcher, D.L.; Cox, N.A. *Listeria monocytogenes* colonization of broiler chickens. **Poultry Sci.**, 69: 457-461, 1990.
- Bakardjiev, A.I.; Theriot, J.A.; Portnoy, D.A. *Listeria monocytogenes* traffics from maternal organs to the placenta and back. **PLoS Pathogens**. 2(6): 623-631, 2006. (www.plospathogens.org) Consulta em 10/07/06
- Barbosa, W.B.; Cabedo, H.J.; Wederquist, H.J.; Sofos, J.N.; Schmidt, G.R. Growth variation among species and strains of *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.**, 57:765-769, 775, 1994.
- Bersot, L.S.; Landgraf, M.; Franco, B.D.G.M.; Destro, M.T. Production of mortadella: behavior of *Listeria monocytogenes* during processing and storage conditions. **Meat Sci.**, 57:13-17, 2001. (Anexo 9)
- Brackett, R.E. Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in products of plant origin. In: **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. Ryser, E.T.; Marth, E.H. ed. Marcel Dekker, N.Y, 1999. p. 631-655.
- Branco, M.A.A.C.; Figueiredo, E.A.T.; Borges, M.F.; Silva, M.C.D.; Destro, M.T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. **B.CEPPA**, 21(2):393-408, 2003.
- BRASIL. Instrução normativa nº 62. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 18/09/2003. p. 14-51.
- BRASIL. Resolução – RDC 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 02/01/2001.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa nº 40. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 12/12/05.

Bruhn, J.B.; Vogel, B.F.; Gram, L. Bias in the *Listeria monocytogenes* enrichment procedure: lineage 2 strains outcompete with lineage 1 strains in University of Vermont selective enrichments. **Appl. Environ. Microbiol.**, 71(2): 961-967, 2005.

Buchanan, R.L.; Golden, M.H.; Whiting, R.C.; Philips, J.G.; Smith, J.L. Nonthermal inactivation models for *Listeria monocytogenes*. **J. Food Sci.**, 59: 179-188, 1994

Buchanan, R.L.; Smith, J.L.; Long, V. Microbial risk assessment: dose-response relations and risk characterization. **Int. J. Food Microbiol.**, 58(3):159-172, 2000.

Camilli, A.; Tilney, L.G.; Portnoy, D.A. Dual roles of *plcA* in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. **Mol. Microbiol.** 8: 143-157, 1993.

Cassaroti, 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 Nutricion**, 44:158-136. 1994.

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. **MMWR**, April 14, p. 392-395, 2006.

Chakraborty, T.; Hain, T.; Domann, E. Genome organization and the evolution of the virulence gene locus in *Listeria* species. **Int. J. Microbiol.**, 290: 167-174, 2000.

Corbia, A.C.G.; Nascimento, M.G.F.; Nascimento, E.R.; Lignon, G.B. Research on *Listeria monocytogenes* and total plate count in Minas soft cheese. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, 23(2): 72-75. 2001.

- Cox, N.A.; Bailey, J.S.; Ryser, E.T. Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in poultry and egg products. In: **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. Ryser, E.T.; Marth, E.H. ed. Marcel Dekker, N.Y, 1999. p. 565-600.
- Dalton, C.B.; Austin, C.C.; Sobel, J.; Hayes, P.S.; Bibb, W.F.; Graves, L.M.; Swaminathan, B.; Proctor, M.E.; Griffin, P.M. Listeriosis from chocolate milk: linking of an outbreak of febrile gastroenteritis and "sporadic" invasive disease. **N. Engl. J. Med.**, 336: 100-105, 1997.
- De Martinis, E.C.P; Franco, B.D.G.M. Inhibition of foodborne pathogens by bacteriocin-producing *Leuconostoc* sp and *Lactobacillus sake* isolated from "linguiça frescal". **Rev. Microbiol.**, 28:284-287, 1997.
- Destro, M. T., Carneiro, A.L., Olivo, R. Survival of *Listeria monocytogenes* during the production of Milano type salami. **XIII International Symposium on Problems of Listeriosis**. Halifax, Canada, 1998. Program and Abstract Book. Poster 65, p. 34 (Anexo 10)
- Destro, M.T., Leitao, M.F.F., Farber, J. M. Use of molecular typing to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. **Appl., Environ. Microbiol.**, 62(2):705-711, 1996.
- Destro, M.T., Paschoal, L.A. Avaliação de um teste imunológico para detecção de *Listeria* sp em alguns alimentos. **Anais do XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 11 a 15 de novembro de 1997, Rio de Janeiro RJ, p.276, 1997.
- Destro, M.T., Piva, F. C., Leitão, M.F.F., Landgraf, M. Occurrence of *Listeria* spp. in shrimp (*Penaeus brasiliensis*) from a Brazilian processing plant. In.: **3rd International ASEPT Conference**. Food Safety 94. Laval, France, 1-2 junho 1994, Proceedings, p. 330.
- Destro, M.T.; Serrano, A.M.; Kabuki, D.I. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, 2: 110-112. 1991. (Anexo 6)

