

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**RASTREAMENTO DE *Listeria monocytogenes* EM INDÚSTRIAS
PROCESSADORAS DE QUEIJO FRESCAL TIPO LATINO, NOS
ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA,
EMPREGANDO A SUBTIPAGEM MOLECULAR**

Dirce Yorika Kabuki

**Bióloga
Mestre em Tecnologia de Alimentos**

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Orientador

Profa. Dra. Kathryn J. Boor
Co-orientadora

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS para obtenção do Título de
Doutor em Tecnologia de Alimentos**

Campinas, SP

2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

K113r Kabuki, Dirce Yorika
Rastreamento de *Listeria monocytogenes* em indústrias
processadoras de queijo frescal tipo latino, nos Estados
Unidos da América, empregado a subtipagem molecular /
Dirce Yorika Kabuki. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Co-orientador: Kathryn J. Boor
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.*Listeria monocytogenes*. 2.Reação em cadeia da
polimerase. 3.Virulência (Microbiologia). 4.Queijo.
5.Microbiologia molecular. I.Kuaye, Arnaldo Yoshiteru.
II.Boor, Kathryn J. III.Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
IV.Título.

DIRCE YORIKABUKI

**RASTREAMENTO DE *Listeria monocytogenes* EM INDÚSTRIAS PROCESSADORAS DE
QUEIJO FRESCAL TIPO HISPÂNICO DOS ESTADOS UNIDOS, UTILIZANDO
SUBTIPAGEM MOLECULAR**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de
Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de Doutor
em Tecnologia de Alimentos.

Aprovado em Campinas, de de 2004.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Presidente

Profa. Dra. Maria Teresa Destro
Membro

Dra Maria Helena Castro Reis Passos
Membro

Profa. Dra. Walkiria Hanada Viotto
Membro

Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão
Membro

Prof Dr. José Luiz Pereira
Membro

Prof. Dr. Ernani Porto
Membro

*Ao Arnaldo, presente em todos
os momentos, e as nossas filhas,
Ana Paula e Fernanda*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye pela orientação e incentivo;

À Profa Dra Kathryn J. Boor e Prof. Dr. Martin Wiedmann da *Food Safety Laboratory of Food Science Department of Cornell University* pela acolhida, orientação e incentivo;

À Profa. Dra. Walkiria Hanada Viotto, ao Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão, à Profa Dra. Maria Teresa Destro, à Dra. Maria Helena Castro Reis Passos, ao Prof. Dr. Ernani Porto e ao Prof. Dr. José Luiz Pereira pelo incentivo, sugestões e correções da tese;

À Adriana, Maurício, Alexandre, Andréa, Mariana e Ilma pela amizade, carinho, apoio e acolhida em Ithaca;

À Sharinne Sukhnand e Steve Murphy do *Food Science Department* pela amizade e ajuda na coleta e análise das amostras;

Aos colegas do *Food Safety Laboratory*, Adam, Ester, Brian, Mario, Roberta, Celine, Kyle, Steve, David, Marie, Rachel, Joanne, Michaela, Adriana, Ângela pela acolhida e ensinamentos;

À minha mãe Miyko, a quem posso confiar os cuidados de minhas filhas Ana Paula e Fernanda;

À minha amiga Maria Helena, pelo ombro amigo sempre;

Aos colegas do Laboratório de Higiene do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Valéria, Celina, Ana Lúcia, João, Juliane, Cíntia, Raquel, Eduardo, Andrea, D. Jacinta e D. Denir pela amizade e incentivo;

A todos os colegas do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, companheiros de todos os dias;

À Creusa Nomura pela atenção e carinho em todos os momentos;

Ao Cosme Perota pela atenção e paciência;

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP por permitir o afastamento para realização deste trabalho na *Cornell University*;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP e a *New York State Office of Science, Technology, and Academic Research* pelo suporte financeiro;

À todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

[...] talvez não tenhamos conseguido
fazer o melhor, mas lutamos para que o
melhor fosse feito [...] Não somos o que
deveríamos ser, mas somos o que iremos ser.
Mas graças a Deus, não somos o que éramos.
(Martin Luther King)

SUMÁRIO

<u>Assunto</u>	<u>página</u>
Índice de quadro	xv
Índice de tabelas	xv
Índice de figuras	xv
Resumo Geral	xvii
Summary	xix
 INTRODUÇÃO GERAL	 1
 CAPÍTULO I	 5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1. Classificação Taxonômica de <i>Listeria</i>	7
2. Características Morfológicas e Bioquímicas de <i>Listeria</i> spp.	8
3. Patogenia e Genes de Virulência de <i>L. monocytogenes</i>	9
3.1. Processo infeccioso	9
3.2. Fatores de virulência	10
3.2.1. <i>Internalinas</i>	11
3.2.2. <i>Listeriolisina O</i>	13
3.2.3. <i>Proteína ActA</i>	14
3.2.4. <i>Outros</i>	15
4. Listeriose	16
4.1. Sintomas e dose infecciosa	17
4.2. Surtos e casos associados aos produtos lácteos	18
5. Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> em Estabelecimentos Processadores de Produtos Lácteos	21
6. <i>L. monocytogenes</i> em Queijos Tipo Frescal	25
6.1. Alguns tipos de queijo frescal da América Latina	25
6.2. Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i>	30
7. Métodos de Detecção de <i>L. monocytogenes</i> em Alimentos	34
8. Métodos de Subtipagem de <i>L. monocytogenes</i>	37
8.1. Sorotipagem	38
8.2. Fagotipagem	39
8.3. Eletroforese de enzima multilocos	39
8.4. Análise de restrição do DNA cromossomal	40
8.5. Reação em cadeia da polimerase	40
8.6. DNA polimórfico amplificado aleatoriamente	41
8.7. PCR- Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição	41

8.8.Eletroforese em gel de campo pulsante	42
8.9.Ribotipagem	42
8.10.Seqüenciamento de DNA	44
9. Aplicações dos Métodos de Subtipagem	45
9.1.Avaliação de surtos de listeriose de origem alimentar	45
9.2.Diagnóstico da contaminação nas indústrias de alimentos	47
9.3.Caracterização do potencial patogênico	52
10.Referências Bibliográficas	55
 CAPÍTULO II	 83
MOLECULAR SUBTYPING AND TRACKING OF <i>Listeria monocytogenes</i> IN LATIN-STYLE FRESH CHEESE PROCESSING PLANTS	83
ABSTRACT	86
INTRODUCTION	88
MATERIALS AND METHODS	90
Processing plant and sample collection	90
<i>L. monocytogenes</i> detection	91
PCR-based Identification of <i>L. monocytogenes</i>	92
Virulence gene allele characterization	92
Ribotyping	93
RESULTS	93
Occurrence of <i>Listeria</i> spp and <i>L. monocytogenes</i> in cheese and environmental samples	93
Molecular subtyping	94
Evaluation of FDA method and BCM-LMDS	95
DISCUSSION	96
<i>L. monocytogenes</i> and <i>Listeria</i> contamination patterns	96
Tracking of <i>L. monocytogenes</i> contamination patterns by molecular subtyping	98
<i>L. monocytogenes</i> detection methods	100
CONCLUSIONS	102
ACKNOWLEDGMENTS	103
REFERENCES	104
 CONCLUSÕES GERAIS	 115
 APÊNDICE	 117
APÊNDICE A. Descrição das Indústrias	119

APÊNDICE B. Descrição das Técnicas de PCR	123
APÊNDICE C. Imagens dos Meios Seletivos de Isolamento de <i>L. monocytogenes</i>	135
APÊNDICE D. Imagens das Amostras de Queijos Coletadas	137
APÊNDICE E. Imagens das Superfícies Ambientais Positivas para <i>L. monocytogenes</i>	141

LISTA DE QUADRO

	<u>Página</u>
Quadro 1. Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> em queijos tipo fresco	31

LISTA DE TABELAS

Table 1. Occurrence of <i>L. monocytogenes</i> in Latin-style fresh cheese processing plants	110
Table 2. Occurrence of <i>L. monocytogenes</i> in environmental samples collected in three Latin-style soft cheese processing plants	110
Table 3. <i>L. monocytogenes</i> contamination patterns and subtyping results for three Latin-style soft cheese processing plants	111
Table 4. Comparison of BCM-LMDS and FDA methods for detection of <i>L. monocytogenes</i> from 246 environmental samples	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gel de eletroforese do fragmento de <i>hlyA</i> amplificado para identificação de <i>L. monocytogenes</i> .	125
Figura 2. Gel de eletroforese do polimorfismo alélico de <i>actA</i> .	127
Figura 3. Gel de eletroforese de <i>hlyA</i> amplificado para tipagem de <i>L. monocytogenes</i>	129
Figura 4. Gel de eletroforese do polimorfismo alélico de <i>hlyA</i> após digestão enzimática.	131
Figura 5. Gel de eletroforese do polimorfismo alélico de <i>hlyA</i> após digestão enzimática.	131
Figura 6. <i>L. monocytogenes</i> em meios seletivos provenientes de uma amostra de queijo fresco.	135

Figura 7. Amostras de queijo coletadas na fábrica A	137
Figura 8. Amostras de queijo coletadas nas fábricas B e C	139
Figura 9. Amostras ambientais positivas para <i>L. monocytogenes</i> encontradas na fábrica A	141
Figura 10. Amostras ambientais positivas para <i>L. monocytogenes</i> encontradas na fábrica B	143
Figura 11. Amostras ambientais positivas para <i>L. monocytogenes</i> encontradas na fábrica C	145

RESUMO GERAL

Os queijos frescais estilo Hispânico são alimentos de alto risco à contaminação por *L. monocytogenes* e já foram associados à pelo menos dois surtos de listeriose nos Estados Unidos da América. O conhecimento maior das fontes de contaminação por *L. monocytogenes* no processamento de queijos frescos tipo Hispânico é crítico para permitir o desenvolvimento de estratégias mais eficazes para o controle deste perigo. Neste trabalho, foi realizado um diagnóstico da contaminação por *L. monocytogenes* em três indústrias processadoras de queijos frescais tipo Hispânico, nos Estados Unidos. Um total de 246 amostras ambientais foi coletado e analisado para *L. monocytogenes* utilizando-se o método preconizado pela “Food and Drug Administration” (FDA) e o método “Biosynth *L. monocytogenes* detection system” (LMDS). As amostras de queijo, produzidos nestas indústrias (n=111), foram analisadas utilizando-se o método da FDA, modificado pela inclusão dos meios de cultura “*L. monocytogenes* plating medium” (LMPM) e “*Listeria monocytogenes* confirmatory plating medium” (LMCM) utilizados no método LMDS. *L. monocytogenes* foi detectada em 6,3% dos queijos e 11,0% das amostras ambientais. Dentre as amostras ambientais, aquelas obtidas de caixa vazada de plástico, dreno e piso apresentaram alta ocorrência de *L. monocytogenes*, com taxas de 55,6%, 30,0% e 20,6%, respectivamente. Apenas uma indústria apresentou resultados positivos em amostras de queijos e de superfícies que contatavam o alimento. O método da FDA mostrou maior sensibilidade do que o método LMDS para detecção de *L. monocytogenes* em amostras ambientais, e a inclusão dos meios LMPM e LMCM não melhorou a performance do método do FDA para detecção do patógeno em queijos. A subtipagem molecular, através da análise alélica dos genes de virulência *actA* e *hly* e da ribotipagem automatizada, foi utilizada para traçar a contaminação por *L. monocytogenes* nas indústrias. O ribotipo DUP-1044A, que havia sido previamente associado a surtos de listeriose humana em vários estados nos Estados Unidos em 1998, foi o subtipo mais comumente identificado

(20/36 isolados) e foi isolado em 2 estabelecimentos. Este ribotipo se mostrou persistente e amplamente disseminado em uma das indústrias, onde foi também responsável pela contaminação do produto final. Nossa hipótese é que cepas deste ribotipo tenham habilidade específica em permanecer no ambiente de processamento. Apesar dos surtos de listeriose terem sido associados a queijos Hispânicos produzidos com leite não pasteurizado, os resultados obtidos neste trabalho revelam que a permanente contaminação ambiental pode representar outra fonte importante de contaminação do produto final.

SUMMARY

Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in Latin-style fresh cheese processing plants

Latin-style fresh cheeses, which have been linked to at least two human listeriosis outbreaks in the US, are considered to be high risk foods for *Listeria monocytogenes* contamination. We evaluated *L. monocytogenes* contamination patterns in three Latin-style fresh cheese processing plants to gain a better understanding of *L. monocytogenes* contamination sources in the manufacture of these cheeses. Over a 6-month period, 246 environmental samples were collected and analyzed for *L. monocytogenes* using both the Food and Drug Administration (FDA) method and the Biosynth *L. monocytogenes* detection system (LMDS). Finished cheese samples from the same plants (n=111) were also analyzed by the FDA method, which was modified to include *L. monocytogenes* plating medium (LMPM) and the *L. monocytogenes* confirmatory plating medium (LMCM) used in the LMDS method. *L. monocytogenes* was detected in 6.3% of cheese and 11.0% of environmental samples. Crates, drains and floor samples showed the highest contamination rates with 55.6%, 30.0% and 20.6% *L. monocytogenes* positive samples, respectively. Finished products and food contact surfaces were positive in only one plant. The FDA method showed a higher sensitivity than the LMDS method for detection of *L. monocytogenes* from environmental samples. The addition of LMPM and LMCM media did not further enhance the performance of the FDA method for *L. monocytogenes* detection from finished products. Molecular subtyping (PCR-based allelic analysis of the virulence genes *actA* and *hly* and automated ribotyping) was used to track contamination patterns. Ribotype DUP-1044A, which had previously been linked to a 1998 multistate human listeriosis outbreak in the US, was the most

commonly identified subtype (20/36 isolates) and was isolated from two plants. This ribotype was persistent and widespread in one factory, where it was also responsible for the contamination of finished products. We hypothesize that this ribotype may represent a clonal group with a specific ability to persist in food processing environments. While previous listeriosis outbreaks were linked to Latin-style fresh cheeses made from unpasteurized milk, the presence of this organism in pasteurized cheese products illustrates that persistent environmental contamination also represents an important source of finished product contamination.

INTRODUÇÃO GERAL

Listeria monocytogenes é um patógeno que emergiu na década de 80 como um agente causador de doença transmitida por alimentos, denominada listeriose, caracterizada principalmente por septicemia, meningite e meningoencefalite, nos casos mais graves. A listeriose acomete preferencialmente os idosos, crianças, gestantes e pessoas imunodeprimidas. Em pessoas saudáveis, os relatos mais recentes de surtos têm evidenciado casos de gastroenterite. Devido à alta taxa de mortalidade nos casos graves, é um agente que desperta atenção especial das autoridades governamentais responsáveis pelo controle sanitário e da comunidade científica da área de alimentos. As pesquisas neste campo então, passaram a se intensificar visando novos conhecimentos que poderiam contribuir para o seu controle e possível redução dos casos e surtos.

Os surtos e casos de listeriose têm sido associados a diversos alimentos, tanto de origem vegetal como animal. Dentre os surtos causados por produtos lácteos, o queijo frescal tipo Mexicano já foi incriminado em 2 surtos nos Estados Unidos da América.

As fontes de contaminação de queijos podem ser o leite ou o ambiente de processamento. Atualmente, sabe-se que as vias de contaminação do leite cru são a mastite bovina e o ambiente, e que o processo de pasteurização adequado garante a destruição de *L. monocytogenes* no leite. Esta bactéria é encontrada em queijos, principalmente nos elaborados com leite sem pasteurização. Porém, em queijos elaborados com leite pasteurizado este agente também já foi isolado. Os trabalhos realizados nas indústrias revelam que a contaminação cruzada após a pasteurização do leite seria a fonte de contaminação dos queijos. Especificamente em indústrias processadoras de queijo tipo frescal, as pesquisas ainda são escassas.

Com respeito aos aspectos da legislação, a Agência de Saúde Pública dos Estados Unidos estabelece tolerância zero para *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo, sendo que, alimentos contendo o patógeno são recolhidos pelas autoridades competentes. No Brasil, os padrões microbiológicos estabelecem

ausência de *L. monocytogenes* em 25 gramas de queijos. Todavia, esta bactéria já foi isolada de vários produtos lácteos, inclusive queijo Minas frescal.

Quanto aos métodos de detecção de *L. monocytogenes*, pesquisas recentes têm proposto o uso de meios de cultura baseados na detecção da enzima fosfatidilinositol fosfolipase C (PI-PLC) para isolamento de *L. monocytogenes* em alimentos. No “Biosynth chromogenic media - *Listeria monocytogenes* detection system” (BCM-LMDS), os meios de enriquecimento e isolamento contêm substratos fluorogênico e cromogênico, respectivamente, para detectar a presença desta enzima e diferenciar *L. monocytogenes* de outras espécies de *Listeria*. A vantagem deste sistema é que os testes bioquímicos para identificação não são necessários e isto promove uma redução no tempo total de análise.

Os métodos de genotipagem desenvolvidos, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), a eletroforese em gel de campo pulsante (PFGE), o polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RFLP), a análise de restrição do DNA cromossomal (REA), o DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) e a ribotipagem, estão se constituindo em ferramentas valiosas na elucidação da cadeia epidemiológica dos surtos e auxiliando na detecção das relações genéticas existentes entre cepas isoladas de alimentos, animais, homem e ambientes. Estes métodos também estão sendo usados na caracterização da virulência das cepas e, em alguns trabalhos, já se evidenciou a existência de diferentes linhagens de *L. monocytogenes*, sendo uma delas considerada não virulenta ou de virulência atenuada.

O grau de caracterização não tão específico alcançado pelos métodos tradicionais de detecção e identificação, talvez conduza desnecessariamente ao descarte e/ou recolhimento de alimentos contaminados com linhagens não virulentas ou de virulência atenuada.

O conhecimento da existência de *L. monocytogenes* em queijos tipo frescal, associado ao risco pelo consumo destes produtos, nos levou a crer na importância da avaliação das etapas de processamento deste alimento, na tentativa de verificar os reais pontos críticos de contaminação e a fonte de contaminação deste

patógeno durante a produção, sendo as técnicas genéticas ferramentas fundamentais para o estudo.

Diante deste contexto, este trabalho foi proposto com o objetivo de caracterizar o padrão de contaminação de *L. monocytogenes* em indústrias produtoras de queijo fresco Hispânico utilizando-se diferentes estratégias de detecção e métodos de subtipagem molecular. E, conseqüentemente dar subsídios para o seu controle e eliminação na indústria, na tentativa de proporcionar alimentos mais seguros à população.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Classificação Taxonômica de *Listeria*

Em 1926, Murray e colaboradores realizaram o primeiro isolamento de *Listeria monocytogenes* em sangue de coelhos e o denominaram de *Bacterium monocytogenes*. Três anos depois, o mesmo foi isolado de fígado infectado de camundongo africano por Pirie, que o nomeou de *Listerella hepatolytica*. Posteriormente, soube-se que *B. monocytogenes* e *L. hepatolytica* eram o mesmo microrganismo e o nome foi alterado para *Listerella monocytogenes*. Em 1939, foi descoberto que desde 1906 o nome *Listerella* já era usado na designação de um grupo de bolores. Então, em 1940, Pirie propôs a mudança do nome *Listerella monocytogenes* para *Listeria monocytogenes*, que foi aceita e adotada na 6ª edição do “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology”. Em 1954, foi aprovado pela Comissão Judicial de Nomenclatura e Taxonomia Bacteriológica (Ryser; Marth, 1991).

Na 9ª edição do “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (Seeliger; Jones, 1986), o gênero *Listeria* encontra-se na seção 14, no grupo dos bastonetes regulares Gram positivos e não esporogênicos. O gênero inclui cinco espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. ivanovii*. Inclui ainda três espécies com classificação incerta: *L. grayi*, *L. murrayi* e *L. denitrificans*.

Em 1987, *L. denitrificans* foi renomeado como *Jonesia denitrificans*, baseado nas características bioquímicas e através da análise de 16S rRNA (ácido nucléico ribossômico) (Rocourt *et al.*, 1987). Na 9ª edição do “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” (Holt *et al.*, 1994), *L. denitrificans* foi transferido para o gênero *Jonesia*, no grupo 20 dos bastonetes Gram positivos irregulares não esporogênicos, e o gênero *Listeria* encontra-se no grupo 19, passando a apresentar 7 espécies, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* e *L. murrayi*.

Com base em estudos mais recentes empregando a hibridização de DNA-DNA, análise de restrição de enzima multilocos e seqüenciamento de 16S rRNA, o

gênero *Listeria* compreende 6 espécies divididas em 2 linhas de descendência: i) *L. monocytogenes* e espécies proximamente relacionadas, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* e subsp. *londoniensis*, e ii) *L. grayi* (*L. murrayi* foi recentemente incluída nesta espécie) (Rocourt; Cossart, 1997). As espécies da primeira (i) podem ser divididas em 2 grupos: a) *L. monocytogenes* e *L. innocua* e b) *L. ivanovii*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri* (Rocourt, 1999).

Atualmente, na segunda edição do “Taxonomic Outline of the Prokaryotic Genera Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”, o gênero *Listeria* encontra-se classificada na Classe *Bacilli*, Ordem I *Bacillales* e família IV *Listeriaceae* (Garrity *et al.*, 2001).

2. Características Morfológicas e Bioquímicas de *Listeria* spp

Morfolologicamente, os microrganismos do gênero *Listeria* apresentam a forma de pequenos bastonetes Gram positivos. Em meio semi-sólido, a 20-25°C, apresentam mobilidade típica na forma de guarda-chuva. As colônias, quando em meios de cultura claros e translúcidos e sob luz oblíqua transmitida, apresentam coloração azul esverdeada (Seeliger; Jones, 1986).

São aeróbios e anaeróbios facultativos (Seeliger; Jones, 1986). Proliferam numa faixa de temperatura de -0,4 a 50°C (Farber; Peterkin, 1991) com crescimento ótimo a 30-37°C (Seeliger; Jones, 1986). Podem crescer a pH variando entre 4,3 a 9,6 (Donnelly, 2001), atividade de água (Aa) mínima de 0,90 (Farber *et al.*, 1992) e toleram altas concentrações de cloreto de sódio, sobrevivendo a 25,5 % de NaCl (Donnelly, 2001).

As características bioquímicas utilizadas para identificação das bactérias do gênero *Listeria* são: produção de catalase, não produção de oxidase, fermentação de glicose com produção de ácido láctico sem produção de gás, provas de Voges Proskauer e vermelho de metila positivas, a capacidade de hidrolizar a esculina, e a incapacidade de utilizar a uréia. A diferenciação da espécie se faz através das provas de redução de nitrato, produção de β -hemolisina, utilização do manitol,

ramnose e xilose e Camp teste. *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri* são produtoras de β -hemolisina. *L. welshimeri*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri* utilizam a xilose. *L. grayi* utiliza o manitol. No Camp teste, *L. monocytogenes*, e *L. seeligeri* apresentam hemólise sinérgica com *Staphylococcus aureus* e *L. ivanovii* com *Rodococcus equi* (Ryser; Donnelly, 2001).

3. Patogenia e Genes de Virulência de *L. monocytogenes*

L. monocytogenes é uma bactéria intracelular com habilidade em multiplicar-se dentro do citoplasma da célula hospedeira e não confinado por uma membrana vacuolar do hospedeiro. Ela não somente se protege do sistema imune do hospedeiro, como também é transmitida de célula para célula sem deixar o citoplasma do hospedeiro. É um parasita que penetra, multiplica-se e é transmitido de célula para célula em macrófagos, fibroblastos e enterócitos (Tilney; Portnoy, 1989).

3.1. Processo infeccioso

A primeira etapa da infecção deste microrganismo parece ser uma associação com a membrana plasmática das células epiteliais do microvilos do hospedeiro. Ele então, é internalizado pela célula por fagocitose e reside no vacúolo. Na próxima etapa, após 30 minutos, a *L. monocytogenes* torna-se livre da encapsulação do fagossoma pela lise da membrana fagossomal. As bactérias livres no citoplasma multiplicam-se e induzem a polimerização da actina da célula hospedeira, ficando rodeadas por filamentos de actina (como uma camada amorfa). Cerca de 2 horas após a infecção, os filamentos de actina tornam-se organizados e orientados paralelamente, formando uma cauda longa parecida com um cometa. Na etapa seguinte, a *Listeria* é transferida de uma célula infectada a uma célula vizinha não infectada e o contato é realizado entre a ponta da extensão da *Listeria* com a cauda longa (cometa) que a propulsiona à célula adjacente, formando um pseudopodo. Ocorre então, uma fagocitose do pseudopodo que contém a *Listeria* e parte de sua cauda pela célula adjacente. Um novo fagossoma contendo um

vacúolo dentro de outro vacúolo é formado. A *Listeria* fica inclusa num vacúolo de dupla membrana (membrana plasmática do pseudopodo da célula doadora e da nova célula hospedeira). A bactéria escapa rapidamente (dentro de 5 minutos) deste vacúolo dissolvendo a dupla membrana, atinge o citoplasma e assim, inicia um novo ciclo de vida em uma nova célula. Desta maneira, ela se multiplica e se espalha de uma célula a outra sem deixar o citoplasma do hospedeiro (Tilney; Portnoy, 1989; Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

Após romper a barreira intestinal, a *L. monocytogenes* atinge, via linfa e sangue, o fígado e o baço onde normalmente a infecção cessa pela defesa específica do hospedeiro, em particular os neutrófilos (Cossart, 2002). Noventa por cento (90%) dos microrganismos são eliminados pelos macrófagos no fígado em 6 horas. Os sobreviventes podem infectar os hepatócitos e levar à infecção sistêmica (Ireton; Cossart, 1997).

Este processo infeccioso exige da bactéria a produção e ação de várias proteínas sobre os componentes da célula hospedeira, para assim, completar seu ciclo de vida intracelular. Estas proteínas são codificadas pelos genes de virulência.

3.2. Fatores de virulência

Vários genes envolvidos no mecanismo de patogênese intracelular de *L. monocytogenes* estão reunidos no operon dos genes de virulência dependente do fator regulador positivo A (PrfA). O operon compreende 6 genes bem caracterizados, *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* e *plcB*, que codificam, respectivamente, as proteínas: PrfA (fator regulador positivo), PI-PLC (fosfatidilinositol fosfolipase C), LLO (listeriolisina O), Mpl (metaloprotease), ActA (proteína envolvida na polimerização da actina) e PC-PLC (fosfatidilcolina fosfolipase C). Os genes *inlA*, *inlB* e *inlC* que codificam respectivamente as proteínas internalina A (InlA), InlB e InlC, o gene *iap*, que codifica a proteína p60, e outros genes de virulência estão localizados fora deste grupo (Kuhn; Goebel, 1999). As *inlA*, *inlB* e *inlC* também são reguladas pelo PrfA (Kuhn; Goebel, 1999) e a expressão do *iap* não é dependente do PrfA (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

Além dos genes de virulência, o genoma inteiro deste patógeno já foi determinado. O primeiro mapa genético do cromossomo de *L. monocytogenes* foi estabelecido por Michel e Cossart (1992), em 1992, que estudaram um isolado clínico sorovar 1/2c (cepa L028), cujo comprimento do genoma determinado foi de 3.150 kb. Em 2001, um grupo de pesquisadores seqüenciaram o genoma de *L. monocytogenes* cepa EDG-e (sorovar 1/2a), um derivado da cepa EGD, e verificou que o cromossomo é composto por 2.944.528 bp com 39% de conteúdo de G+C (Glaser *et al.*, 2001). Estes autores identificaram 270 genes específicos da cepa, 2.853 genes que codificam proteínas, 331 genes envolvidos em diferentes transportes de proteínas e 209 genes reguladores. O fator regulador melhor caracterizado é o PrfA que ativa a maioria dos genes de virulência conhecidos. Também identificaram 41 proteínas contendo Leu-Pro-X-Thr-Gly (LPXTG), sendo 19 pertencentes à família da internalina, e genes envolvidos na resistência a ácidos e na degradação de sais biliares.

3.2.1. Internalinas

Durante o processo infeccioso, a entrada de *L. monocytogenes* em células de mamíferos, depende diretamente da participação de duas proteínas de superfície: a InlA, necessária à entrada na célula intestinal e a InlB, mediadora na entrada em hepatócitos e em algumas células epiteliais ou fibroblastos (Ireton; Cossart, 1997; Cossart; Lecuit, 1998).

A InlA é uma proteína constituída por 800 aminoácidos com regiões de repetições ricas em leucina ("Leucine Rich Repeats" – LRR), um peptídeo sinal e uma região terminal-C contendo o peptídeo LPXTG (encontrado em bactérias Gram positivas) seguido por uma seqüência hidrofóbica. A região terminal-C contendo o peptídeo LPXTG permite ligação covalente da proteína com o peptideoglicano (Ireton; Cossart, 1997; Cossart; Lecuit, 1998).

O receptor da célula hospedeira para InlA é a E-caderina, uma glicoproteína transmembrânica que media a adesão célula-célula dependente de cálcio através de interações homofílicas entre células adjacentes (Ireton; Cossart, 1997; Cossart;

Lecuit, 1998; Cossart, 2002). Dados sugerem que a região LRR interage diretamente com a E-caderina (Cossart; Lecuit, 1998).

A *inlB* codifica uma proteína de 630 aminoácidos com uma sequência sinal e uma região de LRR, mas sem uma âncora de membrana (Cossart; Lecuit, 1998). A *inlB* está fracamente associada ao ácido lipoteiônico, um dos polímeros constituintes da parede celular de bactérias Gram positivas, através de sua região terminal-C (Cossart, 2002). Ela é importante na fase hepática da infecção, sendo essencial para entrada em hepatócitos, (Rocourt; Cossart, 1997; Cossart; Lecuit, 1998). Seu receptor ainda é desconhecido, porém sabe-se que não é a E-caderina. Os trabalhos sugerem que a invasão bacteriana requer a atividade da fosfoinositideo 3-cinase (PI-3 cinase) e um citoesqueleto de actina intacto, possivelmente pelo controle da polimerização da actina e reorganização do citoesqueleto de actina. Os trabalhos indicam que ActA também pode participar na invasão. (Ireton; Cossart, 1997; Cossart; Lecuit, 1998).

A *InlC* parece ser requerida na virulência. Ela é expressa principalmente no último estágio da infecção quando a bactéria está na etapa de espalhamento intercelular ativo, sugerindo portanto, seu envolvimento na disseminação da infecção (Vázquez-Boland *et al.*, 2001), e obviamente não está envolvida no processo de entrada na célula epitelial (Ireton; Cossart, 1997).

Outras proteínas da família das internalinas também têm sido identificadas (*InlC2*, *InlD*, *inlE*, *InlF*, *inlG* e *inlH*) e parecem não apresentar função detectável na entrada, replicação, espalhamento ou virulência em camundongos (Rocourt; Cossart, 1997; Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Os estudos sugerem que estas proteínas não estão envolvidas na invasão, mas talvez sejam importantes na colonização dos tecidos do hospedeiro e podem ter funções biológicas não exclusivamente relacionadas a virulência (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Uma hipótese é que os membros desta família codificam proteínas de superfície, cada um com tropismo a um tipo específico de célula. (Rocourt; Cossart, 1997)

3.2.2. *Listeriolisina O*

Após a internalização a bactéria necessita da ação da LLO para mediar o rompimento do vacúolo primário para tornar-se livre. Em algumas células, a LLO pode funcionar sinergisticamente com o PI-PLC ou ser por ela substituída (Cossart; Lecuit, 1998).

A LLO é o principal determinante de virulência de *L. monocytogenes* e a sua atividade hemolítica é detectada ao redor das colônias crescidas em placas de ágar sangue. A LLO é uma toxina composta por 539 aminoácidos, com uma região terminal-N e uma região terminal-C. A sua principal função é a formação de poro, necessária na lise do vacúolo, sendo ativa somente em membranas que contêm o receptor colesterol (Kuhn; Goebel, 1999). A LLO possui um domínio funcional para ligação no receptor colesterol localizada próxima da região terminal-C. Os trabalhos sugerem que o colesterol está envolvido não somente na ligação inicial da toxina, mas também no estágio subsequente da interação entre a toxina e a membrana (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Acredita-se que a proteína, após sua ligação à superfície da membrana, forma oligômeros que leva à formação do poro (Rocourt; Cossart, 1997). A atividade ótima da LLO é encontrada a pH 5,5. Este pH é importante para o rompimento do vacúolo (Kuhn; Goebel, 1999; Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

Parece que a atividade da LLO é necessária à ação da fosfolipase PI-PLC. (Goldfine *et al.*, 1998). Em macrófagos a PI-PLC está envolvida no escape do vacúolo (Rocourt; Cossart, 1997; Goldfine *et al.* 1998), porém somente na presença de LLO, sugerindo que a LLO forma um poro de tamanho grande, suficiente para permitir o acesso da PI-PLC, a partir do interior do fagossoma para a face exterior, onde ela pode clivar PI presente na face citosólica (Goldfine *et al.*, 1998). Em células epiteliais de mamíferos e na ausência de LLO, PI-PLC é capaz de mediar eficientemente o escape do vacúolo primário (Marquis *et al.*, 1995).

Em células não fagocitárias, na ausência de LLO a fosfolipase PC-PLC é capaz de mediar o escape do vacúolo primário (Goldfine; Wadsworth, 2002). Outro

fator bacteriano chamado CplC também contribui no escape do fagossoma (Cossart; Lecuit, 1998).

A LLO também é necessária à multiplicação intracelular e sobrevivência de *L. monocytogenes* dentro de macrófagos e células não fagocitárias (Rocourt; Cossart, 1997; Kuhn; Goebel, 1999; Vázquez-Boland *et al.*, 2001), bem como na indução da resposta celular do hospedeiro, como por exemplos a proliferação celular, indução da exocitose de muco nas células intestinais e apoptose de células dendríticas (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

3.2.3. Proteína ActA

No processo de movimento intracelular de *L. monocytogenes* o principal fator de virulência envolvido é a proteína superficial ActA, cuja função específica é a polimerização da actina (Kuhn; Goebel, 1999).

ActA é uma proteína superficial composta por 639 aminoácidos, constituída de 3 domínios: domínio terminal-N, a região central de repetições ricas em prolina ('Proline Rich Repeats'- PRR) e a parte terminal-C hidrofóbica. ActA está presa à membrana bacteriana pela região terminal-C. Ela está distribuída assimetricamente na superfície da *L. monocytogenes*, com grande quantidade em um dos pólos da bactéria, localizado na base da cauda, e é suficiente para induzir a agregação da actina, sugerindo assim que esta distribuição pré-determina o local de agregação e a direção do movimento. A porção terminal-N é necessária na polimerização e movimento intracelular (Cossart; Kocks, 1994; Cossart; Lecuit, 1998; Kuhn; Goebel, 1999). A porção central rica em prolina não é absolutamente essencial no processo, mas contribui na eficiência (Ireton; Cossart, 1997).

A actina, o principal componente do citoesqueleto, está presente em células não musculares na forma de monômero (actina globular) ou em sua forma polimerizada (actina filamentosa). Existe uma correlação positiva entre a taxa de polimerização de actina e a velocidade do movimento bacteriano. O comprimento da cauda é proporcional a taxa de movimento, assim, bactérias que se movimentam rápido apresentam uma cauda longa e bactérias que se movem

devagar tem uma cauda de actina curta. Com a ajuda da cauda de actina formada, a *L. monocytogenes* pode se mover rapidamente no citoplasma a velocidade de 1,5 $\mu\text{m/s}$ (Cossart; Kocks, 1994).

Outros fatores celulares envolvidos no processo de polimerização de actina são: VASP (“vasodilator-stimulated phosphoprotein”), que tem direta ligação com ActA na região de PRR; profilina, que se liga no VASP e regula a montagem dos filamentos de actina; α -actinina, que é necessária na formação da cauda de actina e movimento; Arp 2 e Arp 3, que estão ligados na ActA pelo domínio terminal-N e têm papel em promover a montagem da actina; e cofilina, que pode causar uma rápida despolimerização dos filamentos de actina e afetar o movimento bacteriano pela estimulação da taxa de rotatividade dos filamentos. (Ireton; Cossart, 1997; Cossart; Lecuit, 1998).

3.3.4. Outros

Após a entrada na célula adjacente, *L. monocytogenes* encontra-se confinada em um vacúolo de dupla membrana que deve ser rompida para que ela continue seu ciclo infeccioso. Nesta etapa, é importante a ação das fosfolipases (Cossart; Lecuit, 1998).

As fosfolipases do tipo C clivam grupos polares dos fosfolipídeos na ponte glicerol fósforo, resultando em diacilglicerol e um éster de fosfato. O produto do *plcA*, PI-PLC, cliva fosfatidilinositol na ligação glicerol fósforo, resultando em monofosfato inositol-1,2-cíclico. PC-PLC é capaz de hidrolisar completamente os lipídeos das células de mamíferos (Goldfine *et al.*, 1998).

Nesta segunda etapa de confinamento vacuolar, a LLO também é necessária no escape do vacúolo de dupla membrana e espalhamento célula a célula (Gedde *et al.*, 2000). Os poros e as lesões da membrana causadas pela LLO provavelmente facilitam o acesso das fosfolipases e seus substratos levando a dissolução total da barreira física que delimita o compartimento fagossomal (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

Os trabalhos sugerem que PC-PLC é essencial, mas a PI-PLC tem somente um papel secundário na virulência, porém atua sinergisticamente com PC-PLC e Mpl para atingir juntamente com LLO um nível ótimo de escape a partir dos fagossomas primário e secundário (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

PC-PLC é requerida para a eficiente lise do fagossoma secundário formado após o espalhamento célula a célula. Recentemente tem sido demonstrado que PC-PLC é necessária no espalhamento intercelular a partir de macrófagos para diferentes tipos de células de mamíferos, incluindo células endotelial do cérebro (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

O *iap* codifica uma proteína, p60, que consiste de 484 aminoácidos com uma sequência sinalizadora de âncora de membrana e regiões de repetições de unidades de Thr-Asn. Parece que esta proteína tem efeito na invasão intestinal e sobrevivência (Rocourt; Cossart, 1997; Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

A patogênese de *L. monocytogenes* é um processo muito complexo envolvendo a ação e interação de inúmeras proteínas, enzimas e cofatores. Além disso, as condições ambientais do hospedeiro (por exemplo: composição da célula, resposta imune) também influenciam o processo. Aqui foram expostos os principais determinantes de virulência e uma revisão detalhada pode ser encontrada no trabalho de Vázquez-Boland *et al.* (2001). Apesar do processo infeccioso intracelular de *L. monocytogenes* ser muito estudado, ainda existem muitos pontos obscuros a serem elucidados.

4. Listeriose

4.1. Sintomas e dose infecciosa

Entre as espécies de *Listeria* existentes, *L. monocytogenes* é responsabilizada pelo maior número de casos de listeriose relatados, tanto no homem como em animais (Mc Lauchlin, 1987).

As mulheres grávidas, os recém-nascidos, as crianças menores de 1 ano de

idade, os idosos e as pessoas imunologicamente deprimidas compõem o grupo susceptível a adquirir uma infecção por *L. monocytogenes* (Marth, 1988).

A listeriose de origem alimentar caracteriza-se de várias formas. Em gestantes, a doença manifesta-se com sintomas semelhantes aos de gripe, com febre, mialgia e dor de cabeça, ou pode ocorrer aborto espontâneo ou então, é assintomática (Rocourt; Cossart, 1997); ocasionalmente ocorre meningite (Marth, 1988). As conseqüências no feto são mais sérias, podendo ocorrer morte do feto, nascimento prematuro, septicemia e meningite (Rocourt; Cossart, 1997).

A listeriose envolvendo o sistema nervoso central manifesta-se na forma de meningite e meningoencefalite que acomete principalmente os idosos, neonatos e pacientes imunodeprimidos (Farber; Peterkin, 1991).

Os indivíduos imunocompetentes podem adquirir gastroenterite caracterizada principalmente por febre, vômitos, dor abdominal e diarreia (Dalton *et al.*, 1997; Heitmann *et al.*, 1997; Aureli *et al.*, 2000; Farber *et al.*, 2000).

O período de incubação estimado da doença é de uma a várias semanas. No entanto, já foram descritos casos de listeriose humana com período de incubação entre 3 a 5 dias (Kerr *et al.*, 1988) e até algumas horas nos casos de gastroenterite (Riedo *et al.*, 1994; Dalton *et al.*, 1997; Aureli *et al.*, 2000).

A dose infecciosa necessária para causar a doença ainda não está bem definida. A dose aproximada, reportada de casos, varia de 10^3 a 10^9 organismos por grama ou mililitro (Farber; Peterkin, 1991; Dalton *et al.*, 1997). Contudo, segundo Mead (1999) (*apud* Donnelly, 2001), no surto ocorrido nos EUA, no período de agosto de 1998 a março de 1999 (CDC, 1998), o alimento implicado, a salsicha ("hot dog"), apresentou uma contaminação extremamente baixa ($<0,3$ unidades formadoras de colônia (UFC) por grama, sugerindo que a cepa causadora do surto tinha uma virulência acentuada. A dose infecciosa pode ainda variar, além do fator virulência da cepa, em função da susceptibilidade do hospedeiro (Farber; Peterkin, 1991).

A taxa de fatalidade na listeriose sistêmica e invasiva é geralmente cerca de

20-30% (Rocourt; Cossart, 1997). Porém, esta taxa é maior em recém nascidos, cerca de 35-55% dos casos (Donnelly, 2001), e em idosos acima de 60 anos é de 63% (Faber; Peterkin, 2000).

4. 2. Surto e casos associados aos produtos lácteos

O primeiro surto de listeriose de origem alimentar comprovado foi reportado no início da década de 80 (Schlech *et al.*, 1983), envolvendo salada de repolho cru e, a partir desta data, outros surtos e casos foram documentados. Nessa década, ocorreu um aumento no número de casos de listeriose nos países do Hemisfério Norte. O número de casos de listeriose notificados na Grã Bretanha no período de 1967 a 1977 era inferior a 50 casos/ano, porém, em 1985 atingiu 142 casos e em 1987, 214 (Mc Lauchlin *et al.*, 1988). Na década de 90 houve um declínio na ocorrência da doença, com aproximadamente 120 casos em 1994 (Mc Lauchlin, 1996). Uma redução no número de casos também ocorreu nos Estados Unidos da América (EUA) no período de 1989 a 1993 (Tappero *et al.*, 1995).

Uma grande variedade de alimentos já foi associada à listeriose de origem alimentar e entre eles, os produtos lácteos também foram incriminados em vários surtos.

Na Inglaterra, em 1981, ocorreu um surto de listeriose, sendo que *L. monocytogenes* de mesmo soro e fagotipo foi isolada de amostras de 11 pessoas. As evidências epidemiológicas indicaram uma possível associação do surto com o consumo de creme de leite pasteurizado (*apud* Ryser, 1999).

Em 1983, um surto associado ao consumo de leite pasteurizado integral e leite pasteurizado com 3% de gordura, submetidos a tratamento térmico inadequado, ocorreu em Massachusetts. Vários sorotipos de *L. monocytogenes* foram isolados de amostras de leite cru, e casos de listeriose foram observados nas vacas produtoras do leite (Fleming *et al.*, 1985).

Dois anos depois, em 1985, um surto de listeriose ocorreu em Los Angeles, Califórnia. *L. monocytogenes* sorotipo 4b foi isolado de pacientes e de queijo fresco macio tipo Mexicano. As investigações, realizadas na indústria produtora do queijo,

revelaram que a origem da contaminação havia sido provavelmente a utilização de 10% a mais de leite do que a capacidade do pasteurizador, ocasionando desta forma um tratamento térmico insuficiente, ou ainda a introdução de leite cru no leite após a pasteurização inicial (Linnan *et al.*, 1988).

Na Suíça, entre 1983 a 1987 ocorreu um surto de listeriose devido ao consumo de queijos tipo mole. Nesse período, ocorreram 122 casos de listeriose. As pesquisas revelaram que as cepas isoladas do queijo tipo “Vacherin Mont d’Or” eram indiscutivelmente de mesmo sorotipo e fagotipo da maioria das culturas humanas isoladas no período (Bille, 1990).

Em 1987, ocorreu um surto em Los Angeles acometendo 11 pessoas e a manteiga foi incriminada como possível veículo da infecção (*apud* Ryser, 1999).

Na Dinamarca, no período de março de 1989 a dezembro de 1990, aconteceu um surto de listeriose causado pelo consumo de queijo. A investigação mostrou uma evidente ligação epidemiológica entre o consumo de queijo com fungo azul ou queijo duro com os casos reportados no período (*apud* Ryser, 1999).

Em 1989, o queijo Camembert foi implicado em um surto, em Luxemburgo (*apud* De Byser *et al.*, 2001).

Em julho de 1994, ocorreu um surto de listeriose caracterizado por sintomas de gastroenterite e febre após o consumo de leite achocolatado em um piquenique, em Illinois, EUA. Os isolados de *L. monocytogenes* das amostras de fezes dos doentes, do leite achocolatado e de amostras ambientais da indústria processadora eram do mesmo sorotipo, 1/2b, tipo eletroforético enzimático e ribotipo. As investigações revelaram que o surto ocorreu, provavelmente, devido às práticas de higienização deficientes da indústria, ocasionando a contaminação do produto durante seu processamento (após a etapa de pasteurização), e à manutenção, durante o piquenique, do produto a uma temperatura que possibilitou o crescimento da bactéria (Dalton *et al.*, 1997).

Em 1995, na França, ocorreu um surto devido ao consumo de queijo “Brie de Meaux”, queijo macio produzido com leite cru (Goulet *et al.*, 1995).

No período de 4 meses, em 1997, 14 casos de listeriose foram diretamente associados ao consumo de queijo “Pont-L’évêque” produzido na Normandia. O queijo implicado foi produzido com leite cru, e continha *L. monocytogenes* sorotipo 4b com população superior a 1.000 UFC por grama (*apud* Ryser, 1999; *apud* De Byser *et al.*, 2001).

Na Finlândia, entre janeiro de 1998 a abril de 1999, ocorreu um surto por *L. monocytogenes* sorotipo 3a. Neste surto, o veículo foi a manteiga pasteurizada. Os isolados de amostras de manteiga, dos pacientes, dos equipamentos e ambiente (dreno) da indústria apresentaram o mesmo perfil eletroforético, sugerindo contaminação de origem ambiental durante o processamento, após a etapa de pasteurização (Lyytikäinen *et al.*, 2000).

No período entre outubro de 2000 a janeiro de 2001, na Carolina do Norte, doze pessoas apresentaram infecção por *L. monocytogenes*. As investigações revelaram que queijo fresco macio tipo Mexicano, de fabricação artesanal, produzido com leite cru contaminado, foi o causador do surto (Boggs *et al.*, 2001).

Na Suécia, entre 15 de junho a 09 de julho de 2001, houve um surto no qual, 48 pessoas sofreram de gastroenterite após consumir produtos lácteos manufaturados na fazenda. Apesar de estafilococos coagulase positivo e *Escherichia coli* enteropatogênica também terem sido encontrados nos alimentos analisados, as investigações epidemiológicas revelaram que queijo fresco, processado a partir de leite cru, contaminado com *L. monocytogenes* foi o agente causador do surto (Carrique-Mas *et al.*, 2003).

Em Quebec, Canadá, no período de abril a dezembro de 2002, ocorreu um surto de listeriose acometendo 17 pessoas. As investigações conduzidas pelas autoridades de Saúde Pública local concluíram que o alimento responsável havia sido um queijo produzido com leite tratado termicamente (temperatura abaixo da pasteurização) e maturado por 60 dias (Gaulin *et al.*, 2003).

Casos isolados de listeriose de origem alimentar também têm sido documentados. Um caso de meningite associado ao consumo de queijo macio foi

descrito por Bannister (1987). Em 1989, um caso foi descrito por Azadian *et al.* (1989), onde *L. monocytogenes* sorotipo 4b foi isolada do doente e do alimento, queijo contendo 10^7 UFC de *L. monocytogenes* por grama. Outro caso associado a queijo mole foi reportado por Farber *et al.* (1990). Nesse mesmo ano, Mc Lauchlin *et al.* (1990) descreveram um caso associado ao consumo de queijo de leite de cabra. Em 1997, Gilot *et al.* (1997) relataram um caso associado ao consumo de queijo Camembert.

Outros alimentos associados a listeriose são: saladas, camarão, patê, salame, marisco, frango cozido, nuggets de frango, salsicha de peru, cogumelos salgados, sorvete, lingüiça, vegetais em conserva, tabletes de alface (*apud* Farber; Peterkin, 1991), alimento à base de língua de porco cozido (Jacquet *et al.*, 1995). Mais recentemente, salsicha tipo “hot dog” (Center for Disease Control and Prevention - CDC, 1998), peixe defumado (Miettinen *et al.*, 1999b), salada de milho e atum (Aureli *et al.*, 2000), imitação de carne de caranguejo (Farber *et al.*, 2000) e carne de peru cozido (Hurd *et al.*, 2000; Frye *et al.*, 2002) foram incriminados em surtos de listeriose.

5. Ocorrência de *L. monocytogenes* em Estabelecimentos Processadores de Produtos Lácteos

L. monocytogenes é uma bactéria amplamente encontrada no meio ambiente e já foi isolada de solo, milho, silagem, forragem, palha, esterco e fezes de animais, água de rios, lagos, canais, esgotos, diversos animais, efluentes de abatedouros (Brackett, 1988) e ambientes domésticos (Cox *et al.*, 1989).

Listeria spp. tem sido encontrada em vários estabelecimentos processadores de produtos lácteos. Os trabalhos têm mostrado que usinas processadoras de leite fluído são mais contaminadas que outros estabelecimentos (Charlton *et al.*, 1990; Klausner; Donnelly, 1991; Cotton; White, 1992), embora as chances de contaminação do produto após pasteurização serem pequenas por causa da utilização de sistema fechado (Charlton *et al.*, 1990).

Em indústrias de leite fluído, espécies de *Listeria* têm sido encontradas com maior frequência em equipamentos de embalagem, transportadoras, paletas, paredes, piso e dreno (Nelson, 1990). Uma alta ocorrência de *Listeria* foi observada em transportadoras, sendo esta um veículo de disseminação na indústria (Charlton *et al.*, 1990). Cotton e White (1992) isolaram *L. monocytogenes* em drenos e sistemas de transporte de indústrias de leite e observaram que esses locais possibilitam o abrigo da bactéria. O patógeno também foi isolado de manipuladores de unidade produtora de leite fluído (El Shenawy, 1998).

Em uma indústria beneficiadora de leite pasteurizado tipo C de Fortaleza, *L. monocytogenes* foi isolada de leite cru, leite pasteurizado, tanque de recepção de leite cru, caixa plástica de transporte de leite, além de amostras ambientais como pisos e drenos (Figueiredo, 2000).

Gabis *et al.* (1989) estudaram 18 estabelecimentos processadores de produtos lácteos desidratados e encontraram *L. monocytogenes* somente no dreno da área de recebimento de leite cru.