- Dhokane, V.S.; Hajare, S.; Shashidhar, R.; Sharma, A.; Bandekar, J.R. Radiation processing to ensure safety of minimally processed carrot (*Daucus carota*) and cucumber (*Cucumis sativus*): optimization of dose for the elimination of *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.**, 69(2):444-448, 2006.
- Dramsi, S.I.; Biswas, I.; Maguin, E.; Braun, L.; Mastroeni, P.; Cossart, P. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of InlB, a surface protein of the internalin multigene family. **Mol Microbiol.** 16:251-261, 1995.
- Dussurget, O.; Pizarro-Cerda, J.; Cossart, P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. **Ann. Rev. Microbiol.**, 58:587-610, 2004.
- El-Marrakchi, A.; Hamama, A.; El Othmani, F. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products produced or imported into Morocco. **J. Food Prot.**, 56(3):256-259. 1993.
- Farber, J.M.; Peterkin, P.I. Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in meat products. In: **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. Ryser, E.T.; Marth, E.H. ed. Marcel Dekker, N.Y, 1999. p. 565-600.
- Farber, J.M.; Peterkin, P.I. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. **Microbiol. Rev.**, 55: 476-511, 1991.
- Farber, J.M.; Sanders, G.W.; Dunfield, S.; Prescott, R. The effect of various acidulants on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Lett. Appl. Microbiol.**, 9:181-183, 1989.
- Farber, J.; Peterkin, P. Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in meat products. In: **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. Ryser, E.T.; Marth, E.H. ed. Marcel Dekker, N.Y, 1999. p. 505-564.
- Food and Agriculture Organization. The trade impact of *Listeria monocytogenes* in fish products. Report of the FAO Expert consultation, Amherst, MS, 17-20 May, 1999. 41p.

Food Safety and Inspection Service. Is it done yet?
http://www.fsis.usda.gov/is_it_safe_yet, Consulta em 05/07/2006.

Gaillard, J.L., Berche, P.; Frehel, C.; Gouin, E.; Cossart, P. Entry of *Listeria monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. **Cell**, 65:1127-1141, 1991.

Gedde, M.M.; Higgins, D.E.; Tilney, L.G.; Portnoy, D.A. Role of listeriolisin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. **Infect. Immun.**, 68: 999-1003, 2000.

Gianfranceschi, M.; Aureli, P. Freezing and frozen storage on the survival of *Listeria monocytogenes* in different foods. **Ital. J. Food Sci.**, 8:303-309, 1996.

Gitter, M. Veterinary aspect of listeriosis. **PHLS Microbiol. Dig.**, 6: 38-42, 1989.

Graves, L.M.; Swaminathan, B.; Hunter, S.B. Subtyping *Listeria monocytogenes* In: **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. Ryser, E.T.; Marth, E.H. ed. Marcel Dekker, N.Y, 1999. p. 279-297.

Gray, M.J.; Zadoks, R.N.; Fortes, E.D.; Dogan, B.; Cai, S.; Chen, Y.; Scott, V.N.; Gombas, D.E.; Boor, K.J.; Wiedmann, M. Food and human isolates of *Listeria monocytogenes* from distinct but overlapping populations. **Appl. Environ. Microbiol.**, 70:5833-5841, 2004.

Hofer, C.B.; Melles, C.E.A.; Hofer, E. *Listeria monocytogenes* in renal transplant recipients. **Rev. Inst. Med. Trop.**, 41(6):375-377, 1999.

Hofer, E.; Nascimento, R.S.; Oliveira, M.A. Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 31(2):173-177, 1998.