No trabalho conduzido por Walker *et al.* (1991), em indústrias de produtos lácteos congelados, *L. monocytogenes* estava presente em 35,9% dos estabelecimentos. Neste estudo, os drenos foram os locais com maior frequência de amostras positivas e não foi detectada diferença no nível de contaminação entre estabelecimentos que recebiam leite cru e as que recebiam leite pasteurizado. O nível de higienização e o controle de contaminação ambiental das indústrias não afetaram significativamente a recuperação de *Listeria*. Nas indústrias de grande porte ocorreram a maior taxa de isolamento do que nas menores, provavelmente devido ao tráfego intenso, a maior exposição às fontes externas e ao período de processamento prolongado. Uma recuperação maior de *L. monocytogenes* em indústrias com pasteurização HTST (“high temperature short time”) em relação a pasteurização lenta estava associada ao tamanho dos estabelecimentos. As indústrias maiores normalmente utilizam o sistema HTST de pasteurização. Charlton *et al.* (1990) também detectaram *L. monocytogenes* em amostras ambientais de indústrias de produtos lácteos congelados.

Em estabelecimentos processadores de sorvete, *L. monocytogenes* foi encontrada em drenos (Cotton; White, 1992; El Shenawy, 1998), equipamentos (Cox *et al.*, 1989; El Shenawy, 1998; Miettinen *et al.*, 1999a), sistema de transporte (Cotton; White, 1992) e manipuladores (El Shenawy, 1998).

A presença de *L. monocytogenes* em ambientes refrigerados de laticínios (Klausner; Donnelly, 1991; Cotton; White, 1992; Pritchard *et al.*, 1995), reflete a natureza psicrófila da bactéria (Cotton; White, 1992).

Em indústrias produtoras de queijos, Cox *et al.* (1989) encontraram *L. monocytogenes* em dreno, piso, resíduos e equipamentos de usinas processadoras de queijo tipo italiano. Charlton *et al.* (1990) encontraram esta bactéria no ambiente de indústrias de queijos da Califórnia, e as áreas de filagem e embalagem apresentaram maior prevalência, representando locais de potencial contaminação após pasteurização.

A avaliação de uma indústria produtora de queijo, na França, realizada por Jacquet *et al.* (1993), revelou a presença de *L. monocytogenes* em prateleiras da sala de maturação, em equipamentos e soluções empregados na lavagem dos queijos, em amostras do ambiente, como porta de entrada de pessoal, e nos queijos. *L. monocytogenes* de mesmo sorovar e fagovar foi isolada de queijos e prateleiras, sugerindo a contaminação do produto durante a maturação.

Na Espanha, o trabalho realizado por Menendez *et al.* (1997) em indústrias de queijo macio, revelou a presença de *L. monocytogenes* no leite cru, prensa, pisos e drenos da sala de manufatura, prateleiras de madeira da sala de maturação, equipamento de embalagem, pisos e drenos da sala de manufatura de "quarg". Em amostras de leite pasteurizado, massa e soro o patógeno não foi encontrado, indicando eficiência da pasteurização. El Shenawy (1998) também isolou esta bactéria de piso, dreno e equipamentos de unidades produtoras de queijo do Egito, bem como em amostras de resíduos e manipuladores.

Em indústrias processadoras de queijo Minas frescal, da Bahia, esta bactéria foi encontrada em leite cru e em piso da sala de estocagem de leite (Silva *et al.*, 2003).

L. monocytogenes também foi detectada em indústrias de processamento de iogurte (Charlton *et al.*, 1990; El Shenawy, 1998), de queijo cottage (Charlton *et al.*, 1990) e de manteiga (Charlton *et al.*, 1990). Em indústrias de iogurte foi isolada de drenos, equipamentos e manipuladores (El Shenawy, 1998).

Pritchard *et al.* (1995) avaliaram indústrias processadoras de produtos lácteos e constataram a presença de *L. monocytogenes* em equipamentos como: tanque de armazenamento de leite, superfícies de mesa, transportadora, equipamento de filagem, envasadora de leite e máquina pré-filtradora de salmoura. Entre as amostras ambientais (piso, dreno e parede), a bactéria foi isolada de ambientes de resfriamento, congelamento, recebimento e estocagem de leite cru. Observaram, ainda, que o grau de contaminação em amostras de ambiente foi maior do que em amostras de equipamentos.

Na avaliação da presença de *L. monocytogenes* em indústrias de laticínios (queijo, leite, sorvete e outros produtos), da Austrália, conduzido por Sutherland e Porritt (1996), esta bactéria foi detectada em amostras de piso, dreno, esteiras de transportadora e em superfícies que entram em contato com alimentos.

Este patógeno também já foi isolado de outros estabelecimentos processadores de alimentos como: abatedouro de frango (Hudson; Mead, 1989; Genigeorgis *et al.*, 1989; Lawrence; Gilmour, 1994; Ojeniyi *et al.*, 1996), abatedouro de peru (Genigeorgis *et al.*, 1990), abatedouro de suíno (Sammarco *et al.*, 1997), indústrias processadoras de salsicha de peru (Wenger *et al.*, 1990), indústria processadora de carne (Nesbakken, *et al.*, 1996), de peixes defumados (Rorvik *et al.*, 1995; Norton *et al.*, 2001b; Hoffman; Wiedmann, 2001), de camarão (Destro *et al.*, 1996) e de nuggets congelado de frango (Rodrigues, 1999), entre outras.

6. *Listeria monocytogenes* em Queijos Tipo Frescal

6.1. Alguns tipos de queijo frescal da América Latina

Os latinoamericanos têm como tradição o consumo de queijos tipo frescal. Os queijos da América Latina normalmente são salgados (entre 1 a 3% de sal) e diversas variedades freqüentemente são manufaturadas em vilarejos ou fazendas (Van Hekken; Farkye, 2003). O principal queijo nativo é o “Queso Blanco” ou queijo branco, com muitos subtipos e nomes regionais. Na América Latina muitos queijos são produzidos com leite de vaca, mas alguns são com leite de ovelha, cabra ou búfala (Kosikowski; Mistry, 1997a).

“Queso Blanco” é o nome genérico para queijo branco semiduro produzido no México, América Central e do Sul. Estes queijos podem ser consumidos frescos, mas em alguns países podem ser mantidos por 2-8 semanas antes do consumo. As muitas variedades de queijos brancos são definidas em função do método de produção (ácido/calor ou coagulação enzimática), composição, tamanho, forma e região de produção (Fox *et al.*, 2000).

Queijo Hispânico refere-se a queijos desenvolvidos nos países que falam o espanhol na América do Sul, Central e México. O queijo é o ingrediente principal de pratos populares de muitos mexicanos/latinos nos Estados Unidos. A qualidade, o sabor e as propriedades funcionais destes queijos fazem o sucesso dos pratos culinários hispânicos. No decorrer dos anos, fabricantes de queijos hispânicos têm desenvolvido uma ampla variedade de queijos. O queijo Hispânico pode ser agrupado na classificação tradicional de macio, semi-duro e duro, conforme o seu conteúdo de umidade (Van Hekken; Farkye, 2003). De acordo com Scott (1986) (*apud* Van Hekken; Farkye, 2003), o conteúdo de umidade do queijo macio é de aproximadamente 55%, do semi-duro 44-55% e do duro 20-42%.

Tecnologicamente, existem dois tipos de “Queso Blanco”. O primeiro tipo usa o ácido láctico naturalmente produzido pelas bactérias ácido lácticas seguido pela formação da coalhada após adição de coalho. O segundo tipo não utiliza coalho, mas precipita o leite quente pela acidificação direta com ácido grau alimentício

(acético, láctico ou cítrico) e as culturas lácticas normalmente não são adicionadas. Cada tipo de ácido adicionado leva a diferenças na composição, sabor e textura (Kosikowski; Mistry, 1997a).

O “Queso Blanco” produzido por coagulação enzimática apresenta o desenvolvimento de ácido láctico no leite pasteurizado pelas bactérias lácticas mesófilas à temperatura ótima, seguido da adição de coalho. Nesse processo, o leite integral, ou leite com 2% de gordura, é pasteurizado a 73°C por 16 segundos. Em seguida, o leite é resfriado a 32°C, cultura láctica mesófila e coalho são adicionados e a formação da coalhada ocorre após 35 a 40 minutos. A coalhada é então cortada em cubos de 1,6 cm e é agitada gentilmente por 50 minutos. Após a drenagem do soro, a massa é salgada, colocada em formas e ligeiramente prensada, geralmente durante uma noite, quando ocorre a queda do pH para $\leq 5,0$. Este queijo é distribuído fresco, o mais rápido possível, e é conhecido como “Queso Fresco” (Kosikowski; Mistry, 1997a e 1997b). O “Queso Fresco” é o queijo Hispânico mais popular no México e nos Estados Unidos e, antes da salga, sua massa pode ser finamente moída com equipamento especial, fazendo-a esmigalhar. O “Queso Fresco”, quando embalado e vendido na forma de tijolo, é chamado de Adobera (Van Hekken; Farkye, 2003).

O “Queso de Puna” é um queijo resultante da coagulação do leite desnatado com coalho, comum em Porto Rico. Após coagulação e drenagem através de peneira ou tecido, a coalhada é salgada, moldada em forma cilíndrica de 15 cm de diâmetro e prensada por vários dias. É consumido fresco, com ou sem condimentos ou frutas. Em El Salvador e Venezuela é chamado de “Queso Fresco” ou “Queso Maracay”. Na Colômbia é conhecido como “Campesino” (Kosikowski; Mistry, 1997a).

O queijo Panela é um queijo típico do México (Saltijeral *et al.* 1999) cuja denominação é devida a desoragem da coalhada em forma tipo cesta por uma noite (Van Hekken; Farkye, 2003). O queijo, após ser embalado, é vendido sem refrigeração e é consumido em 1 a 2 dias (Saltijeral *et al.* 1999). Este queijo contém cerca de 53-58 % de umidade, 19-25% de gordura, 18-20% de proteínas e 1,3 a

1,8% de sal e pH de 5,6 a 6,4 (*apud* Van Hekken; Farkye, 2003). Porém, Saltijeral *et al.* (1999) observaram pH menor, 5,16, e teor de sal maior, 2,13%. “Queso Crema” é similar ao queijo Panela, exceto pelo fato de ser manufaturado com leite acrescido de creme para dar um alto teor de gordura (Van Hekken; Farkye, 2003).

O queijo Altiplano é conhecido na Bolívia desde os tempos dos Incas, que habitavam o Altiplano. É um queijo macio produzido a partir de leite integral de vacas ou ovelhas. O leite cru é coagulado com enzimas de bezerro por 2 horas a 32°C, a coalhada é salgada, colocada em formas e prensada por 3 horas. Este queijo, o qual não é embalado, é mantido no sal à temperatura de 6-12°C (Phelan *et al.*, 1999).

O “Queso Blanco” manufaturado por acidificação direta é popular em Porto Rico, onde é conhecido como “Queso del Pais” ou “Queso de la Tierra”, e é consumido como queijo fresco. No México, o mesmo queijo é chamado de “Queso Sierra” (Kosikowski; Mistry, 1997a).

O método de produção de “Queso Blanco” coagulado por ácido/calor varia, mas geralmente envolve as seguintes etapas: padronização do leite integral para 3% de gordura, tratamento térmico (82°C por 3 minutos), acidificação do leite quente até o pH 5,3 pela adição de ácido (acético, cítrico, láctico), suco de limão ou vinagre, enquanto é suavemente agitado para formação da coalhada, drenagem do soro, salga seca da coalhada, enformagem, prensagem, corte do queijo em porções menores e embalagem a vácuo. O queijo é estocado a 4-8°C (Kosikowski; Mistry, 1997a e 1997b). O produto tem vida útil, sob esta temperatura, por 2-3 meses (Fox *et al.*, 2000). Este tipo de queijo é consumido tradicionalmente fresco porque muito pouca mudança bioquímica ocorre durante a estocagem, resultado do rigoroso tratamento térmico aplicado durante a formação da coalhada.

Porém, cultura láctica (*Lactobacillus* spp.) e/ou lipases exógenas podem ser adicionadas à coalhada antes da salga e prensagem, para melhorar o sabor durante a estocagem (Fox *et al.*, 2000). Este queijo tem o sabor ligeiramente ácido, textura firme e não derrete quando aquecido. Apresenta uma composição de 51-

53% de umidade, 19-25% de gordura, 20-22% de proteína, 1,8 a 3% de sal e pH menor que 5,6 (Van Hekken; Farkye, 2003).

No Brasil, dentre os queijos frescos, o tradicional queijo Minas frescal é o mais conhecido e consumido. O processamento do queijo Minas frescal é semelhante ao do “Queso Blanco” de coagulação enzimática ou “Queso Fresco”; no entanto, atualmente, existem no comércio queijos produzidos por outros processos como a ultrafiltração e acidificação do leite pela adição de ácido láctico em substituição à cultura ácido láctica.

Segundo a Portaria nº 352, de setembro de 1997 (Brasil, 1997), do Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, o queijo Minas frescal é um queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas. É classificado como um queijo semi-gordo de alta umidade a ser consumido fresco, de consistência branda a macia, com ou sem olhaduras mecânicas, de cor esbranquiçada, de sabor suave a levemente ácido, sem ou com crosta fina, de forma cilíndrica e de peso de 0,3 a 5 Kg. Em março de 2004, através da Instrução Normativa nº 4 (Brasil, 2004), o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento resolve corrigir o Padrão de Identidade e qualidade do queijo Minas frescal quanto à classificação de umidade, considerando a partir desta data, como queijo semi-gordo de muito alta umidade.

Os queijos Minas frescal produzidos sem adição de culturas lácticas apresentam um rendimento maior, devido à maior retenção de água, e menos alterações nas suas características organolépticas do que o processo tradicional com fermento. Portanto, do ponto de vista econômico, seu custo de produção é menor não só pelo rendimento, como também pela não necessidade de aquisição e/ou preparo da cultura láctica. Por outro lado, a ausência do fermento pode favorecer o estufamento precoce, pois as bactérias lácticas desempenham importante papel de oposição aos microrganismos causadores deste defeito, pelo consumo rápido da lactose e pelo abaixamento do pH (Furtado *et al.*, 1980a).

Na produção de queijo Minas frescal por acidificação direta, o ácido láctico substitui a cultura láctica e, diferentemente do processo de obtenção do “Queso Blanco” por acidificação direta, a coalhada é consequência da ação do coalho e não do ácido utilizado. O trabalho realizado por Furtado *et al.* (1980b) revelou que os queijos Minas frescal produzidos por acidificação, quando comparados com o tradicional têm um rendimento maior e sabor menos ácido. Contudo, estes queijos oferecem maior risco à saúde, pois, segundo trabalho de Carvalho (2003), estes queijos apresentaram um número maior de amostras fora dos padrões microbiológicos estabelecidos pela Resolução RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2001) do que os queijos obtidos pelo método tradicional e por ultrafiltração.

No processamento por ultrafiltração, o leite é ultrafiltrado até que a concentração de proteínas e gorduras seja o desejado para fabricação do queijo. Durante o processo, são obtidos o retentado, leite com proteínas e gorduras, e o permeado, água com compostos de baixo peso molecular que passam através da membrana (Kosikowski, 1986). Este processo é análogo à separação de soro da coalhada durante a fabricação do queijo, com uma diferença: as proteínas do soro do leite, lactoglobulina e lactoalbumina, são retidas juntamente com a caseína, gordura e sais minerais no retentado. As proteínas do soro proporcionam um maior rendimento ao queijo (Kosikowski; Mistry, 1997c). Na fabricação de queijo Minas frescal, o processo de ultrafiltração mais utilizado é o método MMV (Maubois Mocquot Vassal). Neste processo, o retentado (com fator de concentração na faixa de 4,5 a 6,0) obtido da ultrafiltração a 50-55°C é resfriado a 32°C, o fermento láctico ou ácido láctico é adicionado, o sal e o coalho são colocados e, após uma agitação vigorosa por um minuto, o produto é embalado. A coagulação é realizada a 22°C por 1 hora, o endurecimento a 5°C por 16-18 horas e o produto final é estocado a 5°C (Vieira *et al.*, 1984; Van Dender *et al.*, 1998; Carvalho, 2003). Os queijos Minas frescal produzidos por ultrafiltração, devido à menor dessoragem, apresentam maior teor de umidade (67,24%) em relação aos obtidos por acidificação direta (61,92%) e o tradicional (com fermento) (57,33%), resultando portanto, em maior rendimento (Carvalho, 2003).

6.2. Ocorrência de *L. monocytogenes*

L. monocytogenes, por se tratar de uma bactéria ambiental, está presente numa infinidade de alimentos: produtos cárneos (Farber *et al.*, 1989; Destro *et al.*, 1991; Kabuki, 1997, Furlanetto *et al.*, 1996), vegetais (Wong *et al.*, 1990; Porto; Eiroa, 2001), pescados (Destro, 1995; Cordano; Rocourt, 2001; Johansson *et al.*, 1999), produtos lácteos (Farber *et al.*, 1989; Destro *et al.*, 1991; Moura *et al.*, 1993) e alimentos processados prontos para consumo (Gombas *et al.*, 2003).

Os estudos sobre a ocorrência de *L. monocytogenes* em queijos tipo frescal, como se observa nos dados apresentados no Quadro 1, têm revelado grande variação, de 0,0 a 41,2%. Esta variação é explicada pelas diferentes metodologias utilizadas na detecção da bactéria, diferença entre as amostras devido a diferenças no processamento e pelo uso de leite cru ou pasteurizado.

A maior ocorrência de *L. monocytogenes* em queijo Minas frescal artesanal do que em manufaturado, segundo constatado por Silva *et al.* (1998) e Vieira (2000), se deve ao uso de leite cru no processamento artesanal. Loncarevic *et al.* (1995) observaram que queijos mole e semi-mole produzidos com leite cru apresentavam-se mais freqüentemente contaminados com *L. monocytogenes* do que os queijos preparados com leite tratado termicamente.

Outro fator importante na contaminação de queijos é o tipo de processamento. O trabalho realizado por Carvalho (2003) revelou que os diferentes procedimentos de fabricação (tradicional com adição de cultura láctica, acidificação direta e ultrafiltração) têm influência na qualidade microbiológica do queijo Minas frescal, sendo que *L. monocytogenes* foi isolada somente de amostras do processamento com acidificação direta. Esses resultados reforçam o estudo conduzido por Naldini (2002), cuja pesquisa mostrou que queijo Minas frescal manufaturado pelo processo de acidificação direta com ácido láctico é mais susceptível à proliferação de *L. monocytogenes* do que o produzido pelo processo tradicional.

QUADRO 1. Ocorrência de *L. monocytogenes* em queijos tipo frescal.

Tipo de amostra	<i>L. monocytogenes</i>		Referência bibliográfica
	n*	N (%)**	
Queijo Minas	20	2 (10,0)	Destro <i>et al.</i> , 1991
Queijo tipo Hispânico	100	2 (2,0)	Genigeorgis <i>et al.</i> , 1991
Queijo Minas	20	0 (0,0)	Casarotti <i>et al.</i> , 1993
Jben (tradicional do Marrocos)	22	4 (18)	El Marrakchi <i>et al.</i> , 1993
Queijo frescal	30	2 (6,7) ^a	Furlanetto <i>et al.</i> , 1996
Queijo Minas industrial e ricota	33	1 (3,0) ^a	Silva <i>et al.</i> , 1998
Queijo Minas artesanal	17	7 (41,2) ^a	Silva <i>et al.</i> , 1998
Panela (queijo Mexicano)	20	3 (15,0)	Saltijeral <i>et al.</i> , 1999
Queijo Minas	20	5 (25,0)	Vieira, 2000
Queijo Minas artesanal	30	0 (0,0)	Peresi <i>et al.</i> , 2001
Queijo Minas industrial	30	0 (0,0)	Peresi <i>et al.</i> , 2001
Queijo Minas	93	3 (3,2)	Carvalho, 2003
Queijo tipo Hispânico	2.931	5 (0,2) ^a	Gombas <i>et al.</i> , 2003

* n = n° de amostras analisadas

** N (%) = n° de amostras positivas para *L. monocytogenes* (porcentagem)

^a o valor de porcentagem foi aproximado

Além de queijos tipo frescal, *L. monocytogenes* também já foi isolada de outros tipos de queijos (Pini; Gilbert, 1988; Rorvik; Yndestad, 1991; Loncarevic *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 1998; Cordano; Rocourt, 2001).

L. monocytogenes tem sido isolada de leite cru (Slade; Collins-Thompson, 1988; Lund *et al.*, 1991; Harvey; Gilmour, 1992; Moura *et al.*, 1993; Fenlon *et al.*, 1995; Waak *et al.*, 2002) e a origem da contaminação do leite bovino cru pode ser a mastite ou o ambiente.

A mastite por *L. monocytogenes* é rara, mas foi associada com infecção persistente e alta concentração da bactéria no leite. Um quarto do úbere infectado pode eliminar entre 10^3 a 10^6 *L. monocytogenes* por mililitro de leite (Bemrah *et al.*, 1998). Os casos de mastite bovina por *L. monocytogenes* são a fonte direta de

contaminação do leite, e este, se não for pasteurizado corretamente ou se sofrer contaminação após o tratamento térmico, será a fonte de contaminação do homem, pois foi verificado através de ribotipagem que algumas cepas de origem bovina e humana eram do mesmo ribotipo (Jensen *et al.*, 1996).

A má qualidade da silagem e insuficiente higiene do estábulo e do processo de ordenha são fatores que aumentam o risco de contaminação do leite cru nas fazendas leiteiras (Sanaa *et al.*, 1993). O leite cru pode ser contaminado a partir do ambiente, durante a ordenha, estocagem e transporte. Esta forma de contaminação é freqüente, mas a população de *L. monocytogenes* é pequena, geralmente < 1 UFC/ ml de leite do tanque (Bemrah *et al.*, 1998). Fenlon *et al.* (1995), analisaram leite de 160 tanques de fazendas e obtiveram 25 delas positivas para *L. monocytogenes* em pelo menos uma ocasião. Muitos produtores apresentaram somente contaminação esporádica, sendo que em muitos casos, o número de *L. monocytogenes* foi baixo, menor que 1 por mililitro, e o maior foi de 35 por mililitro.

Arimi *et al.* (1997) sugerem que as fontes de contaminação do leite são os ambientes das fazendas, pois observaram contaminação do leite por vários ribotipos de *L. monocytogenes* isolados também dos ambientes das fazendas. A silagem abrigava ribotipos clinicamente associados à listeriose em gado leiteiro.

Más práticas de higiene e linhas de ordenha precariamente higienizadas também aumentam o risco da contaminação do leite (Sanaa *et al.*, 1993). Após a ordenha, o leite é estocado nos tanques da fazenda, transportado nos caminhões tanques e estocado nos silos das fábricas. Durante estas 3 etapas a *Listeria* pode se multiplicar (Bemrah *et al.*, 1998).

Harvey e Gilmour (1992) e Waak *et al.* (2002) observaram maior ocorrência de *L. monocytogenes* em leite bovino cru dos silos das usinas de processamento do que dos tanques das fazendas leiteiras. Segundo Waak *et al.* (2002) esse resultado seria em decorrência do tempo e condições de estocagem.

As indústrias de laticínios com presença de fazendas adjacentes apresentam maior contaminação por *Listeria* spp. do que indústrias sem fazenda ao lado. É

possível que a contaminação seja proveniente do ambiente das fazendas. Das 346 amostras ambientais, de 30 fábricas, avaliadas por Pritchard *et al.* (1994), 35,3% foram positivas para *Listeria* spp, sendo que das amostras positivas, 37,2% continham *L. monocytogenes*.

Por causa dos riscos à saúde associados ao consumo de leite cru e produtos à base de leite cru, o órgão americano “Food and Drug Administration” (FDA) exige o uso de leite pasteurizado no processamento de produtos lácteos, exceto para queijos maturados por pelo menos 60 dias (Boggs *et al.*, 2001). No Brasil, segundo os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos, os queijos devem ser produzidos a partir de leite submetido à pasteurização ou tratamento térmico equivalente para assegurar a fosfatase residual negativa, sendo excluída desta obrigação os queijos submetidos a um processo de maturação a uma temperatura superior a 5°C, durante um tempo não inferior a 60 dias (Brasil, 1996). Portanto, a presença deste patógeno em queijos produzidos com leite pasteurizado indica contaminação após a etapa de pasteurização do leite (Jacquet *et al.*, 1993), uma vez que a temperatura de pasteurização do leite destrói a bactéria (Doyle *et al.*, 2001).

No que diz respeito à legislação, a Agência de Saúde Pública dos Estados Unidos estabeleceu tolerância zero em 25 g de amostra para *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo. Desde 1985, alimentos prontos para consumo, inclusive queijos contaminados são recolhidos nos Estados Unidos (Shank *et al.*, 1996). Os produtos lácteos foram os alimentos mais frequentemente associados com a apreensão devido à contaminação microbiana durante os anos de 1994 a 1998, reportados pela FDA. Durante este período, *L. monocytogenes* foi isolada em 64,5% dos produtos lácteos recolhidos (Wong *et al.*, 2000).

No Brasil, a Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (Brasil, 2001) e a Portaria nº 146 da Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA do Ministério da Agricultura (Brasil, 1996) estabelecem, para queijos, ausência de *L. monocytogenes* em 25 g, em 5 amostras do produto de mesmo lote. Por outro lado,

alguns países da Europa permitem a presença de *L. monocytogenes* em certos alimentos cozidos prontos para o consumo a um nível de até 1.000 UFC por grama (Ryser; Donnelly, 2001).

7. Métodos de Detecção de *L. monocytogenes* em Alimentos

Atualmente os métodos oficiais mais comumente utilizados são os preconizados por: a) FDA (Hitchins, 1998) b) “U.S. Department of Agriculture” - (USDA) (Mc Clain & Lee, 1989); c) “Health Products and Food Branch of Health Canada” (HPFB) (Pagotto *et al.*, 2001); d) “Netherlands Government Food Inspection Service” – (NGFIS) (Van Netten *et al.*, 1989). A “American Public Health Association” (APHA) recomenda o uso dos métodos do FDA e USDA (Ryser; Donnelly, 2001).

Os métodos de detecção de *L. monocytogenes* em alimentos basicamente envolvem etapas de enriquecimento, semeadura em meios sólidos seletivos e então o isolamento para posterior identificação. Nestas etapas básicas, os meios de cultura podem variar dependendo do alimento e das metodologias utilizadas. Os agares seletivos como: ágar Oxford, ágar Oxford modificado e o ágar Palcam, recomendados pelos métodos oficiais, baseiam-se na hidrólise da esculina como recurso para diferenciar *Listeria* spp de outros microrganismos, ou ainda a coloração azul esverdeada das colônias em meios translúcidos (ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam) sob luz transmitida obliquamente. Estes meios, no entanto, não permitem a diferenciação de *L. monocytogenes* das outras espécies de *Listeria*.

Recentemente, meios diferenciais baseados na detecção da enzima PI-PLC têm sido utilizados no isolamento e diferenciação de *L. monocytogenes* das outras espécies, em alimentos (Restaino *et al.*, 1999; Karpisková *et al.*, 2000; Hoffman; Wiedmann, 2001; Jinneman *et al.*, 2003).

A enzima PI-PLC é produzida por *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* e, na avaliação de Notermans *et al.* (1991), 98% das cepas de *L. monocytogenes*

analisadas foram corretamente identificadas com base na habilidade em expressar esta enzima.

O “Biosynth Chromogenic Media - *Listeria monocytogenes* detection system” (BCM - LMDS), metodologia baseada na detecção de PI-PLC, descrito por Restaino *et al.* (1999), apresenta substratos fluorogênicos e cromogênicos no meio de enriquecimento seletivo e de isolamento, respectivamente, para detecção da presença de PI-PLC. O LMDS é uma metodologia que envolve 2 etapas de enriquecimento: primeiro no “*L. monocytogenes* pre-enrichment broth” (LMPEB) e depois no “*L. monocytogenes* selective enrichment broth” (LMSEB), seguido da inoculação no “*L. monocytogenes* plating medium (LMPM). No LMPM, *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* apresentam colônias convexas de 1,0 a 2,5 mm de diâmetro, de coloração turquesa, com ou sem halo turquesa. Neste meio, *L. monocytogenes* diferencia-se da *L. ivanovii* pelo tamanho e intensidade do precipitado turquesa das colônias; as colônias de *L. ivanovii* são menores e têm o precipitado turquesa mais escuro. As outras espécies de *Listeria* apresentam coloração branca. Neste sistema, a diferenciação de *L. monocytogenes* de *L. ivanovii* é realizada utilizando-se o “*L. monocytogenes* confirmatory medium” (LMCM) e o caldo base de púrpura de bromocresol com ágar (“purple broth base agar” – PBBA) com 1% de ramnose. *L. monocytogenes* é positiva no LMCM, ou seja produz fluorescência à luz UV (366nm) e fermenta a ramnose no PBBA. Por outro lado, *L. ivanovii* é negativa para estes testes. Este sistema torna o isolamento e identificação mais rápidos.

No trabalho realizado por Restaino *et al.* (1999), o LMDS mostrou melhor performance que o método do USDA no isolamento de *L. monocytogenes* em amostras ambientais de fábricas processadoras de carne.

Num estudo de avaliação e validação interlaboratorial do meio de isolamento ágar BCM (LMPM) e do ágar de confirmação BCM (LMCM) em amostras de alimentos e ambientes, das 135 amostras positivas para *L. monocytogenes*, as combinações do uso dos meio Oxford/BCM e Palcam/BCM foram superiores à combinação Oxford/Palcam no isolamento deste patógeno (Jinneman *et al.* 2003).

Quanto às técnicas rápidas de detecção, existem várias, como os testes bioquímicos miniaturizados para identificação como o API-ZYM (Analytical Products, “Vitek Automicrobic Gram positive Identification Cards” (BioMerieux), API *Listeria* (BioMerieux) e Micro-ID™ kit (Organon Teknika Corp.). A “Association of Official Analytical Chemists International” (AOAC) tem adotado o Micro-ID e o Vitek como métodos oficiais. Vários métodos não convencionais que utilizam ELISA (“enzyme - linked immunosorbent assay”) têm sido desenvolvidos para rápida detecção de *Listeria*, e está comercialmente apresentado como “*Listeria*-Tek” (Organon Teknika), “Assurance *Listeria*” (Bio Control Systems, Inc.), “Tecra *Listeria* Visual Immunoassay” (Bioenterprises Pty. Ltd.), “VIP™ - a visual precipitate assay” (Bio Control Systems, Inc.), “VIDAS *Listeria* assay” (BioMerieux) e “VIDAS *Listeria monocytogenes* assay” (BioMerieux). Os testes baseados em sondas de DNA disponíveis comercialmente são “Gene-Trak Colorimetric *Listeria* assay” (Gene-Trak Systems), AccuProbe™ (Gene Probe) e “Riboprinter Microbial Characterization System” (Qualicon). Estes dois últimos métodos devem ainda receber a aprovação da “AOAC International” (Ryser; Donnelly, 2001). Outros testes comercialmente disponíveis baseados no ácido desoxirribonucleico (DNA) são “Probelia” (BioControl) e “BAX” (Qualicon) (Feng, 2001).

A HPFB permite no procedimento de identificação, como testes opcionais, o uso dos kits de identificação rápido Vitek ou API *Listeria* (BioMérieux), Micro-ID *Listeria* (Organon Teknika Corp.) ou *Listeria* Accuprobe™ test (Gene-Probe) ou equivalente (Pagotto *et al.*, 2001).

A técnica de reação em cadeia da polimerase (“polymerase chain reaction” – PCR) tem sido utilizada para rápida detecção de patógenos em alimentos (Furrer *et al.*, 1991; Stewart; Gendel, 1998; O’Connor *et al.*, 2000; Guan; Levin, 2002; Bhagwat, 2003; Longhi *et al.*, 2003; Kessel *et al.*, 2003), bem como para identificação de *L. monocytogenes*.

O método de PCR para fragmento de 858 bp do gene que codifica a listeriolisina O (*hlyA*), desenvolvido por Bsat e Batt (1993), tem sido usada para identificação de isolados de *L. monocytogenes* (Norton *et al.*, 2000; Hoffman;

Wiedmann, 2001). O *hlyA* é detectado em cepas de *L. monocytogenes* hemolíticas e não hemolíticas (Mengaud *et al.*, 1988) e é específico para esta espécie, não sendo detectada em *L. ivanovii* e *L. seeligeri* (Bsat; Batt, 1993).

A HPFB do Canadá também preconiza a PCR para o gene *hlyA* para rápida identificação de isolados de *L. monocytogenes* de alimentos, porém o fragmento de DNA amplificado é de 730 bp (Blais *et al.*, 2002).

8. Métodos de Subtipagem de *L. monocytogenes*

A diferenciação e a caracterização de isolados de mesma espécie podem ser realizadas utilizando-se os métodos de subtipagem.

A subtipagem é o termo que descreve o processo de diferenciação de isolados bacterianos de uma mesma espécie ou subespécie. A subtipagem bacteriana é usada na caracterização de dois ou mais isolados distintos, cujo objetivo é determinar a sua relação. Por exemplo, na investigação de surtos, o objetivo da subtipagem de isolados bacterianos é verificar a probabilidade de dois ou mais isolados compartilharem um ancestral comum recente. A escolha de um método adequado de subtipagem depende da intenção da aplicação e do objetivo da subtipagem dos isolados. Normalmente, os critérios usados na avaliação de um método de subtipagem devem incluir a capacidade discriminatória, custos, padronização, reprodutibilidade, automação, facilidade de uso e aplicabilidade do método para diferenciar espécies bacterianas (Wiedmann, 2002).

Os métodos de subtipagem não somente melhoram a habilidade em detectar e traçar surtos de listeriose humana, como também promovem uma oportunidade de entender melhor a genética das populações, a epidemiologia e a ecologia de *L. monocytogenes*. Os métodos de subtipagem usados para diferenciar cepas de *L. monocytogenes* têm importantes aplicações na vigilância das doenças transmitidas por alimentos, bem como são ferramentas valiosas para traçar a origem da contaminação de *L. monocytogenes* no processamento de alimentos (Wiedmann, 2002).

Os métodos de subtipagem incluem métodos fenotípicos e métodos genotípicos. Os métodos fenotípicos são aqueles que detectam as características expressas pelos microrganismos e são: biotipagem, tipagem da susceptibilidade a antimicrobianos, tipagem das bacteriocinas, sorotipagem, fagotipagem e eletroforese de enzima multilocos ("multilocus enzyme electrophoresis" – MEE) (Farber, 1996; Graves *et al.*, 1999). Os três últimos são os mais utilizados.

Alguns problemas dos métodos de fenotipagem são a necessidade de reagentes específicos, algumas cepas não são tipificáveis, não reprodutibilidade e falta de poder discriminatório. Por outro lado, a genotipagem proporciona um aumento no poder discriminatório na diferenciação de duas cepas estreitamente relacionadas. Além disso, todas as cepas são tipificáveis, pois o DNA pode ser sempre extraído da bactéria, com exceção da tipagem plasmidial (Farber, 1996).

Os métodos de tipagem (sorotipagem, fagotipagem e genotipagem) têm sido utilizados na avaliação de surtos de listeriose (Jacquet *et al.*, 1995; Dalton *et al.*, 1997; Aureli *et al.*, 2000). Os métodos genéticos permitem uma caracterização sensível de *L. monocytogenes*, e são superiores aos métodos clássicos (sorotipagem e fagotipagem), pois fornecem uma discriminação mais precisa da espécie (Wiedmann, 2002).

Os métodos de genotipagem podem ser: tipagem plasmidial, análise de restrição do DNA cromossômico ("restriction endonuclease analysis" - REA), eletroforese em gel de campo pulsante ("pulsed-field gel electrophoresis" - PFGE) e métodos baseados na PCR, DNA polimórfico amplificado aleatoriamente ("randomly amplified polymorphic DNA" - RAPD), PCR - polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (PCR-"restriction fragment length polymorphism" - PCR-RFLP), ribotipagem, seqüenciamento de DNA, entre outros.

8.1. Sorotipagem

A sorotipagem está baseada no fato das bactérias apresentarem antígenos diferentes nas suas superfícies. Estes antígenos superficiais podem ser detectados por anticorpos ou anti-soro (Wiedmann, 2002). A sorotipagem discrimina *L.*

monocytogenes em 13 sorotipos, sendo que a maioria dos isolados humanos pertence a 3 sorotipos, 1/2a, 1/2b e 4b (Rocourt; Cossart, 1997; Graves *et al.* 1999). Este método tem sido usado na investigação epidemiológica, porém ele tem baixo poder discriminatório quando comparado com os métodos genéticos que podem produzir mais de 100 subtipos (Wiedmann, 2002). A sorotipagem é um método que permite uma rápida triagem das cepas isoladas durante um surto, permitindo eliminar os isolados que não fazem parte do surto (Graves *et al.*, 1999). Os isolados de alimentos e de ambientes frequentemente não são tipificáveis com anti-soros padrão (Graves *et al.*, 1999), portanto, a sorotipagem não é um bom método para traçar a origem da contaminação de alimentos.

8.2. Fagotipagem

A fagotipagem caracteriza isolados bacterianos pela susceptibilidade em ser lisados por um conjunto de fagos padrão. Esta técnica permite uma rápida tipagem, mas requer um conjunto padronizado de fagos de referência (Wiedmann, 2002). Além disso, a porcentagem de cepas não tipificável pode variar com o conjunto de fagos padrão utilizado (Graves *et al.*, 1999). Este método é útil na triagem de uma grande quantidade de culturas isoladas durante um surto (Farber; Peterkin, 2000).

8.3. Eletroforese de enzima multilocos

A MEE diferencia cepas bacterianas pela variação na mobilidade eletroforética das diferentes enzimas constitutivas. As enzimas solúveis de extratos de células são separadas pelo tamanho, por eletroforese em gel, e as suas atividades são determinadas no gel por substratos que geram cor (Wiedmann, 2002). Pequenas diferenças na carga elétrica, conformação e tamanho das moléculas das enzimas resultam na mudança da taxa de migração, que pode ser detectada após coloração específica da enzima. As diferenças no padrão de migração das enzimas dependem diretamente da seqüência de seus aminoácidos (Farber *et al.*, 2001). Este método promove 100% de tipabilidade, no entanto é difícil a padronização entre laboratórios. A MEE tem sido usada em estudos epidemiológicos de listeriose humana, mas parece ser menos discriminatório do

que alguns métodos baseados no DNA (ácido desoxirribonucléico) (Wiedmann, 2002). Embora a MEE seja uma ferramenta muito poderosa para o estudo de genética das populações, taxonomia e estudo evolucionário, ela é moderadamente discriminatória para uso como método de subtipagem em investigações epidemiológicas (Graves, *et al.*, 1999).

8.4. Análise de restrição do DNA cromossomal

A REA foi um dos primeiros métodos baseado no DNA a ser utilizado na tipagem de *L. monocytogenes*. Neste método, o DNA cromossomal é digerido com enzimas de restrição e, através da eletroforese, em gel de agarose, os fragmentos de DNA são separados pelo tamanho. Os fragmentos variam de 1.000 a 20.000 bp e são visualizados sob luz ultravioleta (UV) pela coloração com brometo de etídio. O padrão de bandas que resulta após o corte e separação dos vários fragmentos de DNA é referido como perfil do DNA ou "fingerprint" do DNA (Farber, 1996). É um método relativamente rápido, simples, universalmente aplicável e sensível porque o genoma inteiro é avaliado, porém os fragmentos de restrição genômica são normalmente numerosos e muito próximos, o que dificulta a comparação (Farber, 1996; Graves *et al.*, 1999).

8.5. Reação em cadeia da polimerase

A PCR é um método de replicação *in vitro* de uma sequência de DNA. O método consiste de ciclos repetitivos de desnaturação de DNA através de temperatura elevada (94-95°C), na qual a dupla fita de DNA é convertida em 2 fitas simples; pareamento (*annealing*) do *primer* (oligonucleotídeos) ao DNA alvo; e extensão do DNA pela adição de desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTP) a partir do *primer* pela ação da DNA polimerase (Atlas; Bej, 1994; Farber, 1996). O *primer* normalmente apresenta entre 15 a 30 nucleotídeos e a temperatura de pareamento varia de 55 a 72°C. Os produtos das amplificações pela PCR são separados por eletroforese, coradas com solução de brometo de etídio e a banda (DNA amplificado) é visualizada através de luz UV (Atlas; Bej, 1994, Farber *et al.*, 2001).

8.6. DNA polimórfico amplificado aleatoriamente

O RAPD é um método baseado na PCR e difere da PCR convencional em dois aspectos: i) os *primers* usados são curtos (9 a 10 nucleotídeos) e as seqüências a serem amplificadas são escolhidas aleatoriamente; ii) a temperatura de pareamento do *primer* é menor do que na PCR convencional (Farber, 1996).

O RAPD é um método rápido, simples, de fácil execução e não requer conhecimento anterior da seqüência de DNA. Porém, a reprodutibilidade depende da padronização do método. A comparação de intensidades diferentes de bandas de mesmo tamanho pode ser problemática. Para *L. monocytogenes*, o RAPD pode ser reprodutível sob condições cuidadosamente controladas. Os fatores que podem causar uma variação no padrão de perfil do RAPD incluem a pureza e composição do primer usado, equipamento (termociclador) e a origem da *Taq* DNA polimerase (Farber, 1996). A quantidade final de DNA produzido pode variar amplamente entre os diferentes fragmentos amplificados a partir de um isolado. A comparação e a interpretação de perfis com intensidades diferentes tornam-se bastante difícil porque algumas bandas podem representar reações ineficientes e os fragmentos obtidos a partir de um isolado podem variar nas diferentes reações de amplificação. Conseqüentemente, um protocolo bem padronizado deve ser seguido e usado para obter resultados confiáveis (Graves *et al.*, 1999).

8.7. PCR – Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição

A PCR-RFLP é um método de genotipagem rápido para tipagem de microrganismos e, geralmente, os alvos são os genes de virulência. Neste método, a PCR inicial é realizada usando-se *primers* conhecidos de região particular de virulência. As amplificações resultantes são digeridas por uma enzima de restrição adequada, a qual é escolhida baseada na composição do DNA da região alvo de interesse, usualmente 1 a 2 kb. Um perfil de DNA resulta após separação do produto de PCR digerido por eletroforese em gel de agarose e coloração com brometo de etídio. Teoricamente, qualquer gene de interesse pode ser amplificado pela PCR e ser digerido pela enzima de restrição. As principais vantagens do

método são: rapidez, simplicidade e reprodutibilidade. Algumas das desvantagens são: a necessidade do conhecimento anterior da sequência do DNA na região de interesse, variação substancial do poder discriminatório dependendo da espécie, locus e enzima de restrição, e o método apresenta poder discriminatório moderado. Este método é útil não somente para tipagem, mas também para identificação de espécie (Farber, 1996).

8.8. Eletroforese em gel de campo pulsante

A PFGE caracteriza a bactéria em subtipos pela geração de perfil de bandas de DNA após digestão do DNA bacteriano por enzimas de restrição. Especificamente, o DNA bacteriano é purificado e posteriormente é cortado em fragmentos usando-se enzimas de restrição. Após a digestão com as enzimas de restrição, os fragmentos de DNA são separados pelo tamanho, utilizando-se a eletroforese de campo pulsante para gerar perfis de bandas de DNA. As enzimas são escolhidas para cortar o DNA e produzir entre 8 a 25 bandas grandes de DNA, variando de 40 a 600 kilobases (kb). As enzimas de restrição normalmente utilizadas para tipagem de *L. monocytogenes* são *Ascl* e *Apal*. A PFGE apresenta alto nível de sensibilidade para discriminação de cepas de *L. monocytogenes* (Wiedmann, 2002). Alguns fatores que afetam a resolução dos fragmentos de DNA durante a separação no campo pulsante são: força do campo elétrico, ângulo e forma do campo, concentração e tipo de agarose, tempo de pulso, força iônica e temperatura (Farber, 1996). As vantagens do método são: alta reprodutibilidade e poder discriminatório e fácil interpretação dos resultados devido à produção de 10 a 15 bandas facilmente visíveis (Farber, 1996). As principais desvantagens são: tempo necessário para completar o procedimento (2-3 dias), custo das enzimas de restrição, que são caras, e o equipamento de eletroforese, que também é relativamente caro (Farber, 1996; Graves *et al.*, 1999).

8.9. Ribotipagem

A ribotipagem refere-se ao uso de sondas de DNA marcado para reconhecer os genes ribossomal presente em todas as bactérias (Farber, Peterkin, 2000). Este

método consiste da digestão do DNA bacteriano por uma endonuclease de restrição, separação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose, e então transferência dos fragmentos para uma membrana de nylon ou celulose. Os fragmentos contendo a informação específica do gene codificador do ácido ribonucléico ribossômico (rRNA) são detectados pelo uso de sondas de DNA marcado (Farber *et al.*, 2001).

Ao contrário da PFGE, as enzimas usadas na ribotipagem cortam o DNA em muitos fragmentos pequenos (300 a 500) de aproximadamente 2 a 20 kb. Os perfis de banda de DNA resultantes são baseados somente naqueles fragmentos de DNA que contêm os genes rRNA. A enzima de restrição *EcoRI* normalmente é usada para ribotipagem. Embora, a ribotipagem com *EcoRI* promova sensível diferenciação de *L. monocytogenes* em subtipos que parecem correlacionar com características fenotípicas e de virulência, o uso de diferentes enzimas, por exemplo, *PvuII*, em reações separadas, proporciona um aumento na discriminação de cepas (Louie *et al.*, 1996; Wiedmann, 2002).

Um sistema totalmente automatizado para ribotipagem, o “RiboPrinter® Microbial Characterization System”, desenvolvido pela Qualicon, Inc., realiza todas as etapas do processo requerido para caracterizar a bactéria ao nível de cepa, a partir das células lisadas até a análise da imagem. Quando os DNA de cepas bacterianas diferentes são clivados com a *EcoRI*, separados pelo tamanho e hibridizados com uma sonda de rRNA marcada, cada cepa produz um padrão único. A partir desses dados de padrões de fragmento, o sistema usa uma série de propriedades para gerar o padrão de RiboPrint, que é caracterizado, arquivado e comparado com padrões fornecidos pelo banco de dados. Esta comparação pode resultar na identificação do organismo de interesse ao nível de gênero, espécie e cepa. O sistema reduz o tempo envolvido em cada etapa do método, necessitando 8 h para produzir resultados confiáveis e acurados (Bruce, 1996). O sistema automatizado possui elevado nível de reprodutibilidade e padronização e é um método de escolha para estudos em larga escala, assim como para indústrias (Wiedmann, 2002). Quanto ao poder discriminatório da ribotipagem automatizada, é menor que da PFGE, porém é rápido e prático para uso em um grande número de

isolados (Aarnisalo *et al.*, 2003). A ribotipagem, quando está associada a outra técnica molecular como a PCR-RFLP para os genes de virulência *hly* e *actA*, apresenta um aumento no índice de discriminação (Jeffers *et al.*, 2001).

8.10. Seqüenciamento de DNA

A subtipagem de *L. monocytogenes* pelo seqüenciamento de DNA ainda está sendo desenvolvida e poderá ser, num futuro próximo, uma técnica alternativa na discriminação de cepas.

O método mais simples e amplamente usado na determinação de seqüência de nucleotídeos em um fragmento de DNA é o método enzimático desenvolvido por Sanger e colaboradores (Ausubel *et al.*, 1999). Este método baseia-se na geração de seqüências de oligonucleotídeos de tamanhos variados pelo uso de um *primer*, a fita simples de DNA como molde, uma DNA polimerase, dNTPs e ddNTPs (2', 3' dideoxynucleotídeos trifosfatos). Os ddNTPs são dNTPs que perderam o resíduo hidroxil na posição 3' da desoxirribose. Quando o ddNTP é incorporado na cadeia de uma nova fita de DNA sintetizada, ele não pode formar a ligação fosfodiéster com outro dNTP e, conseqüentemente, a cadeia de DNA termina. Usando-se um ddNTP específico na mistura da reação, a cadeia de DNA é concluída na posição da base específica, gerando seqüência de tamanhos aleatoriamente variados com um terminal 5' fixo. As reações são realizadas separadamente, para cada um dos 4 nucleotídeos. As seqüências de DNA geradas são separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Um máximo de 300 a 400 bp pode ser lido acuradamente a partir de um gel (Hendrickson; Misra, 1994).

O seqüenciamento de DNA de um ou mais genes bacterianos representa outro método de subtipagem genética. O "Multilocus Sequence Typing" (MLST) é um método que usa o seqüenciamento de múltiplos genes ou fragmentos de genes, para diferenciar subtipos bacterianos. O MLST refere-se ao seqüenciamento de múltiplos genes de manutenção ("house keeping genes"), mas também pode ser usado o seqüenciamento de múltiplos genes de virulência (Wiedmann, 2002).

O desenvolvimento do método de MLST para *L. monocytogenes* em diferentes laboratórios tem sido favorecido pelo avançado estágio de conhecimento de genes de virulência da bactéria. O seqüenciamento de DNA de uma variedade de genes de virulência de *L. monocytogenes* têm sido determinadas para uma ou mais cepas. No entanto, o desenvolvimento do método MLST requer a identificação de genes altamente polimórficos e/ou fragmentos de genes de um grande número de cepas representativas de *L. monocytogenes* e estas cepas já devem estar caracterizadas por outros métodos para permitir a comparação do poder discriminatório do MLST com outros métodos (Wiedmann, 2002).

Segundo trabalho de Cai *et al.* (2001), dos genes *recA*, *prs*, *sigB*, *actA*, *inlA* e duas regiões intergênicas, *hly-mpl* e *plcA-hly*, seqüenciados, uma discriminação maior das cepas foi obtida com os genes de virulência *actA* e *inlA*. Os autores também observaram que o seqüenciamento das regiões entre os nucleotídeos 316 a 915 e 1.090 a 1.690 para os genes *actA* e *inlA* respectivamente, parecem ser promissores para uso na subtipagem de isolados de *L. monocytogenes*.

9. Aplicações dos Métodos de Subtipagem

Os métodos de subtipagem são instrumentos importantes na elucidação de surtos de doenças transmitidas por alimentos, na avaliação da contaminação dentro de uma indústria de alimentos e na caracterização do potencial patogênico dos isolados. As informações ou conhecimentos adquiridos permitem minimizar os riscos de aquisição de uma doença transmitida por alimentos, através da implantação de medidas de controle durante o processamento e distribuição dos alimentos.

9.1. Avaliação de surtos de listeriose de origem alimentar

Numa investigação epidemiológica, a interpretação dos resultados da subtipagem molecular deve ser realizada conjuntamente com os dados epidemiológicos. A combinação dos dados não somente ajuda na elucidação de um

surto, como também na eliminação da fonte de contaminação do surto. (Wiedmann, 2002).

A sorotipagem e a fagotipagem foram os métodos mais utilizados na avaliação de surtos de listeriose, até o surgimento das técnicas moleculares. Desde então, a PFGE tornou-se a técnica mais usada, devido ao seu alto poder discriminatório quando comparado com outros métodos.