Hofer, E.; Reis, C.M.F, Hofer, C.B. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas, isoladas de material clinico humano. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 39(1):32-37, 2006.

- Hofer, E.; Ribeiro, R.; Feitosa, D.P. Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 95(5):615-620, 2000.
- Holt, J.J. **Bergey's manual of determinative bacteriology**, 9th ed. William & Wilkins, Baltimore, M.D, 1994.
- ICMSF. **Microorganisms in foods**. 7 Microbiological testing in food safety management. Kluwer Academic/ Plenum Press, New York, 2002.
- ICMSF. *Microorganisms in foods*. Blackie, London, 1996, p. 141-182.
- ILSI. Achieving continuous improvement in reduction in foodborne listeriosis – A risk based approach. **J. Food Prot.**, 68 (9): 1932-1994, 2005.
- International Organization for Standardization. ISO 22000: Food safety management requirements for any organization in the food chain. Setembro, 2005.
- Jack, R.W.; Tagg, J.R.; Ray, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiol. Rev.**, 59:171-200, 1995.
- Jeffers, G.T.; Bruce, J.L.; Mc Donough, P.; Scarlett, J.; Boor, K.J.; Wiedmann, M. Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. **Microbiol.**, 147:1095-1104, 2001.
- Jinneman, K.C.; Wekell, M.M.; Eklund, M.W. Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in fish and seafood. In: **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. Ryser, E.T.; Marth, E.H. ed. Marcel Dekker, N.Y, 1999. p. 601-630.
- Johansson, J.; Mandin, P.; Renzoni, A.; Chiaruttini, C.; Springer, M.; Cossart, P. An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. **Cell**, 110: 551-561, 2002.

- Johnson, J.L.; Doyle, M.P.; Cassens, R.G.; Schoeni, J.L. Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimentally infected cattle and in hard salami. **Appl. Environ. Microbiol.**, 54:497-501, 1988.
- Kamat, A.; Warke, R.; Kamat, M.; Thomas, P. Low dose irradiation as a measure to improve microbial quality of ice cream. **Int. J. Food Microbiol.**, 62(1-2):27-35, 2000.
- Kathariou, S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. **J. Food Prot.**, 65:1811-1829, 2002.
- Kinoshita, E. M., Silvestre, F. A., Landgraf, M., Destro, M.T. Evaluation of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed gravad salmon. In: **87th Annual Meeting of the International Association for Food Protection**. Atlanta, Georgia, 2000. Program and abstract book of the 87th IAFP Annual Meeting, p. 21.
- Kocks, C.; Gouin, E.; Tabouret, M.; Berche, P.; Ohayon, H.; Cossart, P. *Listeria monocytogenes* – induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. **Cell**, 68:521-531, 1992.
- Kreft, J.; Vázquez-Boland, J.A. Regulation of virulence genes in *Listeria*. **Int. J. Med. Microbiol.**, 291:145-157, 2001.
- Kuhn, M.; Goebel, W. Pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. In: **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. Ryser, E.T.; Marth, E.H. ed. Marcel Dekker, N.Y, 1999. p. 97-130.
- Landgraf, I. M.; Kobata, A. M. M.; Jakabi, M.; Kirshbaum, C. R. A.; Marchi, C. R. Surto de meningite neonatal por *Listeria monocytogenes*. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 58(1):63-67, 1999.
- Lecuit, M.; Vandormael-Pournin, S.; Lefort, J.; Hirer, M.; Goumon, P.; Dupuy, C.; Babinet, C.; Cossart, P. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. **Science**, 292: 1722-1725, 2001.