Em meados da década de 90, a fagotipagem deixou de ser usada no estudo de surtos, provavelmente pela dificuldade de padronização da técnica e devido a existência de cepas não tipificáveis. Esta técnica já foi usada na avaliação de surtos como o ocorrido na Suíça, causado pelo queijo Vacherin Mont d'Or (Bille, 1990), nos Estados Unidos da América pelo queijo frescal tipo Mexicano (Linann *et al.*, 1988), na França pelo alimento a base de língua de porco (Jacquet *et al.*, 1995) e na Suécia por pescado (Ericsson *et al.*, 1997). Nos dois últimos, os isolados de *L. monocytogenes* também foram subtipados utilizando-se PFGE.

A sorotipagem ainda vem sendo usada na avaliação de surtos, porém normalmente associada a uma técnica genética como a PFGE (Jacquet *et al.*, 1995; Ericsson *et al.*, 1997, CDC, 1998; Lyytkäinen *et al.*, 2000; Aureli *et al.*, 2000), ribotipagem (Dalton *et al.*, 1997; CDC, 1998; Hurd *et al.*, 2000) e RAPD (Aureli *et al.*, 2000).

A PFGE tem auxiliado na investigação de surtos mais recentes relatados (Farber *et al.*, 2000; Boogs *et al.*, 2001; CDC, 2002).

Rorvik *et al.* (2000) avaliaram os isolados de pacientes e produtos marinhos utilizando o método MEE e a partir da caracterização de clones idênticos de *L. monocytogenes* de pacientes e alimentos marinhos, incluindo produtos prontos para consumo, sugeriram a associação dos alimentos aos casos de listeriose na Noruega.

Os métodos de subtipagem, além de fornecerem condições de detectar o alimento veiculador do agente patogênico associado ao surto, também auxiliam na implantação de medidas preventivas para o controle dos perigos, como por

exemplo no surto ocorrido recentemente na Carolina do Norte, EUA (Boggs *et al.*, 2001). Neste surto, *L. monocytogenes* isoladas de doentes, de queijo estilo Mexicano e de leite cru apresentaram mesmo perfil de PFGE. As investigações levaram as autoridades de saúde a proibirem as vendas de leite cru das fazendas para processadores não comerciais e à educação dos proprietários de lojas sobre a ilegalidade da venda de produtos lácteos não inspecionados.

9.2. Diagnóstico da contaminação nas indústrias de alimentos

A grande contribuição dos métodos de subtipagem para o setor alimentício é que eles são ferramentas importantes para traçar a origem da contaminação do produto acabado, verificar a disseminação da contaminação e determinar os locais de persistência de patógenos nas indústrias, visando a correção/adequação ou implantação de procedimentos operacionais de higienização mais adequados.

A avaliação da contaminação microbiana de indústrias de alimentos utilizando-se os métodos fenotípicos de subtipagem como a sorotipagem (Harvey; Gilmour, 1992; Jacquet *et al.*, 1993), fagotipagem (Jacquet *et al.*, 1993) e MEE (Lawrence; Gilmour, 1995; Nesbakken *et al.*, 1996; Rorvik *et al.*, 2000) são menos utilizadas que os métodos genéticos. A maioria dos pesquisadores tem utilizado os métodos genéticos no estudo da disseminação, rastreamento e controle de *L. monocytogenes* em indústrias de alimentos. Dentre eles, a mais utilizada é a PFGE (Unnerstad *et al.*, 1996; Destro *et al.*, 1996; Autio *et al.*, 1999; Giovannacci *et al.*, 1999; Johansson *et al.*, 1999; Miettinen *et al.*, 1999a; Waak *et al.*, 2002; Aarnisalo *et al.*, 2003; Cruz, 2003, Lundén *et al.*, 2003), seguido pela RAPD (Lawrence; Gilmour, 1995; Destro *et al.*, 1996; Giovannacci *et al.*, 1999; Andricheto, 2000; Figueiredo, 2000; Vogel *et al.*, 2001) e ribotipagem (Arimi *et al.*, 1997; Norton *et al.*, 2001a; Hoffman *et al.*, 2003; Aarnisalo *et al.*, 2003), e com menos frequência, RFLP (Harvey; Gilmour, 1992; Nesbakken *et al.*, 1996) e PCR-REA (Giovannacci *et al.*, 1999)

Para determinar a origem da contaminação de *L. monocytogenes* em queijos na indústria, Jacquet *et al.* (1993) caracterizaram os isolados através da

sorotipagem e fagotipagem. Foram encontrados isolados de mesmo sorotipo e fagotipo em queijos, equipamentos e prateleira, sugerindo que a contaminação do produto final deve ter ocorrido pelo contato com a prateleira, durante a maturação.

Na avaliação de uma indústria processadora de leite pasteurizado tipo C, Figueiredo (2000) observou, utilizando o RAPD, que a diversidade genética de *L. monocytogenes* encontrada em amostras de leite cru pode ser atribuída a diferentes fontes de contaminação que está sujeita a matéria prima até ser recebida na plataforma de recepção. O autor sugeriu ainda, que a contaminação do leite pasteurizado deve ter ocorrido após pasteurização, uma vez que os tipos genéticos encontrados no leite pasteurizado foram diferentes dos encontrados no leite cru.

A caracterização, por PFGE, de isolados de *L. monocytogenes* realizada por Johansson *et al.* (1999) para identificar a origem e a rota de contaminação dos produtos (peixes salgados defumados e embalados a vácuo) definiu como pontos críticos os equipamentos de salga e fatiamento, devido à dificuldade de limpeza.

Vogel *et al.* (2001) elucidaram as rotas de contaminação por *L. monocytogenes* no processamento de salmão defumado a frio de 2 produtores da Dinamarca, utilizando o RAPD, sugerindo que a contaminação do produto final nas duas fábricas havia ocorrido durante o processamento e não a partir do peixe cru. Na fábrica I, a contaminação ocorreu na etapa de fatiamento pelo equipamento e na fábrica II, no processo de salga em salmoura, confirmada pelo isolamento da bactéria na salmoura e agulha de injeção. Contudo, o peixe cru seria, possivelmente, a origem da contaminação do ambiente e dos equipamentos.

Norton *et al.* (2001a) e Hoffman *et al.* (2003) também verificaram, através de ribotipagem, que as possíveis fontes de contaminação de peixe defumado eram a matéria prima e o ambiente de processamento. Hoffman *et al.* (2003), ainda, observaram que a contaminação ambiental das indústrias de peixe defumado era influenciada pelos procedimentos operacionais e de higienização. As fábricas com matérias prima de origem similar e valores de prevalências de contaminação da matéria prima similares apresentaram taxas de contaminação ambiental diferentes,

indicando que os fatores operacionais inerentes da fábrica significativamente contribuem na forma de contaminação e incidência de *Listeria*.

Em uma linha de processamento de salmão "gravlax", de São Paulo, Cruz (2003) verificou, empregando a PFGE, que a disseminação de *L. monocytogenes* era generalizada, ocorrendo tanto a presença de cepas residentes, bem como a introdução de cepas através da matéria prima. Foi observado também que um subtipo de *L. monocytogenes*, introduzida a partir da matéria prima, se disseminou por toda a linha de produção.

Destro *et al.* (1996) utilizando RAPD e PFGE para traçar a contaminação de *L. monocytogenes* em uma usina processadora de camarão, verificaram que os isolados do ambiente apresentavam perfis genéticos exclusivos, enquanto isolados de amostras de água, de utensílios e equipamentos apresentavam perfis em comum. Além disso, os isolados de amostras de camarão obtidas de diferentes pontos do processamento apresentavam um perfil genético comum, àqueles presentes em isolados de mãos de manipuladores.

A disseminação de *L. monocytogenes* em uma indústria processadora de nuggets congelados de frango foi avaliada por Andrigheto (2000), utilizando-se o RAPD. Neste estudo, foi concluído que a matéria prima chega à fábrica contaminada com subtipos que são resistentes às condições de processamento e capazes de colonizar o ambiente, e que os equipamentos e o ambiente também contribuem para a contaminação do produto.

Lundén *et al.*, 2003 estudaram indústrias processadoras de carnes e de aves e encontraram cepas persistentes e não persistentes em todos os estabelecimentos. *L. monocytogenes* de mesmo subtipo de PFGE estava presente em produtos e em equipamentos de várias linhas de processamento. Os equipamentos de processamento e as superfícies que estavam em contato direto com os produtos parecem ter papel fundamental na contaminação por *L. monocytogenes* e disseminação da contaminação nos produtos. Os autores constataram também que o grau de contaminação nas linhas de processamento e

nos equipamentos teria a influencia negativa da compartimentalização deficiente da linha.

Além das matérias prima, equipamentos e ambientes, os manipuladores também podem levar à contaminação cruzada por *L. monocytogenes* dos produtos alimentícios na indústria. Este fato, foi observado em indústrias processadoras de nuggets congelado de frango (Andrigheto, 2000) truta arco íris defumada (Autio *et al.*, 1999) e salmão "gravlax" (Cruz, 2003).

Através dos métodos de subtipagem, pode-se verificar que certas cepas de *L. monocytogenes* têm habilidade em adaptar-se às condições das indústrias de alimentos e permanecer nestes ambientes por meses ou até anos. Os estudos têm mostrado a persistência em tanques de leites das fazendas (Waak *et al.*, 2002), em silos de armazenamento de leite de usinas processadoras (Waak *et al.*, 2002 Harvey; Gilmour, 1992), em indústrias de produtos lácteos (Unnestad *et al.*, 1996), inclusive de sorvete (Miettinen *et al.*, 1999a), em matadouro frigorífico de suínos (Giovannacci *et al.*, 1999), e em estabelecimentos processadores de carnes (Nesbakken *et al.*, 1996; Lundén *et al.*, 2003), aves (Lawrence; Gilmour, 1995; Lundén *et al.*, 2003), peixes (Vogel *et al.*, 2001; Norton *et al.*, 2001a; Cruz, 2003; Hoffman *et al.*, 2003) e camarão (Destro *et al.*, 1996).

Empregando-se a MEE, verificou-se que os isolados de produtos marinhos e de diferentes ambientes das indústrias apresentaram grande diversidade genética. No entanto, os isolados de cada indústria foram geneticamente mais homogêneos, mostrando que cada estabelecimento pode ser colonizada com clones específicos (Rorvik *et al.*, 2000).

Aarnisalo *et al.* (2003), estudaram *L. monocytogenes* isoladas de 17 indústrias de alimentos (carne, aves, pescados e produtos lácteos), e com o auxílio da ribotipagem automatizada e da PFGE, também observaram que cada estabelecimento parece possuir seu próprio tipo específico de *L. monocytogenes*.

Norton *et al.* (2001a) verificaram que alguns ribotipos não eram eliminados pelo programa de sanificação correntemente utilizado pela indústria, permanecendo

no ambiente de processamento por meses, sugerindo que algumas cepas podem apresentar características genéticas que lhes conferem a capacidade de sobreviver ao estresse ambiental e colonizarem o ambiente de processamento.

Os programas de limpeza e sanitização mais rigorosos podem impedir a instalação de determinadas cepas em ambientes de processamento de salmão defumado no entanto, uma contaminação esporádica pode ocorrer devido à natureza ubiquitária do microrganismo (Vogel *et al.*, 2001).

Andrigheto (2000) também observou, empregando o RAPD, que subtipos de *L. monocytogenes* não foram eliminados pelos processos de higienização, passando a fazer parte do ambiente da indústria de nuggets congelado de frango.

Em matadouro frigorífico de carne suína, Giovannacci *et al* (1999) observaram que a contaminação por *L. monocytogenes* das carcaças e cortes suínos pode ter ocorrido pela higienização inadequada das instalações ou pela entrada de animais contaminados.

O conhecimento das fontes de contaminação e dos locais de residência de clones de microrganismos indesejáveis dentro de uma indústria pode levar ao melhor gerenciamento dos programas de sanificação, para controle destes agentes nas indústrias de alimentos.

A descoberta de isolados de *L. monocytogenes* de mesmo subtipo (mesmo perfil eletroforético do PFGE) e sorotipo (1/2b) em sorvetes, ambientes de produção e em diferentes equipamentos, como equipamento de embalagem de sorvete, conduziu ao aperfeiçoamento dos processos de limpeza e desinfecção. Além disso, mudanças estruturais nas esteiras transportadoras do equipamento de embalagem foram realizadas para facilitar a limpeza sem afetar a eficiência do equipamento. Essas práticas levaram à erradicação de *L. monocytogenes* nessa indústria de sorvete (Miettinen *et al.*, 1999a).

Em indústria de processamento de truta arco íris defumada a frio, através da subtipagem das cepas por PFGE, constatou-se que a contaminação do produto final estava associada às etapas de fatiamento e salga. A desmontagem dos

equipamentos de retirada de pele, salga e fatiamento para a realização da limpeza e desinfecção das peças, e o uso de água quente (80°C), vapor d'água e ar quente em equipamentos e ambientes (pisos e paredes) podem ser úteis na eliminação de *L. monocytogenes* (Autio *et al.*, 1999).

A implantação de medidas de erradicação em indústrias de produtos lácteos também resultou na diminuição da frequência de amostra positivas para *Listeria* (Unnerstad *et al.*, 1996)

9.3. Caracterização do potencial patogênico

Os métodos de subtipagem molecular permitem a exploração genética de populações e o estudo da evolução de *L. monocytogenes*. Esses métodos têm o potencial para diferenciar cepas bacterianas e facilitar a separação de subtipos ou grupos clonais que diferem em suas características fenotípicas e /ou habilidade de causar doença de origem alimentar humana. Conseqüentemente, no futuro, somente alguns subtipos poderão ser considerados perigos quando presentes em alimentos prontos para o consumo (Wiedmann, 2002).

A predominância de cepas de sorotipos 4b, 1/2a e 1/2b em surtos e casos de listeriose humana pode ser explicado por duas hipóteses: i) o homem está mais exposto a estes sorotipos do que outros, por serem mais freqüentemente encontrados em alimentos e/ou ii) estes sorotipos têm um potencial patogênico particular ao homem. Assim, programas de vigilância, que utilizam diferentes estratégias de subtipagem para diferenciar cepas de *L. monocytogenes*, em conjunção com os estudos genéticos de populações e de patogênese podem conduzir à compreensão da dinâmica de transmissão de *L. monocytogenes* e validação da hipótese da existência de subtipos específicos predominantemente causadores de infecção humana (Wiedmann, 2002).

Através dos métodos de subtipagem molecular, *L. monocytogenes* isoladas do homem, animais, alimentos e meio ambiente, têm sido divididas em grupos genéticos. Já em 1991, Rasmussen *et al.* (1991) verificaram que cepas de *L. monocytogenes* podiam ser divididas em 2 grupos, de acordo com as diferenças na

seqüência de nucleotídeos observadas no gene codificador da listeriolisina. Vines e Swaminathan (1998) também verificaram diferenças nas seqüências de nucleotídeos do *hly*, separando as cepas estudadas em 2 grupos.

Vines *et al.* (1992), através da PCR-RFLP dos genes *hly*, *iap*, *mpl* e *prfA*, também separaram as cepas de *L. monocytogenes* em 2 grupos, igualmente observado por Bibbs *et al.* (1990) e Trott *et al.* (1993), porém utilizando-se a MEE.

Na avaliação de 176 cepas isoladas do homem, animais, alimentos e ambientes, através da PFGE, Brosch *et al.* (1994), puderam distinguir 2 divisões genômicas de *L. monocytogenes*.

Um terceiro grupo de *L. monocytogenes* foi evidenciado por Rasmussen *et al.* (1995), baseado nas diferenças das seqüências de nucleotídeos dos genes *flaA*, *hly* e *iap*. Wiedmann *et al.* (1997), utilizando as técnicas de análise do polimorfismo alélico dos genes *actA*, *inlA* e *hly*, bem como da ribotipagem, também verificaram a existência de uma terceira linhagem filogenética.

Wiedmann *et al.* (1997) designaram as 3 linhagens geneticamente distintas em linhagens I, II e III. A linhagem I contém cepas dos sorotipos 1/2b, 3b, 3c e 4b; predominância de isolados humanos; contém a maioria dos isolados dos surtos e casos humanos, sugerindo maior potencial patogênico ao homem quando comparado com as outras linhagens. A linhagem II contém os sorotipos 1/2a, 1/2c e 3a; inclui as cepas isoladas de alimentos e predominância de cepas isoladas de animais; parece ser menos virulenta ao homem. E a linhagem III contém os sorotipos 4a e 4c; predominância de isolados de animais e menos freqüentemente, isolados humanos e de alimentos; parece apresentar limitada virulência ao homem (Wiedmann *et al.*, 1997; Jeffers *et al.*, 2001; Nadon *et al.*, 2001).

A linhagem III apresenta uma distinta unidade taxonômica que foi observada através da análise do seqüenciamento de DNA do gene 16S rRNA e, pode, possivelmente, representar uma nova subespécie caracterizada por reduzida virulência ao homem e especificidade a animais. Esta linhagem pode ainda ser

dividida em 2 grupos: linhagem IIIA e IIIB, sendo que as cepas da linhagem IIIB não utilizam a ramnose (Wiedmann, 2002).

Os estudos de polimorfismo alélico dos genes de virulências (Wiedmann *et al.*, 1997; Moriishi *et al.*, 1998) relevaram que o gene *actA* apresenta 2 alelos denominados tipos 3 e 4, apresentando 3 e 4 regiões de PRRs, respectivamente.

Vines *et al.*, 1992 utilizando a técnica PCR-RFLP verificaram o polimorfismo dos genes *iap*, *hlyA*, *prfA* e *mpl*. Quanto aos genes *hly* e *inlA*, através do PCR-RFLP, pode-se distinguir 8 tipos alélicos para *hly* e 11 para *inlA* (Wiedmann *et al.*, 1997).

Na avaliação de 195 isolados (humano, animal, ambiente e alimento), os alelos de *hly* tipo 1 e 2 foram os tipos mais comuns encontrados. O alelo *hly* 1 representou 64,7 % dos isolados humanos. Entre os tipos alélicos de *actA*, não houve diferenças na distribuição entre os isolados (Jeffers *et al.*, 2001).

Listeria monocytogenes por suas características particulares tem merecido atenção no meio científico nos últimos anos tornando-se uma referência de estudo dentre os microrganismos patogênicos causadores de doenças transmitidas por alimentos. A sua presença nos mais variados tipos de alimentos e locais de processamento, aliada a sua capacidade de se adaptar às mais diversas condições do meio ambiente e a severidade da doença ao homem, são fatores que justificam o interesse e a importância por um conhecimento cada vez maior sobre este microrganismo em particular. A revisão bibliográfica tem revelado um crescente desenvolvimento e a utilidade cada vez maior dos métodos moleculares na detecção e caracterização de *Listeria monocytogenes*, contribuindo de forma significativa para o diagnóstico da sua presença e disseminação em unidades processadoras de alimentos. As técnicas de subtipagem molecular, com características discriminatórias cada vez maiores, tem evidenciado de forma mais precisa a importância dos programas de Boas Práticas de Manufatura e Procedimentos Operacionais Padronizados, particularmente aqueles envolvendo os processos de limpeza e desinfecção, no controle de microrganismos patogênicos.

10. Referências Bibliográficas

1. AARNISALO, K.; AUTIO, T.; SJÖBERG, A. M.; LUNDÉN, J.; KORKEALA, H.; SUIHKO, M. L. Typing of *Listeria monocytogenes* isolates originating from the food processing industry with automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.66, n.2, p.249-255, Feb., 2003.
2. ANGRIGHETO, C. **Disseminação de *Listeria monocytogenes* em uma linha de produção de “nuggets” congelado de frango**. São Paulo, 2000. 51p.
Dissertação (Mestre em Ciências de Alimentos – área de bromatologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
3. ARIMI, S. M.; RYSER, E. T.; PRITCHARD, T. J.; DONNELLY, C. W. Diversity of *Listeria* ribotypes recovered from dairy cattle, silage, and dairy processing environments. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.60, n.7, p.811-816, July, 1997.
4. ATLAS, R. M.; BEJ, A. K. Polymerase chain reaction. In: GERHARDT, P.; MURRAY, R. G. E.; WOOD, W. A.; KRIEG, N. R. **Methods for general and molecular bacteriology**. Washington: American Society for Microbiology, 1994. Cap. 19, p.418-435.
5. AURELI, P.; FIORUCCI, G. C.; CAROLI, D.; MARCHIARO, G.; NOVARA, O.; LEONE, L.; SALMASO, S. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 342, n.17, p.1236-1241, Apr., 2000.
6. AUSUBEL, F. M.; ALBRIGHT, L. M.; JU, J. **Short protocol in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology**. 4th ed., John Wiley & Sons, Inc., Cap. 7, p.7.0.1-7.0.15, 1999.
7. AUTIO, T.; HIELM, S.; MIETTINEN, M.; SJÖBERG, A. M.; AARNISALO, K.; BJÖRKROTH, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-

field gel electrophoresis typing. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n. 1, p.150-155, Jan.,1999.

8. AZADIAN, B. S.; FINNERTY, G. T.; PEARSON, A. D. Cheese-borne *Listeria* meningitis in immunocompetent patient. **The Lancet**, London, v.1, n.8632, p. 322-323, Feb., 1989.

9. BANNISTER, B. A. *Listeria monocytogenes* meningitis associated with eating soft cheese. **Journal of Infection**, London, v.15, p.165-168, 1987.

10. BEMRAH, N.; SANAA, M.; CASSIN, M. H.; GRIFFITHS, M. W.; CERF, O. Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 37, p.129-145, 1998.

11. BHAGWAT, A. A. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 84, n.2, p.217-224, July, 2003.

12. BIBBS, W. F.; GELLIN, B. G.; WEAVER, R.; SCHWARTZ, B. PLIKAYTIS, B. D.; REEVES, M. W.; PINNER, R. W.; BROOME, C. V. Analysis of clinical and food-borne isolates of *Listeria monocytogenes* in the United States by multilocus enzyme electrophoresis and application of the method to epidemiologic investigations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, n.7, p.2133-2141, July, 1990.

13. BILLE, J. Epidemiology of human listeriosis in Europe. with special reference to the Swiss outbreak. In: MILLER, A. J.; SMITH, J. L.; SOMKUTI, G.A. **Foodborne Listeriosis**. New York: Elsevier, 1990. cap. 12, p. 71-74.

14. BLAIS, B. W.; PHILLIPPE, L. M.; PAGOTTO, F.; CORNEAU, N. Identification of presumptive positive *Listeria monocytogenes* from foods and environmental samples by the polymerase chain reaction (PCR). In: CANADA. Health Products and Food Branch. **Compendium of analytical methods**: laboratory procedures of

microbiological analytical of foods, [MFLP-74]. Ottawa. April, 2002. Disponível em: www.hc-sc.gc.ca/food-aliment. Acesso em: 12/02/2003.

15. BOGGS, J. D.; WHITWAM, R.E.; HALE, L.M.; BRISCOE, R. P.; KAHN, S.E.; MACCORMACK, J. N.; MAILLARD, J-M.; GRYSON, S.C.; SIGMON, K.S.; REARDON, J.W.; SAAH, J. R. Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese – North Caroline, October 2000 – January 2001. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 50, n.26, p.560-562, July, 2001.

16. BRACKETT, R. E. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. **Food Technology**, Chicago, v.42, n.4, p. 162-164, 178, Apr., 1988.

17. BRASIL. Instrução Normativa nº 4, de 01 de março de 2004. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível: www.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei. Acesso em: 28/05/04.

18. BRASIL. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. **Diário Oficial**, Brasília, 11 mar. 96. Seção I. 50p.

19. BRASIL. Portaria nº 352, de 04 de setembro de 1997. Aprova regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Minas frescal. In: FOOD STAFF (comp.). **Food Base**: Legislação de Alimentos. São Paulo: 1999. CD-ROM. Produzido por Vox Editora.

20. BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm. Acesso em: 11/05/01.

21. BROSCH, R.; CHEN, J.; LUCHANSKY, J. B. Pulsed-field fingerprinting of *Listeriae*: identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.7, p.2584-2592, July, 1994.

22. BRUCE, J. Automated system rapidly identifies and characterizes microorganisms in food. **Food Technology**, Chicago, v.50, n.1, p.77-81, Jan., 1996.
23. BSAT, N.; C. BATT.. A combined modified reverse dot-blot and nested PCR assay for the specific non-radioactive detection of *Listeria monocytogenes*. **Molecular and Cellular Probes**, London, v.7, n.3, p.199-207, June, 1993.
24. BÜLLA, C. J.; BILLE, J.; GLAUSER, M. P. An epidemic of food-borne listeriosis in Western Switzerland: description of 57 cases involving adults. **Clinical Infections Diseases**, Chicago, v.20, n.1, p.66-72, Jan., 1995.
25. CAI, S.; KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y.; CARGIOLI, T. G.; CHUNG, M. S.; NIELSEM, R.; WIEDMANN, M. Rational design of DNA sequence-based strategies for subtyping *Listeria monocytogenes*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.40, n.9, p.3319-3325, Sept., 2002.
26. CARRIQUE-MAS, J. J.; HÖKEBERG, I.; ANDERSSON, Y.; ARNEBORN, M., THAM, W. DANIELSSON-THAM, M.-L.; OSTERMAN, B.; LEFFLER, M.; STEEN, M.; ERIKSSON, E, HEDIN, G.; GIESECKLE, J. Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese – an outbreak of listeriosis? **Epidemiology and Infection**, v. 130, p.79-86, 2003.
27. CARVALHO, J.D.G. **Avaliação da qualidade de queijos tipo Minas frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializados em Campinas – SP**. Campinas, 2003. 107p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
28. CASAROTTI, V.T. **Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo Minas frescal comercializados em Piracicaba**. Piracicaba, 1993. 109p. Dissertação (Mestre em Ciências - área de Ciência e Tecnologia de Alimentos) -Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

29. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Multistate outbreak of listeriosis – United States, 1998. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.47 n.50, p.1085-1086, Dec., 1998.
30. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Public health dispatch: outbreak of listeriosis – Northeastern United States, 2002. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.51, n.42, p.950-951, Oct., 2002.
31. CHARLTON, B.R.; KINDE, H.; JENSEN, L. H. Environmental survey for *Listeria* species in California milk processing plants. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.53, n.3, p. 198-201, Mar., 1990.
32. CORDANO, A. M.; ROCOURT, J. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.70, n.1-2, p.175-178, Oct., 2001.
33. COSSART, P. Molecular and cellular basis of the infection by *Listeria monocytogenes*: an overview. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v.291, n.6-7, p.401-409, Feb., 2002.
34. COSSART, P.; KOCKS, C. The actin-based motility of the facultative intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.13, n.3, p.395-402, 1994.
35. COSSART, P.; LECUIT, M. Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. **The EMBO Journal**, v.17, n.14, p.3797-3806, 1998.
36. COTTON, L. N.; WHITE, C. H. *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, and *Salmonella* in dairy plant environments. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.75, n.1, p.51-57, Jan., 1992.
37. COX, L. J.; KLEISS, T.; CORDIER, J.L.; CORDELLANAC, KONKEL, P.; PEDRAZZINI, C.; BEUMER, R. SIEBENGA, A. *Listeria* spp in food processing, non-food, and domestic environments. **Food Microbiology**, London, v.6, n.1, p. 49-61, Feb., 1989.

38. CRUZ, C. D. **Uso da PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) para traçar a disseminação de *Listeria monocytogenes* em uma linha de produção de salmão “gravlax”**. São Paulo, 2003. 61p. Dissertação (Mestre em Ciências de Alimentos – área de Bromatologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
39. 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. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 336, n.2, p.100-105, Jan., 1997.
40. DE BYSER M. L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.67, n. 1-2, p.1-17, July, 2001.
41. DESTRO, M. T. ***Listeria monocytogenes* em camarão (*Penaeus brasiliensis*): marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação em uma unidade processadora de pescado**. São Paulo, 1995. 142p. Tese (Doutor em Ciências dos Alimentos - área de Bromatologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
42. DESTRO, M.T.; LEITÃO, M. F.F.; FARBER, J. Use of molecular typing to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.2, p.705-711, Feb, 1996.
43. DESTRO, M. T.; SERRANO, A. M.; KABUKI, D.Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, Oxford, v.2, n.2, p. 110-112, Apr., 1991.
44. DONNELLY, C. W. *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. **Nutrition Reviews**, v.59, n.6, p.183-194, June, 2001.

45. DOYLE, M. E.; MAZZOTTA, A. S.; WANG, T.; WISEMAN, D. W.; SCOTT, V. N. Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.64, n.3, p.410-429, Mar., 2001.
46. EL MARRAKCHI, A.; HAMAMA, A.; EL OTHMANI, F. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products or imported into Morocco. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 56, n.3, p.256-259, Mar., 1993.
47. EL-SHENAWY, M. A. Sources of *Listeria* spp. in domestic food processing environment. **International Journal of Environmental Health Research**, v.8, n.3, p.241-251, 1998.
48. ERICSSON, H.; EKLOW, A.; DANIELSSON-THAM, M.-L.; LONCAREVIC, S.; MENTZING, L.-O.; PERSSON, I.; INNERSTAD, H.; THAM, W. An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n.11, p.2904-2907, Nov., 1997.
49. FARBER, J. M. An introduction to the hows and whys of molecular typing **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, n.10, p.1091-1101, Oct., 1996.
50. FARBER, J. M.; CARTER, M. D.; VARUGHESE, P. V.; ASHTON, F. E.; EWAN, E. P. Listeriosis traced to the consumption of alfalfa tablets and soft cheese. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v.322, n.5, p.338, Feb., 1990.
51. FARBER, J. M.; COATES, F.; DALEY, E. Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.15, n.3, p. 103-105, Sept., 1992.
52. FARBER, J. M.; DELAY, E. M.; MACKIE, M. T.; LIMERICK, B. A small outbreak of listeriosis potentially linked to the consumption of imitation crab meat. **Letter in Applied Microbiology**, Oxford, v.31, n.2, p.100-104, Aug., 2000.
53. FARBER, J. M.; GENDEL, S. M.; TYLER, K. D.; BOERLIN, P.; LANDRY, W. L.; FRITSCHER, S. J.; BARRET, T. J. Molecular Typing and differentiation. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological**

examination of foods. 4th. Washington: American Public Health Association, 2001. Cap. 11, p.127-156.

54. FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, Washington, v.55, n.3, p. 476-511, Sept., 1991.

55. FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*. In: LUND, B. N.; BAIRD-PARKER, T. C.; GRAHAME, W. G. **The microbiological safety and quality of food**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. Vol.II, Cap. 44, p.1178-1232.

56. FARBER, J. M.; SANDERS, G. W.; JOHNSTON, M. A. A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.52, n.7, p.456-458, July, 1989.

57. FENG, P. Rapid methods for detecting foodborne pathogens. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual**, 8th. Gaithersburg: AOAC International, 2001. Appendix 1. Disponível em: www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html. Acesso em: 17/08/01.

58. FENLON, D. R.; STEWART, T.; DONACHE, W. The incidence, numbers and types of *Listeria monocytogenes* isolated from farm bulk tank milks. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.20, n.1, p. 57-60, Jan., 1995.

59. FIGUEIREDO, E. A. T. **Ocorrência do gênero *Listeria* e avaliação da diversidade genética de *Listeria monocytogenes* através do random amplified polymorphic DNA (RAPD) e sua distribuição em linha de processamento de leite pasteurizado tipo "C"**. São Paulo, 2000. 100p. Tese (Doutor em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

60. FLEMING, D. W.; COCHI, S. L.; MAC DONALD, K. L.; BRONDUM, J.; HAYES, P. S.; PLIKAYTIS, B. D.; HOIMES, M. B.; AUDURIER, A.; BROOME, C. V.; REINGOLD, A. L. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of

listeriosis. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v.312, n.7, p. 404-407, Feb., 1985.

61.FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. Fresh acid-curd cheese varieties. In: FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. Cap. 16, p.363-387.

62.FRYE, D. M.; ZWEIG, R.; STURGEON, J.; TORMEY, M.; LeCAVALIER, M.; LEE, I.; LAWANI, L.; MASCOLA, L. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with delicatessen meat contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.35, n.10, p.943-949, Oct., 2002.

63.FURLANETTO, S. M.; SANTOS, M. A. A.; HARA, C. *Listeria* spp. Avaliação da eficiência de quatro meios de plaqueamento no seu isolamento. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.10, n.46, p.30-34, nov./dez., 1996.

64.FURRER, B.; CANDRIAN, U.; HOEFELEIN, Ch.; LUETHY, J. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by *in vitro* amplification of haemolysin gene fragments. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.70, n.5, p. 372-379, May, 1991.

65.FURTADO, M. M.; SOUZA, H. M.; MUNCK, A. V. A fabricação do queijo Minas frescal sem o emprego de culturas lácticas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, p.15-21, jan.-fev., 1980a.

66.FURTADO, M. M.; WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; MUNCK, A. V.; SOUZA, H. M. Estudo conclusivo à respeito da fabricação do queijo Minas frescal por diferente processos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, p.13-16, mar.-abr., 1980b.

67.GABIS, D. A.; FLOWERS, R. S.; EVANSON, D.; FAUST, R. E. A survey of 18 dry dairy processing plant environments for *Salmonella*, *Listeria* and *Yersinia*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 52, n.2, p.122-124, Feb., 1989.

68. GARRITY, G. M.; WINTERS, M.; SEARLES, D. B. Taxonomic outline of the procaryotic genera. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Ed. 2001. Disponível em: <http://www.cme.msu.edu/bergeys/april2001-genus.pdf>.
69. GAULIN, C.; RAMSAY, D.; RINGUETTE, L.; ISMAÏL, J.; First documented outbreak of *Listeria monocytogenes* in Quebec, 2002. **Canada Communicable Disease Report**, v.29, n.21, Nov., 2003. Disponível em: hc-sc.gc.ca/pphb-dgspsp/publicat/ccdr-rmtc/03vol29/dr2921ea.html. Acesso em: 26/02/04.
70. GEDDE, M. M.; HIGGINS, D. E.; TILNEY, L. G.; PORTNOY, D. A. Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, Washington, v.68, n.2, p.999-1003, Feb., 2000.
71. GENIGEORGIS, C. A.; DUTULESCU, D.; GARAYZABAL, F. J. Prevalence of *Listeria* spp. in poultry meat at the supermarket and slaughterhouse. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.52 n.9, p. 618-624, Sept., 1989.
72. GENIGEORGIS, C. A.; OANCA, P.; DUTULESCU, D. Prevalence of *Listeria* spp. in turkey meat at the supermarket and slaughterhouse level. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.53, n.4, p. 282-288, Apr., 1990.
73. GENIGEORGIS, C.; TOLEDO, J.H.; GARAYZABAL, F. J. Selected microbiological and chemical characteristics of illegally produced and marketed soft Hispanic-style cheeses in California. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.54, n.8, p. 598-601, Aug., 1991.
74. GILOT, P.; HERMANS, C.; YDE, M.; GIGI, J.; JANSSENS, M.; GENICOT, A.; ANDRÉ, P.; WAUTERS, G. Sporadic case of listeriosis associated with the consumption of a *Listeria monocytogenes*-contaminated 'Camembert' cheese. **Journal of Infection**, v. 35, p.195-197, 1997.
75. GIOVANNACCI, I.; RAGIMBEAU, C.; QUEGUINER, S.; SALVAT, G.; VENDEUVRE, J.-L.; CARLIER, V.; ERMEL, G. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and

molecular epidemiology. **International of Food Microbiology**, Amsterdam, v.53, n.2-3, p.127-140, Dec., 1999.

76. GLASER, P.; FRANGEUL, L.; BUCHRIESER, C.; RUSNIOK, C.; AMEND, A.; BAQUERO, F.; BERCHE, P.; BLOECKER, H.; BRANDT, P.; CHAKRABORTY, T.; CHARBIT, A.; CHETOUANI, F.; COUVÉ, E.; DARUVAR, A.; DEHOUX, P.; DOMANN, E.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; DUCHAUD, E.; DURANT, L.; DUSSURGET, O.; ENTIAN, K.-D.; FSIHI, H.; GARCIA-DEL PORTILLO, F.; GARRIDO, P.; GAUTIER, L.; GOEBEL, W.; GÓMEZ-LÓPEZ, N.; HAIN, T.; HAUF, J.; JACKSON, D.; JONES, L.-M.; KAERST, U.; KREFT, J.; KUHN, M.; KUNST, F.; KURAPKAT, G.; MADUEÑO, E.; MAITOURNAM, A.; MATA VICENTE, J.; NG, E.; NEDJARI, H.; NORDSIEK, G.; NOVELLA, S.; DE PABLOS, B.; PÉREZ-DÍAZ, J.-C.; PURCELL, R.; REMMEL, B.; ROSE, M.; SCHLUETER, T.; SIMOES, N.; TIERREZ, A.; VÁZQUEZ-BOLAND, J.-A.; VOSS, H.; WEHLAND, J.; COSSART, P.

Comparative genomics of *Listeria* species. **Science**, v.294, p.849-852, Oct., 2001.

77. GOLDFINE, H.; BANNAM, T.; JOHNSTON, N. C.; ZÜCKERT, W. R. Bacterial phospholipases and intracellular growth: the two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, Oxford, v.84, 7S-14S, 1998.

78. GOLDFINE, H.; WADSWORTH, S. J. Macrophage intracellular signaling induced by *Listeria monocytogenes*. **Microbes and Infection**, Amsterdam, v.4, p.1335-1343, 2002.

79. GOMBAS, D. E.; CHEN, Y.; CLAVERO, R. S.; SCOTT, V. N. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.55, n.4, p.559-569, Apr., 2003.

80. GOULET, V.; JACQUET, C.; VAILLANT, V.; REBIÈRE, I.; MOURET, E.; LORENTE, C.; MAILLOT, E.; STAÏNER, F.; ROCOURT, J. Listeriosis from consumption of raw-milk cheese. **The Lancet**, London, v.345, n.8964, p.1581-1582, June, 1995.

81. GRAVES, L. M.; SWAMINATHAN, B.; HUNTER, S. B. Subtyping *Listeria monocytogenes*. In: RYSER E.T.; MARTH, E. H. **Listeria, Listeriosis, and Food Safety**. 2nd Ed. New York: Marcel Dekker, 1999. Cap.9, p.279-297.
82. GUAN, J.; LEVIN, R. E. Quantitative detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef by the polymerase chain reaction. **Food Microbiology**, London, v.19, n.2/3, p.159-165, Apr.-June, 2002.
83. HARVEY, J.; GILMOUR, A. Occurrence of *Listeria* species in raw milk and dairy products produced in Northern Ireland. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.72, p.119-125, 1992.
84. HEITMANN, M.; GERNER-SMIDT, P.; HELTBERG, O. gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in a private day-care facility. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.16, n.8, p.827-828, Aug., 1997.
85. HENDRICKSON, W. G.; MISRA, T. K. Nucleic acid analysis. In: GERHARDT, P.; MURRAY, R. G. E.; WOOD, W. A.; KRIEG, N. R. **Methods for general and molecular bacteriology**. Washington: American Society for Microbiology, 1994. Cap. 20, p.436-460.
86. HITCHINS, A.D. *Listeria monocytogenes*. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual**, 8th. Revisão A. Gaithersburg: AOAC International, 1998. Cap. 10, p.10.01-10.13.
87. HOFFMAN, A. D.; GALL, K. L.; NORTON, D. M.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* contamination patterns for the smoked fish processing environmental and for raw fish. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.66, n.1, p.56-60, Jan., 2003.
88. HOFFMAN, A.; WIEDMANN, M. Comparative evaluation of culture and BAX polymerase chain reaction-based detection methods for *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in environmental and raw fish samples. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.64, n.10, p.1521-1526, Oct., 2001.

89. HOLT, J. G.; KRIEY, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STANLEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9 Ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. Group 19, p. 565-570.
90. HUDSON, W. R.; MEAD, G. C. *Listeria* contamination at a poultry processing plant. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.9 n.6, p. 211-214, Dec., 1989.
91. HURD, S.; PHAN, Q.; HADLER, J.; MACKENZIE, B.; LANCE-PARKER, S.; BLAKE, P.; DEASY, M.; RANKIN, J.; FRYE, D.; LEE, I.; WERNER, B.; VUGIA, D.; BIDOL, S.; STOLTMAN, G.; BOULTON, M.; WIEDMANN, M.; KORNSTEIN, L.; REDDY, S.; MOJICA, B.; GUIDO, F.; HUANG, A.; VICENT, C.; BUGENHAGEN, A.; CORBY, J.; CARLONI, E.; HOLCOMB, M.; KONDRACKI, S.; WORON, R.; ZANSKY, S.; SMITH, P.; DOWDLE, G.; NICOLS, C.; SMITH, F.; GERBER, D.; JONES, T.; MOORE, W.; AHRABI-FARD, S.; DAVIS, J.; Multistate outbreak of listeriosis – United States, 2000. **Morbidity Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.49, n.50, p.1129-1130, Dec., 2000.
92. IRETON, K.; COSSART, P. Host-pathogen interactions during entry and actin-based movement of *Listeria monocytogenes*. **Annual Review of Genetics** v.31, p.113-138, Dec., 1997.
93. JACQUET, C.; CATIMEL, B.; BROSCHE, R.; BUCHRIESER, C.; DEHAUMONT, P.; GOULET, V.; LEPOUTRE, A.; VEIT, P.; ROCOURT, J. Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n.6, p.2242-2246, June, 1995.
94. JACQUET, C.; ROCOURT, J.; REYNAUD, A. Study of *Listeria monocytogenes* contamination in dairy plant and characterization. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.20, n.1, p.13-22, Oct., 1993.
95. JENSEN, N. E.; AARESTRUP, F. M.; JENSEN, J.; WEGENER, H. C. *Listeria monocytogenes* in bovine mastitis. Possible implication for human health. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 32, n.1,2, p. 209-216, Sept., 1996.

96. JEFFERS, G. T.; BRUCE, J. L.; McDONOUGH, P. L.; SCARLETT, J.; BOOR, K. J.; WIEDMANN, M. Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. **Microbiology**, v.147, p.1095-1104, May, 2001.
97. JINNEMAN, K. C.; HUNT, J. M.; EKLUND, C. A.; WERNBERG, J. S.; SADO, P. N.; JOHNSON, J.M.; RICHTER, R. S.; TORRES, S. T.; AYOTTE, E.; ELIASBERG, S. J.; ISTAFANOS, P.; BASS, D.; KEXEL-CALABRESA, N.; LIN, W.; BARTON, C. N. Evaluation and interlaboratory validation of a selective agar for phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity using a chromogenic substrate to detect *Listeria monocytogenes* from foods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.66, n.3, p.441-445, Mar., 2003.
98. JOHANSSON, T.; RANTALA, L.; PALMU, L.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Occurrence and typing of *Listeria monocytogenes* strains in retail vacuum-packet fish products and in a production plant. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.47, n.1-2, p.111-119, Mar., 1999.
99. KABUKI, D.Y. **Contagem de *Listeria* spp. pelo método do Número Mais Provável, avaliação de sua ocorrência em carnes de frango e da eficiência de sanitizantes na redução da contaminação por *L. monocytogenes*.** Campinas, Tese (Mestre em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 142p., 1997.
100. KARPÍSKOVÁ, R.; PEJCHALOVA, M.; MOKROSOVÁ, J.; VYTRASOVÁ, J.; SMUHANOVÁ, P.; RUPRICH, J. 2000. Application of a chromogenic medium and the PCR methods for the rapid confirmation of *Listeria monocytogenes* in foodstuffs. **Journal of Microbiological Methods**, v. 41, p.267-271, 2000.
101. KERR, K. G.; DEALLER, S. F.; LACEY, R. W. Materno-fetal listeriosis from cook-chill and refrigerated food. **The Lancet**, London, v.2, n.8620, p. 1133, Nov., 1988.

102. KESSEL, J. S.; KARNS, J. S.; PERDUE, M. L. Using a portable real-time PCR assay to detect *Salmonella* in raw milk. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.66, n.10, p.1762-1767, Oct., 2003.
103. KLAUSNER, R. B.; DONNELLY, C. W. Environmental sources of *Listeria* and *Yersinia* in Vermont dairy plants. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.54, n.8, p.607-611, Aug., 1991.
104. KOCKS, C.; GOUIN, E.; TABOURET, M.; BERCHE, P.; OHAYON, H.; CAOSSART, P. *Listeria monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. **Cellular**, v.68, p.521-531, Feb., 1992.
105. KOSIKOWSKI, F. New cheese-making procedures utilizing ultrafiltration. **Food Technology**, Chicago, v.40, n.6, p.71-77, June, 1986.
106. KOSIKOWSKI, F. V.; MISTRY, V. V. Latin American cheeses. In: KOSIKOWSKI, F. V.; MISTRY, V. V. **Cheese and fermented milk foods**. 3rd Ed. Westport: Edwards Brothers, 1997a. Vol. I, Cap. 10, p.162-173.
107. KOSIKOWSKI, F. V.; MISTRY, V. V. Latin American cheeses. In: KOSIKOWSKI, F. V.; MISTRY, V. V. **Cheese and fermented milk foods**. 3rd Ed. Westport: Edwards Brothers, 1997b. Vol. II, Cap. 6, p.55-60.
108. KOSIKOWSKI, F. V.; MISTRY, V. V. Ultrafiltration, microfiltration and nanofiltration. In: KOSIKOWSKI, F. V.; MISTRY, V. V. **Cheese and fermented milk foods**. 3rd Ed. Westport: Edwards Brothers, 1997c. Vol. I, Cap. 29, p.500-519.
109. KUHN, M.; GOEBEL, W. Pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. In: RYSER E.T.; MARTH, E. H. **Listeria, Listeriosis, and Food Safety**. 2nd Ed. New York: Marcel Dekker, 1999. Cap.5, p.97-130.
110. LAWRENCE, L. M.; GILMOUR, A. Incidence of *Listeria* spp, and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environment and in poultry products and their rapid confirmation by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.12, p. 4600-4604, Dec., 1994.

111. LAWRENCE, L. M.; GILMOUR, A. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from poultry products and from poultry-processing environment by random amplification of polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.6, p. 2139-2144, June, 1995.
112. LINNAN, M. J.; MASCOLA, L.; LOU, X. D.; GOULET, V. MAY, S. SALMINEN, C.; HIRD, D. W.; YONEKURA, M. L.; HAYES, P.; WEAVER, R.; AUDURIER, A.; PLIKAYTIS, B. D.; FANNIN, S. L.; KLEKS, A.; BROOME, C. V. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v.319, n.13, p. 823-828, Sept., 1988.
113. LONCAREVIC, S.; DANIELSSON-THAM, M. L. D.; THAM, W. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft and semi-soft cheeses in retail outlets in Sweden. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.26, n.2, p.245-250, Jul., 1995.
114. LONGHI, C.; MAFFEO, A.; PENTA, M.; PETRONE, G.; SEGANTI, L.; CONTE, M. P. Detection of *Listeria monocytogenes* in Italian-style soft cheeses. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p.879-885, 2003.
115. LOUIE, M.; JAYARATNE, P.; LUSHSINGER, I.; DEVENISH, J.; YAO, J.; SCHELECH, W.; SIMOR, A. Comparison of ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.34, n.1, p.15-19, Jan., 1996.
116. LUND, A. M.; ZOTTOLA, E. A.; PUSCH, D. J. Comparison of methods for isolation of *Listeria* from raw milk. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 54, n. 8, p.602-606, Aug., 1991.
117. LUNDÉN, J. M.; AUTIO, T. J.; SJÖBERG, A.-M. KORKEALA, H. J. Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.66, n.11, p.2062-2069, Nov., 2003.

118. LYYTIKÄINEN, O.; AUTIO, T.; MAIJALA, R.; RUUTU, P.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; MIETTINEN, M.; HATAKKA, M.; MIKKOLA, J.; ANTTILA, V.-J.; JOHANSSON, T.; RANTALA, L.; AALTO, T.; KORKEALA, H.; SIITONEN, A. An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. **The Journal of Infectious Diseases**, v.181, n.5, p.1838-1841, May, 2000.
119. MARQUIS, H.; DOSHI, V.; PORTNOY, D. A. The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O-independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. **Infection and Immunity**. Washington, v.63, n.11, p.4531-4534, Nov., 1995.
120. MARTH, E. H. Disease characteristics of *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, Chicago, v.42, n.4, p. 165-168, Apr., 1988.
121. McCLAIN, D. & LEE, W.H. FSIS Method for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from processed meat and poultry products. Laboratory Communication n 57. Revised May 24, 1989. USDA FSIS, Beltsville, M. D., 1989. [Modifications to FSIS procedure for *Listeria monocytogenes*. Feb. 8, 1994].
122. Mc LAUCHLIN, J. *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.63, n.1, p. 1-11, July, 1987.
123. Mc LAUCHLIN, J. The role of the Public Health Laboratory Service in England and Wales in the investigation of human listeriosis during the 1980s and 1990s. **Food Control**, Oxford, v.7, n. 4/5, p. 235-240, Aug./Oct., 1996.
124. Mc LAUCHLIN, J.; GRENEWOOD, M. H.; PINI, P. N. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese from a manufacturer associated with a case of listeriosis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.10, p.255-262, 1990.
125. McLAUCHLIN, J.; SAUNDERS, N. A.; RIDLEY, A. M.; TAYLOR, A. G. Listeriosis and foodborne transmission. **The Lancet**, London, v.1, n.8578, p. 177-178, Jan., 1988.

126. MENENDEZ, S.; GODINEZ, M.A. R.; RODRIGUEZ-OTERO, J. L.; CENTENO, J.A. Removal of *Listeria* spp. in a cheese factory. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v.17, n.2, p.133-139, Sep., 1997.
127. MENGAUD, J.; VICENTE, M.-F.; CHENEVERT, J.; PEREIRA, J. M.; GEOFFROY, C.; GICQUEL-SANZEL, B.; BAQUERO, F.; PEREZ-DIAZ, J. C.; COSSART, P. Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 56, n.4, p.766-772, Apr., 1988.
128. MICHEL, E.; COSSART, P. Physical map of the *Listeria monocytogenes* chromosome. **Journal of Bacteriology**, v.174, n.22, p.7098-7103, Nov., 1992.
129. MIETTINEN, M. K.; BJÖRKROTH, K. J.; KORKEALA, H. J. Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.46, n.3, p.187-192, Feb., 1999a.
130. MIETTINEN, M. K.; SIITONEN, A.; HEISKANEN, P.; HAAJANEN, H.; BJÖRKROTH, K. J.; KORKEALA, H. J. Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, n.7, p.2358-2360, July, 1999b.
131. MORIISHI, K.; TERAOKA, M.; KOURA, M.; INOUE, S. Sequence analysis of the *actA* gene of *Listeria monocytogenes* isolated from human. **Microbiology and Immunology**, v.42, p.129-132, 1998.
132. MOURA, S. M.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M. Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.19, n.3, p. 229-237, Aug., 1993.
133. NADON, C. A.; WOODWARD, D. L.; YOUNG, C.; RODGERS, F. G.; WIEDMANN, M. Correlations between molecular subtyping and serotyping of

Listeria monocytogenes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, n.7, p.2704-2707, July, 2001.

134. NALDINI, M. C. **Comportamento diferencial de *Listeria monocytogenes* em queijos Minas frescal elaborados pelo método convencional e por acidificação direta**. Campinas, 2002. 72p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2002.