- Leimeister-Wachter, M.; Domann, E.; Chakraborty, T. The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. **J. Bacteriol.**, 174:947-952, 1992.
- Lemes-Marques, E.G.; Cruz, C.D.; Destro, M.T. Pheno- and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates from the Southwestern region of the State of Sao Paulo (encaminhado para publicação; Anexo 1).
- Linnan, M.J.; Mascola, L.; Lou, X.D.; Goulet, V.; May, S.; Salminen, C.; Hird, D.H.; Yonekura, M.L.; Hayes, P.; Weaver, P.; Audurier, A.; Plikaytis, B.D.; Fannin, S.L.; Kleks, A.; Broome, C.V. Epidemic listeriosis associated with Mexican style cheese. **N. Engl. J. Med.**, 319: 823-828, 1988.
- Liserre, A.M.; Landgraf, M.; Destro, M.T.; Franco, B.D.G.M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* strain in modified atmosphere-packaged Brazilian sausage. **Meat Sci.**, 61:449-455, 2002 (Anexo 4)
- Loncarevic, S.; Danielsson-Tham, M.L.; Tham, W. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft and semi-soft cheeses in retail outlets in Sweden. **Int. J. Food Microbiol.**, 26(2):245-250.1995.
- Lou, Y.; Yousef, A.E. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In: **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. Ryser, E.T.; Marth, E.H. ed. Marcel Dekker, N.Y, 1999. p. 131-224.
- McClure, P.J.; Kelly, T.M.; Roberts, T.A. The effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Int. J. Food Microbiol.**, 14:77-92, 1991.
- McLauchlin, J.; Low, J.C. Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational disease of veterinarians and farmers. **Vet. Rec.**, 135: 615-617, 1994.

- McLauchlin, J.; Mitchell, 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. J. Food Microbiol.**, 92: 15-33, 2004.
- Mead, P.S.; Slutsker, L.; Dietz, V.; McCaig, L.F.; Bresee, J.S.; Shapiro, C.; Griffin, P.M.; Tauxe, R.V. Food-related illness and death in limited States. **Emerg. Infect. Dis.**, 5: 607-625, 1999.
- Mengaud, J.; Ohayon, H.; Gounon, P.; Mege, P.M.; Cossart, P. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. **Cell**, 84:923-932, 1996.
- Moura, S.M., Destro, M.T., Franco, B.D.G.M. Occurrence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in Sao Paulo, Brazil. **Int. J. Food. Microbiol.**, 19: 229-237, 1993.
- Murray, E.G.D; Webb, R.A; Swann, H.B.R. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). **J. Pathol. Bacteriol.**, 29: 407-439, 1926.
- Okamoto, M.; Nakane, A.; Minagawa, T. Host resistance to an intragastric infection with *Listeria monocytogenes* in mice depends on cellular immunity and intestinal bacterial flora. **Infect. Immun.**, 62: 3080-3085, 1994.
- Paschoal, L. A.; Destro, M.T. Avaliação de um teste imunológico para a detecção de *Listeria* sp em alguns tipos de alimentos. In: **Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 1997. Rio de Janeiro, RJ. Resumos do CBM.
- Pagotto, F.; Corneau, N.; Farber, J. *Listeria monocytogenes* infections. In: **Foodborne infections and intoxications**. 3ed. Elsevier. p. 313-340, 2006.
- Parrish, M.E.; Higgins, D.P. Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems. **J. Food Prot.**, 52:144-147, 1989.

- Petran, R.L.; Swanson, K.M.J. Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. **J. Food Prot.**, 7:616-618, 1993.
- Pinil, P.N.; Gilbert, R.J. The occurrence in the U.K. of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. **Int. J. Food Microbiol.**, 6 (4):317-326.1988.
- Pintado, C.M.B.S.; Oliveira, A.; Pampulha, M.E.; Ferreira, M.A.S.S. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheeses. **Food Microbiol.**, 22:79-85, 2005.
- Portnoy, D.A.; Chakraborty, T.; Goebel, W.; Cossart, P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. **Infect. Immun.** 60:1263-1267, 1992.
- Riedo, F.X.; Pinner, R.W.; Tosca, M.L.; Cartter, M.L.; Graves, L.M.; Reeves, M.W.; Weaver, R.E.; Plikaytis, B.D.; Broome, C.V. A point-source foodborne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness. **J. Infect. Dis.**, 170(3):693-696, 1994.
- Ripio, M.T.; Dominguez-Bernal, G.; Suarez, M.; Brehm, K.; Berche, P.; Vázquez-Boland, J.A. Transcriptional activation of virulence genes in wild-type strains of *Listeria monocytogenes* in response to a change in the extracellular medium composition. **Res. Microbiol.**, 147: 371-384, 1996.
- Robison, B.J. Immunodiagnostics in the detection of foodborne pathogens. In: Tortorello, M.L.; Gendel, S.M. **Food microbiology analysis**. New Cork: Marcel Dekker, 1997, p. 69-89.
- Rocha, J.S.; Buriti, F.C.A.; Saad, S.M. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 58(2):263-272, 2006.
- Rocourt, J. The genes *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: **Listeria, Listeriosis and Food safety**. Ryser, E.T.; Marth, E.H. ed. Marcel Dekker, N.Y, 1999. p. 1-20.