135. NELSON, J. H. Where are *Listeria* likely to be found in dairy plants? **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.10, n.6, p. 344-345, June, 1990.

136. NESBAKKEN, T.; KAPPERUD, G.; CAUGANT, D. A. Pathways of *Listeria monocytogenes* contamination in the meat processing industry. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.31, n.1-3, p.161-171, Aug., 1996.

137. NORTON, D. M.; McCAMEY, M. A.; BOOR, K. J.; WIEDMANN, M. Application of the BAX for screening/genus *Listeria* polymerase chain reaction system for monitoring *Listeria* species in cold-smoked fish and in the smoked fish processing environment. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.63, n.3, p.343-346, Mar., 2000.

138. NORTON, D. M.; McCAMEY, M. A.; GALL, K. L.; SCARLETT, J. M.; BOOR, K. J.; WIEDMANN, M. Molecular studies on the ecology of *Listeria monocytogenes* in the smoked fish processing industry. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.1, p.198-205, Jan., 2001a.

139. NORTON, D. M.; SCARLETT, J. M.; HORTON, K.; SUE, D.; THIMOTHE, J.; BOOR, K. J.; WIEDMANN, M. Characterization and pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* isolates from the smoked fish industry. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.2, p.646-653, Feb., 2001b.

140. NOTERMANS, S. H. W.; DUFRENNE, J.; LEIMEISTER-WÄCHTER, M.; DOMANN, E.; CHAKRABORTY, T. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria*

species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.9, p.2666-2670, Sept., 1991.

141. O'CONNOR, L.; JOY, J.; KANE, M.; SMITH, T.; MAHER, M. Rapid polymerase chain reaction DNA probe membrane-based assay for the detection of *Listeria* and *Listeria monocytogenes* in food. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.63, n.3, p.337-342, Mar., 2000.

142. OJENIYI, B.; WEGENER, H. C.; JENSEN, N. E.; BISGAARD, M. *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products: epidemiological investigations in seven Danish abattoirs. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.80, n.4. p. 395-401, Apr., 1996.

143. PAGOTTO, F.; DALEY, E.; FARBER, J.; WARBURTON, D. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. In: CANADA. Health Products and Food Branch. **Compendium of analytical methods: laboratory procedures of microbiological analytical of foods**, [MFHPB 30]. Ottawa. 2001. Disponível em: www.hc-sc.gc.ca/food-aliment. Acesso em: 13/02/2003.

144. PERESI, J. T. M.; GRACIANO, R. A. S.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; LIMA, S. I. de; RIBEIRO, A K.; CARVALHO, I. S.; LIMA, M. de. Queijo Minas frescal artesanal e industrial. Qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 83, p.63-70, abr., 2001.

145. PHELAN, J. A.; RENAUD, J.; FOX, P.F. Some non-European cheese varieties. In: FOX, P.F. (Ed.). **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. 2nd Ed., Gaithersburg: Aspen Publishers, 1999. Cap.14, p.421-465.

146. PINI, P. N.; GILBERT, R.J. The occurrence in the U.K. of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.6, n.4, p. 317-326, June, 1988.

147. PRITCHARD, T. J.; BELIVEAU, C. M.; FLANDERS, K. J.; DONNELLY, C.W. Increased incidence of *Listeria* species in dairy processing plants having adjacent

farm facilities. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.57, n.9, p.770-775, Sept., 1994.

148. PRITCHARD, T. J.; FLANDERS, K. J.; DONNELLY, C.W. Comparison of the incidence of *Listeria* on equipment versus environmental sites within dairy processing plants. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.26, n.3, p.375-384, Aug., 1995.

149. PORTO, E.; EIROA, M. N. V. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in vegetables. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Des Moines, v.21, n.4, p.282-286, Apr., 2001.

150. RASMUSSEN, O. F.; BECK, T.; OLSEN, J. E.; DONS, L. ROSSEN, L. *Listeria monocytogenes* isolates can be classified into two major types according to the sequence of the listeriolysin gene. **Infection and Immunity**, Washington, v.59, n.11, p.3945-3951, Nov., 1991.

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

152. RESTAINO, L.; FRAMPTON, E. W.; IRBIE, R. M.; SCHABERT, G.; SPITZ, H. Isolation and detection of *Listeria monocytogenes* using fluorogenic and chromogenic substrates for phosphatidilinositol-specific phospholipase C. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.62, n.3, p.224-252, Mar., 1999.

153. RIEDO, F. X.; PINNER, R. W.; TOSCA, M. L.; CARTER, 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. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.170, n.10, p. 693-696, Sep., 1994.

154. ROCOURT, J.; WEHMEYER, U.; STACKEBRANDT, E. Transfer of *Listeria denitrificans* to a new genus, *Jonesia* gen. Nov., *Jonesia denitrificans* comb. nov.

International Journal of Systematic Bacteriology. Washington, v.37, n.3, p.266-270, July, 1987.

155. ROCOURT, J. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: RYSER, E. T.; MARTH, E. H. **Listeria, listeriosis, and food safety**. 2nd. New York: Marcel Dekker, Inc., 1999. Cap. 1, p.1-20.

156. ROCOURT, J.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T.J. **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**, ASM Press, Washington D.C. 1997. cap. 18 p.337-352.

157. RODRIGUES, D. A. **Listeria sp e Listeria monocytogenes em indústria processadora de Nuggets de frango: Estudo de ocorrência e avaliação de metodologias de análise**. São Paulo, 1999. 104p. Dissertação (Mestre em Ciências de Alimentos - área de bromatologia) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

158. RORVIK, L. M.; AASE, B.; ALVESTAD, T.; CAUGANT, D. A. Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in seafoods and seafood-processing plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.11, p.4779-4784, Nov., 2000.

159. RORVIK, L. M.; CAUGANT, D. A.; YNESTAD, M. Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and others *Listeria* in a salmon slaughterhouse. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.25, n.1, p.19-27, Mar., 1995.

160. RORVIK, L. M.; YNESTAD, M. *Listeria monocytogenes* in foods in Norway. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.13, n.2, p. 97-104, June, 1991.

161. RYSER, E. T. Foodborne listeriosis. In: RYSER, E.T.; MARTH, E. H. **Listeria, Listeriosis, and Food Safety**. 2nd Ed. New York: Marcel Dekker, 1999. Cap.10, p.299-358.

162. RYSER, E. T.; DONNELLY, C. W. *Listeria*. In: DOWNERS, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4th Ed. Washington: American Public Health Association, 2001. Cap. 36, p.343-356.
163. RYSER E.T.; MARTH, E. H. ***Listeria*, Listeriosis, and Food Safety**. 1st Ed. New York: Marcel Dekker, 1991.
164. SANAA, M.; POUTREL, B.; MENARD, J. L.; SERIEYS, F. Risk factors associated with contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* in dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.76, n.10, p.2891-2898, Oct., 1993.
165. SALTIERAL, J. A.; ALVAREZ, V. B.; GARCIA, B. Presence of *Listeria* in Mexican cheeses. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v.19, n.4, p.241-247, Dec., 1999.
166. SAMMARCO, M. L.; RIPABELLI, G.; RUBERTO, A.; IANNITTO, G.; GRASSO, G. M. Prevalence of Salmonellae, Listeriae, and Yersiniae in the slaughterhouse environmental and on work surfaces, equipment, and workers. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.60, n.4, p.367-371, Apr., 1997.
167. SCHLECH, W. F.; LAVIGNE, P. M.; BORTOLUSSI, R. A.; ALLEN, A. C.; HALDANE, E. V.; WORT, A. L.; HIGHTOGER, A. W.; JOHNSON, S. E.; KING, S. H.; NICHOLLS, E. S.; BROOME, C. V. Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v.308, n.4, p.203-206, Jan., 1983.
168. SEELIGER, H.P.R.; JONES, D. Genus *Listeria*. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v. 2, p.1235-1245.
169. SHANK, F.R.; ELLIOT, E.L.; WACHSMUTH, I.K. & LOSIKOFF, M.E. US position on *Listeria monocytogenes* in foods. **Food Control**, Oxford, v.7, n. 4/5, p. 229-234, Aug./Oct., 1996.
170. SILVA, I. M. M.; ALMEIDA, R. C.C.; ALVES, M. A. O.; ALMEIDA, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas

frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.81, n.3, p.241-248, Mar., 2003.

171. SILVA, M. C. D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.61, n.3, p.354-356, Mar., 1998.

172. SLADE, P. J.; COLLINS-THOMPSON, D. L. Enumeration of *Listeria monocytogenes* in raw milk. **Letter in Applied Microbiology**, Oxford, v.6, n.5, p. 121-123, May, 1988.

173. STEWART, D.; GENDEL, S. M. Specificity of the BAX polymerase chain reaction system for detection of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v.81, n.4, p.817-823, 1998.

174. SUTHERLAND, P.; PORRIT, R. Dissemination and ecology of *Listeria monocytogenes* in Australian dairy factory environments. **Food Australia**, Waterloo, v.48, n.4, p. 172, 174-176, 178, Apr., 1996.

175. TAPPERO, J. W.; SCHUCHAT, A.; DEEVER, K. A.; MASCOLA, L.; WENGER, J. D.; LISTERIOSIS STUDY GROUP. Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.273, n.14, p.1118-1122, Apr., 1995.

176. TILNEY, L. G.; PORTNOY, D. A. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. **The Journal of Cell Biology**, v. 109, n.4, p.1597-1608, Oct., 1989.

177. TORRES, N.; CHANDAN, R. C. Latin American White Cheese – a review. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.64, n.3, p.552-557, Mar., 1981.

178. TROTT, D. J.; ROBERTSON, I. D.; HAMPSON, D. J. Genetic characterisation of isolates of *Listeria monocytogenes* from man, animals and food. **Journal of Medical Microbiology**, v.38, p.122-128, 1993.

179. UNNERSTAD, H.; BANNERMAN, E.; BILLE, J.; DANIELSSON-THAM, M.L.; WAAK, E.; THAM, W. Prolonged contamination of a dairy with *Listeria monocytogenes*. **Netherlands Milk & Dairy Journal**, v.50, p.493-499, 1996.
180. VAN DENDER, A. G. F.; MASSAGUER-ROIG, S.; CAMPOS, S. D. S. Alterações físico-químicas e vida de prateleira do queijo Minas frescal tradicional e fabricado pelo método MMV. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 1998, Juiz de Fora. **Anais**. Juiz de Fora: EPAMIG/ELCT, 1998. p. 67-82.
181. VAN HEKKEN, D. L.; FARKYE, N. Y. Hipanic cheeses: the quest for queso. **Food Technology**, Chicago, v. 57, n.1, p.32-38, Jan., 2003.
182. VAN NETTEN, P.; PERALES, I.; VAN DE MOOSDIJK, A.; CURTIS, G. D. W.; MOSSEL, D. A. A liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.8, n.4, p. 299-316, July, 1989.
183. VÁZQUEZ-BOLAND, J. A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMÍNGUES-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinats. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.14, n.3, p.584-640, July, 2001.
184. VIEIRA, M. A. S. V. **Controle de *Listeria monocytogenes* Scott A em queijo Minas frescal através de tratamento termoquímico**. Campinas, 2000. 195p. Tese (Doutor em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
185. VIEIRA, S. D. A.; GOUDEDRANCHE, H.; DUCRUET, P.; MAUBOIS. J.L. Parâmetros para a fabricação de queijo Minas frescal por meio de ultrafiltração. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.39, n.235, p.53-58, set./out., 1984.
186. VINES, A.; REEVES, M. W.; HUNTER, S.; SWAMINATHAN, B. Restriction fragment length polymorphism in four virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes*. **Res. Microbiology**, v.143, n.3, p.281-294, Mar-Apr., 1992.

187. VINES, A.; SWAMINATHAN, B. Identification and characterization of nucleotide sequence differences in three virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes* strains representing clinically important serotypes. **Current Microbiology**, New York, v.36, p.309-318, 1998.
188. VOGEL, B. F.; HUSS, H. H.; OJENIYI, B.; AHRENS, P.; GRAM, L. Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n.6, p.2586-2595, June, 2001.
189. WAAK, E.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M. L. Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.7, p.3366-3370, July, 2002.
190. WALKER, R. L.; JENSEN, L. H.; KINDE, H.; ALEXANDER, A. V.; OWENS, L. S. Environmental survey for *Listeria* species in frozen milk product plants in California. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.54, n.3, p. 178-182, Mar., 1991.
191. WENGER, J.D.; SWAMINATHAN, B.; HAYES, P.S.; GREEN, S. S.; PRATT, M.; PINNER, R. W.; SCHUCHAT, A.; BROOME, C. V. *Listeria monocytogenes* contamination of turkey franks: evaluation of a production facility. **Journal of Food Protection**, Ames, V.53, n.12, p.1015-1019, Dec., 1990.
192. WIEDMANN, M. Detection and characterization of *Listeria monocytogenes*. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v.85, n.2, p.494-531, Mar.-Apr., 2002.
193. WIEDMANN, M.; BRUCE, J. L.; KEATING, C.; JOHNSON, A. E.; McDONOUGH, P. L.; BATT, C. A. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potencial. **Infection and Immunity**, Washington, v.65, n.7, p.2707-2716, July, 1997.

194. WONG, H-C.; CHAO, W.-L.; LEE, S-J. Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* in foods available in Taiwan. **Applied an Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n.10, p.3101-3104, Oct., 1990.
195. WONG, S.; STREET, D.; DELGADO, S. I.; KLONTZ, K. C. Recalls of foods and cosmetics due to microbial contamination reported to the U.S. Food and Drug Administration. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.63, n.8, p.1113-1116, Aug., 2000.

CAPÍTULO II

MOLECULAR SUBTYPING AND TRACKING OF *Listeria monocytogenes* IN LATIN-STYLE FRESH CHEESE PROCESSING PLANTS

Este artigo foi escrito conforme as normas de publicação da revista *Journal of Dairy Science*. Alguns detalhes da metodologia são apresentados no apêndice.

O trabalho foi desenvolvido no *Food Safety Laboratory, Department of Food Science, Cornell University, Ithaca, NY, USA*.

Molecular Subtyping and Tracking of *Listeria monocytogenes* in Latin-Style Fresh Cheese Processing Plants

D.Y. Kabuki¹, A.Y. Kuaye¹, M. Wiedmann, and K. J. Boor

Department of Food Science, Cornell University, Ithaca, NY 14853

Corresponding author: Kathryn J. Boor, e-mail: kjb4@cornell.edu

¹Current address: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, BRAZIL

ABSTRACT

Latin-style fresh cheeses, which have been linked to at least two human listeriosis outbreaks in the US, are considered to be high risk foods for *Listeria monocytogenes* contamination. We evaluated *L. monocytogenes* contamination patterns in three Latin-style fresh cheese processing plants to gain a better understanding of *L. monocytogenes* contamination sources in the manufacture of these cheeses. Over a 6-month period, 246 environmental samples were collected and analyzed for *L. monocytogenes* using both the Food and Drug Administration (FDA) method and the Biosynth *L. monocytogenes* detection system (LMDS). Finished cheese samples from the same plants (n=111) were also analyzed by the FDA method, which was modified to include *L. monocytogenes* plating medium (LMPM) and the *L. monocytogenes* confirmatory plating medium (LMCM) used in the LMDS method. *L. monocytogenes* was detected in 6.3% of cheese and 11.0% of environmental samples. Crates, drains and floor samples showed the highest contamination rates with 55.6%, 30.0% and 20.6% *L. monocytogenes* positive samples, respectively. Finished products and food contact surfaces were positive in only one plant. The FDA method showed a higher sensitivity than the LMDS method for detection of *L. monocytogenes* from environmental samples. The addition of LMPM and LMCM media did not further enhance the performance of the FDA method for *L. monocytogenes* detection from finished products. Molecular subtyping (PCR-based allelic analysis of the virulence genes *actA* and *hly* and automated ribotyping) was used to track contamination patterns. Ribotype DUP-1044A, which had previously been linked to a 1998 multistate human listeriosis outbreak in the US, was the most commonly identified subtype (20/36 isolates) and was isolated from two plants. This ribotype was persistent and widespread in one factory, where it was also responsible for the contamination of finished products. We hypothesize that this ribotype may represent a clonal group with a specific ability

to persist in food processing environments. While previous listeriosis outbreaks were linked to Latin-style fresh cheeses made from unpasteurized milk, the presence of this organism in pasteurized cheese products illustrates that persistent environmental contamination also represents an important source of finished product contamination.

(Key words: *Listeria monocytogenes*, Latin-style fresh cheese, molecular subtyping)

Abbreviation key: **BCM** = Biosynth chromogenic medium, **BHI** = Brain Heart Infusion, **CDC** = Centers for Disease Control and Prevention, **EB** = Enrichment Broth, **FDA** = Food and Drug Administration, **LMCM** = *L. monocytogenes* confirmation media, **LMDS** = *L. monocytogenes* detection system, **LMPEB** = *L. monocytogenes* pre-enrichment broth, **PBBA** = Purple Broth Base Agar, **PCR** = polymerase chain reaction, **PFGE** = pulsed-field gel electrophoresis, **LMPM** = *L. monocytogenes* plating medium, **PI-PLC** = phosphatidylinositol phospholipase C, **RAPD** = random amplification of polymorphic DNA, **RFLP** = restriction fragment length polymorphism, **RTE** = ready-to-eat

INTRODUCTION

Listeria monocytogenes is a foodborne pathogen that causes serious invasive disease in humans. The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) estimate that *L. monocytogenes* causes about 2,500 cases and 500 deaths annually in the U.S. (Mead et al., 1999). A variety of different food products, including dairy products, have been implicated in human listeriosis cases and outbreaks (Fleming et al., 1985; Azadian et al., 1989; McLauchlin et al., 1990; Bille, 1990; Farber and Peterkin, 1991; Dalton et al., 1997). In particular, Latin-style fresh cheeses have been responsible for a large human listeriosis outbreak in California in 1985 (Linnan et al., 1988) and more recently, for an outbreak in North Carolina (Anonymous, 2001). Beyond these outbreaks, *L. monocytogenes* also has been isolated from Latin-style fresh cheeses from many different countries (Destro et al., 1991; Genigeorgis et al., 1991; El Marrakchi et al., 1993; Silva et al., 1998; Saltijeral et al., 1999). The term, “Latin-style fresh cheese” represents a heterogenous group of white, unripened soft cheeses, typically bearing between 1.0 – 3.0% salt (Torres and Chandan, 1981). The Latin-style cheese industry is a rapidly expanding segment of the US dairy industry; production of these products increased from ~67 million lbs. in 1996 to 96 million lbs. in 2000 (USDA-NASS, 2002). This sector of the cheese industry is largely comprised of small- and medium-sized operations. For many of these operations, the owners and employees have had little previous commercial food processing experience. Control of *L. monocytogenes* in the manufacture of Latin-style fresh cheeses represents a critical need in the US dairy industry.

Product contamination with *L. monocytogenes* results in serious economic consequences for food processors, including costly product recalls and lawsuits. Dairy products represented the food category most frequently associated with recalls due to microbial contamination reported to the U.S. Food and Drug

Administration (**FDA**) during fiscal years 1994 to 1998 (Wong et al., 2000). During this period, dairy product recalls accounted for 304 (22%) of all food recalls, with *L. monocytogenes* isolated from 64.5% of these products. Since pasteurization efficiently kills *L. monocytogenes*, contamination of finished dairy products, as well as of other ready-to-eat (**RTE**) food products, appears to most commonly originate from post-processing environmental sources. As *L. monocytogenes* is regularly isolated from food and dairy processing environments (Cox et al., 1989; Klausner and Donnelly, 1991; Jacquet et al., 1993; Pritchard et al., 1995; Sutherland and Porritt, 1996), a better understanding of the spread and survival of *L. monocytogenes* in food processing environments and of specific contributions of environmental sources to finished product contamination are needed to develop improved *Listeria* control strategies.

L. monocytogenes isolation and subtyping represent two critical steps in characterizing environmental contamination patterns. Classical culture-based methods for isolating *L. monocytogenes* are time-consuming, typically requiring 5 – 7 days. Recently, differential media based on detection of phosphatidylinositol phospholipase C enzyme (**PI-PLC**) activity have been described and evaluated for isolation of *L. monocytogenes* from food and environmental samples (Restaino et al., 1999; Karpísková et al., 2000, Hoffman and Wiedmann, 2001). PI-PLC is an enzyme that is only produced by *L. monocytogenes* and *L. ivanovii*. *L. ivanovii* is uncommon in foods and food processing environments (Arimi et al., 1997) and can easily be differentiated from *L. monocytogenes* using biochemical tests. The Biosynth *Listeria monocytogenes* detection system (**LMDS**) contains fluorogenic and chromogenic PI-PLC substrates in both the selective enrichment and plating media, which can enable more rapid screening and differentiation of *L. monocytogenes*. The Biosynth-LMDS method should thus allow for more rapid and sensitive detection of *L. monocytogenes* (Restaino et al., 1999) as compared to the

FDA method, which includes the selective media Oxford and PALCAM, which are not differential for *L. monocytogenes*. Molecular typing methods, such as pulsed-field gel electrophoresis (**PFGE**), random amplification of polymorphic DNA (**RAPD**) and ribotyping, provide appropriate tools for tracking bacterial contamination sources throughout food systems (Miettinen et al., 1999; Johansson et al., 1999; Autio et al., 1999; Norton et al., 2001; Hoffman et al., 2003) and also are increasingly used by public health laboratories to detect and track human listeriosis outbreaks (Jacquet et al., 1995; Dalton et al., 1997).

The major goal of this research was to explore the use of different detection strategies and molecular subtyping methods to characterize *L. monocytogenes* contamination patterns in Latin-style fresh cheese processing plants. Our results show that persistent environmental contamination in the processing plant represents a major source of finished product contamination. The persistent presence of *L. monocytogenes* in these operations demonstrates the importance of designing and implementing effective strategies for eliminating environmental *L. monocytogenes* strains in Latin-style fresh cheese and other dairy processing plants.

MATERIALS AND METHODS

Processing plant and sample collection. A total of 357 samples were collected from three Latin-style fresh cheese processing plants located in New York City during four visits to each facility over a 6-month period (June to December 2000). All three plants purchase pasteurized milk for cheese manufacture. Cheeses are manufactured by heat-treating the pre-pasteurized milk, adding rennet and starter culture and/or acidulant (e.g., lactic or acetic acid) to obtain a curd, draining the whey, pressing the curd, followed by milling, salting, molding, and packaging. The plants were selected to represent small to relatively large-scale manufacturers (up to 18,000 gallons of pasteurized milk/day). Plant A is a large manufacturer,

processing between 12,000 - 18,000 gallons per day, plant B manufactures 75 gallons twice a week in a very small processing area, and Plant C, a medium size factory, processes 1,200 gallons per day.

Samples collected included 111 finished products (fresh cheeses) and 246 environmental samples (119 food contact surfaces, 40 floor drains, 34 floors, 38 walls and 15 miscellaneous sampling sites). Food contact surfaces tested included equipment surfaces (coagulation vat, pressing machine, pasteurizer valve, grinder, mixer), stirring tools, a stainless steel container, tables (stainless steel and polytetrafluorethylene), a plastic strainer, a plastic barrel, padding, a plastic connecting tube (used to connect a milk stainless steel pipeline from the holding tank to pasteurizer and from the pasteurizer to the coagulation vat). Whenever possible, environmental samples were collected from the same sites on each visit. Environmental samples were collected using a commercial environmental sponge sampling kit (Bacti Sponge kit, Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA) and a neutralizing buffer (Hardy Diagnostics) to neutralize the chlorine-based sanitizers and quaternary ammonium compounds used in the plants. Cheeses were collected as finished packaged products. All samples were kept refrigerated and were analyzed within 48 h.

***L. monocytogenes* detection.** Finished products were analyzed by the FDA method (Hitchins, 1998), which was modified to also include plating of the enrichments on *L. monocytogenes* plating medium (**LMPM**, Biosynth[®] Biochemica & Synthetica [**BCM**], Naperville, IL) and *L. monocytogenes* confirmation media (**LMCM**, Biosynth[®]) as described by Restaino et al. (1999). Briefly, 25 g samples of cheese were aseptically added to 225 ml of Enrichment Broth (**EB**, Hitchins, 1998) and homogenized in a Stomacher (Seward Ltd., London, UK). The homogenized samples were incubated at 30°C and selective agents were added after 4 h of incubation as described by Hitchins (1998). After 24 and 48 h of incubation,

aliquots from EB were streaked onto Oxford (Difco Laboratories, Detroit, MI), PALCAM (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England) and LMPM. Typical *Listeria*-like colonies from Oxford and PALCAM were purified on Brain Heart Infusion agar (**BHI**, Difco) and screened by PCR as described below to identify *L. monocytogenes* isolates. Typical PI-PLC positive *Listeria*-like colonies from LMPM were streaked onto LMCM and onto purple broth base agar (**PBBA**, Difco) containing 1.0% rhamnose and scored according to the manufacturer's directions and as previously described (Restaino et al., 1999). Isolates confirmed as *L. monocytogenes* were verified as *L. monocytogenes* using the PCR assay described below.

Environmental sponge samples were analyzed using both the FDA method (Hitchins, 1998) and the *Listeria monocytogenes* detection system (**LMDS**, Biosynth®) (Restaino et al., 1999). The sponges were homogenized manually in their bags and were aseptically cut in half; one half was added to 50 ml of EB and the second half was added to 50 ml of *L. monocytogenes* pre-enrichment broth (**LMPEB**, Biosynth®). The sponges were homogenized for 30 s in a Stomacher blender and analyzed following the previously published protocols for the FDA method (Hitchins, 1998) and LMDS (Restaino et al., 1999).