- Rocourt, J. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: **Listeria, Listeriosis and food Safety**. Ryser, E.T.; Marth, E.H.. New York: Marcel Dekker, 1999, p. 1-20.
- Rocourt, J.; Cossart, P. *Listeria monocytogenes*. In: Doyle, M.P.; Beuchat, L.R.; Montville, T. **Food Microbiology**, ASM, 1997. p. 337-352.
- Rocourt, J.; Jacquet, C.; Reilly, A. Epidemiology of human listeriosis and seafood. **Int. J. Food Microbiol.**, 62:197-209, 2000.
- Rocourt, J.; Seeliger, H.P.R. Distribution des espèces du genre *Listeria*. **Zentralbl. Bakteriol. Microbiol. Hyg. A**, 259: 317-330, 1985.
- Rodrigues, D.A.; Landgraf, M.; Destro, M.T. Evaluation of two commercial methods for the detection of *Listeria* sp and *Listeria monocytogenes* in a chicken nugget processing plant. **Can. J. Microbiol.**, 48(3):275-278, 2002.
- Rorvick, L.M.; Yndestad, M. *Listeria monocytogenes* in foods in Norway. **Int. J. Food Microbiol.**, 13(2):97-104.1991.
- Ryser, E.T. Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in cheese and other fermented dairy products. In: **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. Ryser, E.T.; Marth, E.H. ed. Marcel Dekker, N.Y, 1999, p. 411-503. a.
- Ryser, E.T. Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in unfermented dairy products. In: **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. Ryser, E.T.; Marth, E.H. ed. Marcel Dekker, N.Y, 1999, p. 359-409. b.
- Sakate, R.I., Aragon-Alegro, L.C., Raghianti, F., Landgraf, M., Franco, B.D.G.M., Destro, M.T. Quantificação de *Listeria monocytogenes* em salames fatiados embalados a vácuo. **Arch. Latinoamer. Nut.**, v.53, p.184-187, 2003
- Sakate, R.I.; Moscardi-Júnior, 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. Book of Abstracts.

São Paulo. Centro de Vigilância Sanitária da Secretaria de Estado da Saúde. Portaria CVS 6/99 de 10/03/99.

Scheech, W.F. III; Lavigne, P.M.; Bortoluni, R.A.; Allen, A.C.; Haldene, E.V.; Wort, A.J.; Hightower, A.W.; Johnson, S.E.; King, S.H.; Nicholls, E.S.; Broome, C.V. Epidemic listeriosis: evidence for transmission by food. **N. Engl. J. Med.**, 308: 203-206, 1983.

Schlech, W.F. *Listeria* gastroenteritis - old syndrome, new pathogen. **N. Engl. J. Med.**, 336: 130-132, 1997.

Schwab, J.P.; Edelweiss, M.I.A. Identificação de *Listetia monocytogenes* em placentas humanas e espécimes de aborto pela técnica de imunoistoquímica. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, 39(2):111-114, 2003.

Seeliger, H.P.R. **Listeriosis.** Karger Verlag, Basel. 1961

Silva, M.C.D.; Destro, M.T.; Hofer, E.; Tibana, A. Characterization and evaluation of some virulence markers of *Listeria monocytogenes* strains isolated from Brazilian cheeses using molecular, biochemical and serotyping technics. **Int. J Food Microbiol.**, 63:275-280, 2001. (Anexo 2)

Silva, M.C.D.; Hofer, E.; Tibana, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Food Prot.**, 61(3):354-356. 1998.

Silva, W.P.; Lima, A.S.; Gandra, E.A.; Araujo, M.R.; Macedo, M.R.P.; Duval, E.H.; *Listeria* spp. no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. **Cienc. Rural**, 34(3):911-916, 2004.

Silvestre, F.A., Destro, M.T. Avaliação de *Listeria monocytogenes* no processamento industrial de salmão (*Salmo salar*) Gravlax. **Anais do XX**

Congresso Brasileiro de Microbiologia, 24 a 28 de outubro de 1999, Salvador BA, p.347,1999.

Slutsker, L.; Schuchat, A. Listeriosis in humans. In: **Listeria, Listeriosis and Food safety**. Ryser, E.T.; Marth, E.H. ed. Marcel Dekker, N.Y, 1999. p. 75-95.

Sommers, C.; Fan, X. Gamma irradiation of fine-emulsion sausage containing sodium diacetate. **J. Food Prot.**, 66(5):819-824, 2003.

Sommers, C.H.; Boyd, G. Elimination of *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat turkey and cheese tortilla wraps using ionizing radiation. **J. Food Prot.**, 68(1):164-167, 2005.

Tilney, L.G.; Portnoy, D.A. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. **J. Cell. Biol.**, 109: 1597-1608, 1989.

U.S. Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service. **Microbiology Laboratory Handbook**. Dey, B.P. ed.; v. 1 e 2, 3rd ed, 1998. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/ophs/Microlab/MIgbook.pdf>. Consulta em 20/07/06.

U.S. Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg, and environmental samples. Rev. 04, 2005. 21p. Disponível em: http://www.fsis.usda.gov/ophs/Microlab/MIg-8_04.pdf. Consulta em 20/07/06.

U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Department of Agriculture. Quantitative Assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. 2003. Disponível em www.foodsafety.gov/~dms/emr2-toc.html. Consulta em 18/06/2006.

U.S. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Bacteriological Analytical Manual**. January, 2001. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>. Consulta em 20/07/06

User's Guide. **BAX® System** PCR assay with automated detection for bacterial screening. Wilmington, DE. Du Pont Qualicon, 2000.

Valk, H.; Vaillant, V.; Jacquet, C.; Rocourt, J.; Le Querrec, F.; Stainer, F.; Quelquejeu, N.; Pierre, O.; Pierre, V.; Desenclos, J.C.; Goulet, V. Two consecutive nationwide outbreaks of listeriosis in France, October 1999-February 2000. **Am. J. Epidemiol.**, 154(10): 944-950, 2001.

Vázquez-Boland, J.A.; Dominguez-Bernal, G.; González-Zorn, B.; Kreft, J.; Goebel, W. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. **Microbiol. Infect.**, 3:571-584, 2001a.

Vázquez-Boland, J.A.; Kuhn, M.; Berche, P.; Chakraborty, T.; Domínguez-Bernal, G.; Goebel, W.; González-Zorn, B.; Wehland, J.; Kreft, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clin. Microbiol. Rev.** 14(3): 584-640, 2001b.

Vieira, S.D.; Poiatti, M.L.; Schocken-Iturrino, R.P.; Vieira, H.; Andrade, T.M. *Listeria monocytogenes* in type "Minas Frescal" craft cheese, marketed in the area of Araguaína – TO. In: **XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, 11, 2001, Foz do Iguaçu. **Anais.** p.405.

Von Laer, A. E., Trindade, P.S.; Andrigheto, C.; Destro, M.T.; Silva, W.P. Linhagens persistentes de *Listeria monocytogenes* identificadas através de PFGE em uma planta de processamento de lingüiça mista frescal. In: **XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 11, 2005, Santos, SP. **Anais.** CD.

WHO working group. Foodborne listeriosis. **Bull. WHO**, 66:421-428, 1988.

Wiedmann, M. Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 85:524-531, 2002a.

Wiedmann, M. Subtyping technologies for bacterial foodborne pathogens. **Nutr. Rev.**, 60: 201-208, 2002b.

- Wiedmann, M.; Bruce, J.L.; Keating, C.; Johnson, A.E.; Mc Donough, P.L.; Batt, C.A. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. **Infect. Immun.**, 65:2707-2716, 1997.
- Zhao, T., Doyle, M.P., Zhao, P. Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganisms. **Appl. Environ. Microbiol.**, 70(7):3996-4003, 2004.
- Zhao, T., Podtburg, T.C., Zhao, P., Schmidt, B.E., Baker, D.A., Cords, B., Doyle, M.P. Control of *Listeria* spp by competitive-exclusion bacteria in floor drains of a poultry processing plant. **Appl. Environ. Microbiol.**, 72(5):3314-3320, 2006.
- Zhu, M.J.; Mendonça, A.; Ismail, H.A.; Du, M.; Lee, E.J.; Ahn, D.U. Impact of antimicrobial ingredients and irradiation on the survival of *Listeria monocytogenes* and the quality of ready-to-eat turkey ham. **Poultry Sci.**, 84(4):613-620, 2005.