PCR-based identification of *L. monocytogenes*. Four *Listeria*-suspect colonies from each selective agar (Oxford, PALCAM, and/or LMCM) were screened using a *L. monocytogenes* specific PCR assay targeting the *L. monocytogenes* listeriolysin O gene, *hly*, as previously described (Norton et al., 2000).

Virulence gene allele characterization. One *L. monocytogenes* isolate from each selective plating medium was selected for further characterization. Thus, for samples that yielded positive results on all three selective media (Oxford, PALCAM, and/or LMCM) three isolates were further characterized. Virulence gene allele

typing of *actA* and *hly* by **PCR-RFLP** was performed as previously described (Wiedmann et al., 1997). Briefly, *hly* was characterized by PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) using the restriction endonucleases *HhaI* and *HpaII*. One of eight possible allelic types was assigned based upon the resulting restriction pattern. Following amplification of *actA*, one of two possible allelic types (either type “3” or “4”) was assigned based on a PCR product size difference, which corresponds with the presence or absence of a 105 nucleotide region encoding a proline-rich repeat structure (Wiedmann et al., 1997).

Ribotyping. For each sample positive for *L. monocytogenes*, one isolate of each different *actA* and *hly* polymorphic type was selected for ribotype analysis. Ribotyping was performed using the restriction endonuclease *EcoRI* and the RiboPrinter[®] Microbial Characterization System (Qualicon Inc., Wilmington, DE) as described previously (Bruce, 1996). Images were acquired with a charge-coupled device camera and processed using the Riboprinter’s custom software. This software normalizes fragment pattern data for band intensity and relative band position (Bruce, 1996). Ribotype patterns were automatically assigned a DuPont ID (e.g., DUP-1039) by the Riboprinter[®], which was confirmed by visual inspection. If visual inspection found a given DuPont ID included more than one distinct ribotype pattern, which generally differed by position of only a single weak band, then each pattern was designated with an additional alphabetized letter (e.g., DUP-1039A and DUP-1039B).

RESULTS

Occurrence of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* in cheese and environmental samples. Environmental and cheese samples were collected from three processing plants over a total of four visits to each plant. *L. monocytogenes*

was detected in 6.3% of finished product samples and in 11.0% of environmental samples (Table 1). Only finished products from one plant (plant C) were positive for *L. monocytogenes*. Environmental samples from plant A showed a lower frequency of *L. monocytogenes* contamination (4.1%) as compared to plants B and C, which showed contamination frequencies of 14.5 and 15.9%, respectively (Table 1). All three plants showed similar prevalences of *Listeria* spp. in environmental samples (20.0 to 22.7%). Among the environmental samples, *L. monocytogenes* was most commonly isolated from drains (30.0%) and floors (20.6%) (Table 2). Only two food contact surface samples (a plastic connecting tube at the exit of the pasteurizer, which was used to transfer milk to the coagulation vat, and a polytetrafluorethylene table; Table 2) both collected in plant C, were positive for *L. monocytogenes*. Crates were contaminated with *L. monocytogenes* in all three plants (Table 3).

Molecular subtyping. A total of 80 *L. monocytogenes* representing up to three isolates from each positive sample (one isolate from each selective plating media) were initially subtyped using allelic analysis of the virulence genes *actA* and *hly*. Both *actA* types 3 and 4 were identified among the isolates. Although 8 different *hlyA* types exist (Wiedmann et al., 1997), only types 1 and 2 were identified among the isolates collected in this study. With two exceptions, multiple isolates from the same site always displayed the same *hly* and *actA* types. Specifically, sponge samples collected from crates in plant B at visits 2 and 4 each contained two different *actA* and *hly* subtypes (Table 3). Based on these initial subtyping results, 36 representative isolates (one from each positive sample, unless multiple subtypes were observed based on *hly* and *actA* allelic analysis) were selected for further subtyping by automated *EcoRI* ribotyping. Ribotyping discriminated 8 distinct patterns among the 36 isolates (Table 3). Ribotype DUP-1044A/*hly* type 1, *actA* type 4 represented the most commonly isolated subtype (55.6%). Two ribotypes (DUP-1044A and DUP-1062C) were identified among the isolates from plant A,

while five ribotypes (DUP-1042A, DUP-1042C, DUP-1049A, DUP-1062C and DUP-1052) and three ribotypes (DUP-1044A, DUP-1045B and DUP-1039C) were identified in plants B and C, respectively (Table 3).

Evaluation of FDA method and BCM-LMDS. A total of 111 cheese samples were analyzed for *L. monocytogenes* using a modified FDA method, which included plating on Oxford, PALCAM, and LMPM. Both Oxford and PALCAM allowed *L. monocytogenes* isolation from 7 cheese samples, while LMPM allowed *L. monocytogenes* isolation from only 5 of the same samples. Some *L. monocytogenes* do not produce PI-PLC (Notermans et al., 1991), and therefore may produce false negative results on LMPM. However, isolates that had been obtained from samples that yielded positive results on Oxford and PALCAM, but negative results on LMPM, did display PI-PLC production when re-streaked on LMPM.

A total of 246 environmental sponge samples were analyzed using both the FDA method and the LMDS method. Twenty-seven samples were positive for *L. monocytogenes* by one or both methods. The FDA method yielded 23 positive samples, but failed to allow detection of *L. monocytogenes* in four samples that were positive by LMDS. LMDS allowed isolation of *L. monocytogenes* from 13 samples, but did not detect *L. monocytogenes* in 14 samples that were positive by the FDA method (Table 4). The sensitivities of the FDA method and BCM LMDS were thus 85.2% and 48.2%, respectively (Table 4). All isolates that showed reactions typical for *L. monocytogenes* on LMPM and LMCM were confirmed as *L. monocytogenes* by a *hlyA* PCR assay. For the 23 environmental samples that were positive using the FDA method, *L. monocytogenes* was detected in 91.3% (21/23) of the samples after 24 h of enrichment; 20 and 15 samples yielded *L. monocytogenes* on PALCAM and Oxford, respectively. For two samples, *L. monocytogenes* was only isolated after 48 h of enrichment.

DISCUSSION

L. monocytogenes contamination of RTE foods appears to occur predominantly through post-processing contamination from food processing environments (Tompkin, 2002). Therefore, environmental testing is a critical component of *L. monocytogenes* control programs in the dairy and food processing industries (Tompkin, 2002). Data on the efficacy of environmental testing methods and on environmental *L. monocytogenes* and *Listeria spp.* contamination patterns in different food processing systems are crucial for development of science-based regulations to enable better control of this foodborne pathogen at its sources. Fresh Latin-style cheeses have been responsible for at least two human listeriosis outbreaks in the US (Linnan et al., 1988, Anonymous, 2001). We selected three Latin-style fresh cheese processing plants representing different scales of operation to probe environmental *L. monocytogenes* contamination patterns and to explore the use of different detection and subtyping methods to monitor environmental contamination patterns.

***L. monocytogenes* and *Listeria* contamination patterns.** *L. monocytogenes* was isolated from 6.3% of finished product samples and from 11.0% of environmental samples; isolation frequencies varied considerably from plant to plant (Table 1). In 1991, Genigeorgis et al. reported a 2% *L. monocytogenes* prevalence in Latin-style fresh cheeses collected in California. In 2003, Gombas et al. reported a 0.07% prevalence in cheeses tested in Northern California and a 0.28% prevalence in those tested in Maryland. *L. monocytogenes* prevalence in similar products tested in other countries ranged from 3.3 to 41.2% (Destro et al., 1991; El Marrakchi et al., 1993; Furlanetto et al., 1996; Silva et al., 1998; Saltijeral et al., 1999). While cheeses manufactured from raw milk have been reported to bear a higher prevalence of *L. monocytogenes* than cheeses made from pasteurized milk (Genigeorgis et al., 1991, Silva et al., 1998, Saltijeral et al., 1999), our data

demonstrate that *L. monocytogenes* can also be found in products manufactured from pasteurized milk.

L. monocytogenes was found in up to 15.9% of environmental samples collected from the three processing plants studied; highest contamination rates were found from floor drains and floors as well as from crates. These findings are consistent with previous reports, which have also found that drain and floor samples showed the highest prevalence of *L. monocytogenes* among samples collected from dairy processing plants (Klausner and Donnelly, 1991; Pritchard et al., 1995; Sutherland and Porritt, 1996). Our observation that crates from all three plants were at least sporadically positive for *L. monocytogenes* also further confirms that these appliances represent an important potential source of *L. monocytogenes* contamination in dairy processing plants (Sutherland and Porritt, 1996). Crates had multiple possible functions within each plant, thus providing multiple opportunities for the possible spread of *L. monocytogenes* from point to point within a plant. To illustrate, crates were used to transport pasteurized milk packages from cooler rooms to the processing areas; to transport finished products from processing areas to cooler rooms; and to store finished products in the cooler rooms. While *L. monocytogenes* has previously been isolated from dairy industry food contact surfaces (Jacquet et al., 1993; Pritchard et al., 1995; Sutherland and Porritt, 1996), we isolated *L. monocytogenes* from only two food contact surfaces (a connecting plastic tube coming from the pasteurizer and a polytetrafluorethylene table) in one of the three plants included in our study.

When comparing the three processing plants tested in this study, the largest plant (plant A), which had recently been constructed, showed a low incidence of *L. monocytogenes* contamination, comparable to environmental contamination prevalence data for other well-managed ready-to-eat food processing plants. These data indicate that manufacturing of Latin-style fresh cheeses under appropriate

conditions can produce products of comparable safety to other RTE food products. Plant B represents the smallest establishment included in this study. While this plant showed a high frequency of *L. monocytogenes*-positive environmental samples, which are likely associated with the poor design and layout of the facility, no finished product samples were found positive for *L. monocytogenes*. In this factory, the presence of *L. monocytogenes* on the outside of packages containing incoming pasteurized milk revealed a potential route of environmental contamination. Plant C was the only plant in this study that had both *L. monocytogenes* contamination of many environmental sites (Table 3) as well as contamination of finished products, most likely due to post-pasteurization contamination. The plant C plastic food contact surfaces that were positive for *L. monocytogenes* were manufactured using materials that are difficult to sanitize (Krysinski et al., 1992) and that appear to facilitate biofilm formation (Sinde and Carballo, 2000). These findings highlight the importance of using appropriate materials (e.g., stainless steel) and sanitary design for the manufacture of food processing equipment.

Tracking of *L. monocytogenes* contamination patterns by molecular subtyping. Molecular subtyping (allelic analysis of *actA* and *hly* and automated ribotyping) was used to further elucidate *L. monocytogenes* contamination patterns. Initial subtyping using allelic analysis of *actA* and *hly* was used to prescreen isolates when multiple isolates from different enrichment procedures were available for a given sample. While a combination of *actA* and *hly* allelic types provides less sensitive subtype differentiation as compared to more expensive methods such as PFGE or automated ribotyping (Wiedmann, 2002), we reasoned that these methods provide a cost effective alternative for identification of at least some samples that contain multiple *L. monocytogenes* subtypes. In this study, we identified two samples that contained multiple subtypes (Table 3). This finding is consistent with

previous studies, which also described the presence of multiple subtypes within a single sample (Ryser et al., 1996). Clearly, it is possible to under-estimate the true subtype diversity present in a given sample when only a single or limited number of isolates are tested from a sample. Unfortunately, cost considerations currently make it impractical to subtype large numbers of isolates from each positive sample using PFGE or ribotyping, but less expensive screening methods, such as the allele analyses used in this study, may help address this issue.

Analysis of subtyping data revealed persistent contamination with ribotype DUP-1044A in plant C. This subtype was widespread in this plant and was isolated during each of four visits. Although it is difficult to establish directionality of the spread of contamination, the presence of ribotype DUP-1044A in finished products as well as in environmental sites (drains, floors) and food contact surfaces (plastic connecting tube, processing table) indicates probable post-processing contamination of finished products from environmental sources. Jacquet et al. (1993) previously described similar contamination patterns in a cheese manufacturing plant. This group recovered *L. monocytogenes* of the same serovar and phagovar from cheese manufactured with pasteurized milk as well as from processing equipment and shelves, suggesting product contamination during the ripening process. In addition to ribotype DUP-1044A, a second ribotype, DUP-1045B, also persisted in plant C (Table 3). Our findings add to a growing body of evidence implicating persistent *L. monocytogenes* subtypes in food processing plants as a major concern. Sites harboring persistent strains may facilitate the spread of *L. monocytogenes* to down-stream points within the processing environment, and hence may ultimately serve as sources of finished product contamination (Loncarevic et al., 1998; Miettinen et al., 1999; Autio et al., 1999; Norton et al., 2001; Hoffman et al., 2003; Lundén et al., 2003). Interestingly, ribotype DUP-1044A/*actA* type 4/*hly* type 1 strains had been previously associated

with a 1998 multistate human listeriosis outbreak in the US, which was linked to contaminated hot dogs and deli meats (Sauders et al., 2003). It had been postulated that persistent contamination of the processing plant environment after a construction event contributed to this outbreak. We thus hypothesize that DUP-1044A may represent a strain or clonal group that is specifically capable of persisting in food processing environments. In further support of this hypothesis, ribotype DUP-1044A also had been isolated on multiple occasions in two of three smoked fish processing plants tested by Norton et al. (2001).

In plant A, we identified the same ribotype (DUP-1062C) in a cooler room drain and, on a subsequent visit, in a crate used for transport and storage of finished products in the cooler room. This finding may indicate the crate as a vehicle of cross contamination. In this plant, ribotype DUP-1044A was isolated from both a floor and a drain sample collected during the same visit. No ribotypes persisted over more than two visits or at multiple sites in plant A suggesting that persistent *L. monocytogenes* contamination was successfully prevented in this plant. Plant B showed the highest ribotype diversity, with a total of five different ribotypes isolated from this plant. Two different ribotypes persisted in different environmental sites in this plant. Ribotype DUP-1042A was isolated from crates on three separate visits and DUP-1042C was isolated from drain and floor samples on three separate visits. These results further demonstrate the role of molecular subtyping data in environmental monitoring programs to differentiate transient from persistent contamination and to allow development of appropriate control and intervention strategies.

***L. monocytogenes* detection methods.** Detection of *L. monocytogenes* using culture-based methods is time consuming and can be challenging, particularly if *L. monocytogenes* is present in a background of other *Listeria* spp. Other *Listeria* spp. may overgrow *L. monocytogenes* during enrichment (Beumer et al., 1996) and most

selective and differential *Listeria* plating media do not differentiate *L. monocytogenes* from non-pathogenic *Listeria* spp. Thus, specific detection of *L. monocytogenes* relies on phenotypic and biochemical testing of selected *Listeria*-like colonies collected from plating media. Usually only a few isolates (<5) are selected for screening to determine the presence of *L. monocytogenes*; samples with a high *Listeria* spp. to *L. monocytogenes* ratio may thus be scored incorrectly as *L. monocytogenes* negative. The increasing need for economical testing strategies with rapid turn-around times has led to the common use of *Listeria* spp. as an indicator for conditions that may enable the presence of *L. monocytogenes* in the food industry. Our results indicate that environmental testing for *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* are likely to yield different results. For example, all three Latin-style fresh cheese processing plants showed between 20 and 22% prevalence of *Listeria* spp. in environmental samples, which could lead to the hypothesis that similar hygiene and *Listeria* control programs were in place for all three plants. However, one plant had a significantly lower *L. monocytogenes* prevalence (4.1%) as compared to the two other plants (14.5 and 15.9%). Our results thus indicate that the presence of *Listeria* spp. may not be a good predictor of *L. monocytogenes* contamination and that *L. monocytogenes*-specific testing of environmental samples may be a more appropriate strategy for monitoring the effectiveness of *L. monocytogenes* control strategies.

Recently developed and evaluated selective and differential media for *L. monocytogenes* (Restaino et al., 1999) may provide a rapid and less labor-intensive alternative to *Listeria* spp. testing of environmental samples. LMDS represents a complete detection system, including pre-enrichment and enrichment broths and a differential and selective media, which can distinguish *L. monocytogenes* and *L. ivanovii* from other *Listeria* spp. based on PI-PLC production. LMCM (which is also included in LMDS) and PBBA subsequently can distinguish *L. monocytogenes* from

L. ivanovii. We compared the performance of LMDS to the FDA methods for detection of *L. monocytogenes* from 246 environmental samples. The FDA method showed a sensitivity of 85.2% as compared to 48.2% for the LMDS. The LMDS pre-enrichment broth used in our study was an early production batch manufactured before the decision had been made to include the selective agents nalidixic acid or cycloheximide in the medium (Restaino, pers. communication). We suspect that, as a consequence, the *L. monocytogenes* present in the samples that were falsely negative with the LMDS method may have been overgrown by other bacteria. The absence of the selective agents in the batch of media used in our study might explain why our results differ from the findings of Restaino et al. (1999), who showed that LMDS (containing a selective agent) was more sensitive than the USDA method for detecting *L. monocytogenes* from environmental samples collected in meat processing facilities. Additionally, we also evaluated the inclusion of LMPM as a third plating media in the FDA method for detection of *L. monocytogenes* from 111 cheese samples. *L. monocytogenes* was not isolated on LMPM for two of seven samples that yielded *L. monocytogenes* from the FDA-recommended plating media, Oxford and PALCAM. In contrast, in a study using the same three plating media to detect *L. monocytogenes* in 2,000 food and environmental samples, Jinneman et al. (2003) reported that the use of LMPM combined with Oxford or PALCAM media allowed for improved detection of *L. monocytogenes* over use of Oxford and PALCAM, alone.

Conclusions. While at least one previous listeriosis outbreak has been linked to Latin-style fresh cheese manufactured from *L. monocytogenes*-contaminated unpasteurized milk (Linnan et al., 1988), our results show that persistent environmental contamination represents another important source of finished product contamination for these products. Comprehensive environmental monitoring programs for *L. monocytogenes*, including specific testing for *L.*

monocytogenes along with application of molecular subtyping strategies, are required to detect persistent contamination and to monitor the effectiveness of control strategies, which require integration of an effective sanitation program with good manufacturing practices. While *Listeria* spp. testing is often recommended as an indicator for conditions that may enable the presence of *L. monocytogenes*, our results indicate that the presence of *Listeria* spp. may not be a good predictor of *L. monocytogenes* contamination. While additional studies will be required to better understand correlations between *Listeria* positive samples and the presence of *L. monocytogenes*, the further development and refinement of rapid, inexpensive, and easy-to-use detection methods (e.g., chromogenic media) that allow specific detection of *L. monocytogenes* in environmental samples will clearly improve our ability to control this foodborne pathogen in the dairy industry.

ACKNOWLEDGMENTS

D. Y. Kabuki and A. Y. Kuaye were supported by FEA/UNICAMP-FAPESP-Brazil. This project was also supported by the New York State Office of Science, Technology, and Academic Research. We thank Steve Murphy and Sharinne Sukhnanand for help with sample collection and testing.

REFERENCES

- Anonymous. 2001. Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese --- North Carolina, October 2000--January 2001. *MMWR* 50:560-562
- Arimi, S. M., E. T. Ryser, T. J. Pritchard, and C. W. Donnelly. 1997. Diversity of *Listeria* ribotypes recovered from dairy cattle, silage, and dairy processing environments. *J. Food. Prot.* 60:811-816.
- Autio, T., S. Hielm, M. Miettinen, A. M. Sjöberg, K. Aarlisalo, J. Björkroth, T. Mattila-Sandholm. 1999. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:150-155.
- Azadian, B. S., G.T. Finnerty, and A. D. Pearson. 1989. Cheese-borne *Listeria* meningitis in immunocompetent patient. *Lancet* 1:322-323.
- Beumer, R.R., M.C. te Giffel, S.V.R. Anthonie, and L.J. Cox. 1996. The effect of acriflavin and nalidixic acid on the growth of *Listeria* spp. in enrichment media. *Food Microbiol.* 13:137-148
- Bille, J. 1990. Epidemiology of human listeriosis in Europe with special reference to the Swiss outbreak. p.71-74. *In*: Miller, A. J., J. L. Smith, G. A. Somkuti (ed.), *Foodborne listeriosis*. Elsevier, New York, NY.
- Bruce, J. 1996. Automated system rapidly identifies and characterizes microorganisms in food. *Food Technol.* 50:77-81.
- Cox, L. J., T. Kleiss, J. L. Cordier, Cordellanac, P. Konkel, C. Pedrazzini, R, Beumer, and A. Siebenga. 1989. *Listeria* spp in food processing, non-food, and domestic environments. *Food Microbiol.* 6:49-61.
- Dalton, C. B., C. C. Austin, J. Sobel, P. S. Hayes, W. F. Bibb, L. M. Graves, B. Swaminathan, M. E. Proctor, and P. M. Griffin. 1997. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N. Engl. J. Med.* 336:100-105.

- Destro, M. T., A. M Serrano, and D. Y. Kabuki. 1991. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. *Food Control* 2:110-112.
- El Marrakchi, A., A. Hamama, and F. El Othmani. 1993. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products produced or imported into Morocco. *J. Food Prot.* 56:256-259.
- Farber, J. M., and P. I. Peterkin. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55:476-511.
- Fleming, D. W., S. L. Cochi, K. L. Mac Donald, J. Brondum, P. S. Hayes, B.D. Plikaytis, M. B. Hoimes, A. Audurier, C. V. Broome, and A. L. Reingold. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N. Engl. J. Med.* 312:404-407.
- Furlanetto, S. M., M. A.A. Santos, and C. Hara. 1996. Avaliação da eficiência de quatro meios de plaqueamento no seu isolamento. *Higiene Alimentar.* 10:30-34.
- Genigeorgis, C., J.H. Toledo, and F. J. Garayzabal. 1991. Selected microbiological and chemical characteristics of illegally produced and marketed soft Hispanic-style cheeses in California. *J. Food Prot.* 54:598-601.
- Gombas, D. E., Y. Chen, R. S. Clavero, and V. N. Scott. 2003. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *J. Food Prot.* 66:559-569.
- Hitchins, A. D. 1998. *Listeria monocytogenes*. p. 10-01 - 10-13. *In*: Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 8th ed. Revision A. AOAC, Arlington.
- Hoffman, A. D., and M. Wiedmann. 2001. Comparative evaluation of culture and BAX polymerase chain reaction-based detection methods for *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in environmental and raw fish samples. *J. Food Prot.* 64:1521-1526.

- Hoffman, A. D., K. L. Gall, D. M. Norton and M. Wiedmann. 2003. *Listeria monocytogenes* contamination patterns for the smoked fish processing environment and for raw fish. J. Food. Prot. 66:52-60.
- Jacquet, C., J. Rocourt and A. Reynaud. 1993. Study of *Listeria monocytogenes* contamination in a dairy plant and characterization of the strains isolated. Int. J. Food Microbiol. 20:13-22.
- Jacquet, C., B. Catimel, R. Brosch, C. Buchrieser, P. Dehaumont, V. Goulet, A. Lepoutre, P. Veit, and J. Rocourt. 1995. Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. Appl. Environ. Microbiol. 61:2242-2246.
- Johansson, T., L. Rantala, L. Palmu, and T. Honkanen-Buzalki. 1999. Occurrence and typing of *Listeria monocytogenes* strains in retail vacuum-packed fish and in a production plant. Int. J. Food Microbiol. 47:111-119.
- Jinneman K.C., J. M. Hunt, C. A. Eklund, J. S. Wernberg, P. N. Sado, J. M. Johnson, R. S. Richter, S. T. Torres, E. Ayotte, S. J. Eliasberg, P. Istafanos, D. Bass, N. Kexel-Calabresa, W. Lin, C. N. Barton. 2003. Evaluation and interlaboratory validation of a selective agar for phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity using a chromogenic substrate to detect *Listeria monocytogenes* from foods. J Food Prot. 66:441-445.
- Karpísková, R., M. Pejchalova, J. Mokrosová, J. Vytrasová, P. Smuhanová, and J. Ruprich. 2000. Application of a chromogenic medium and the PCR methods for the rapid confirmation of *Listeria monocytogenes* in foodstuffs. J. Microbiol. Meth. 41:267-271.
- Klausner, R. B., and C. Donnelly. 1991. Environmental sources of *Listeria* and *Yersinia* in Vermont dairy plants. J. Food Prot. 54:607-611.

- Krysinski, E. P. L. J. Brown, and T. J. Marchisello. 1992. Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. J. Food Prot. 55:246-251.
- Linnan, M. J., L. Mascola, X. D. Lou, V. Goulet, S. May, C. Salminen, D. W. Hird, M. L. Yonekura, P. Hayes, R. Weaver, A. Audurier, B. D. Plikaytis, S. L. Fannin, A. Kleks, and C. V. Broome. 1988. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. N. Engl. J. Med. 319:823-828.
- Loncarevic, S., E. Bannerman, J. Bille, M. L. Danielsson-Tham, and W. Tham. 1998. Characterization of *Listeria* strains isolated from soft and semi-soft cheeses. Food Microbiol. 15:521-525.
- Lundén, J. M., T. J. Autio, A.-M. Sjöberg, and H. J. Korkeala. 2003. Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. J. Food Prot. 66:2062-2069.
- McLauchlin, J., M. H. Greenwood, and P. N. Pini. 1990. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese from a manufacturer associated with a case of listeriosis. Int. J. Food Microbiol. 10:255-262.
- Mead, P.S.; Slutsker, L.; Deitz, V. McCaig, L.F.; Bresee, J.S.; Shapiro, C.; Griffin, P.M. & Tauxe, R.V. 1999. Food-related illness and death in the United States. Emerg. Infect. Dis. 5:607-625.
- Miettinen, M. K., K. J. Björkroth, and H. J. Korkeala. 1999. Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. Int. J. Food Microbiol. 46:187-192.
- Norton D. M., M. A. McCamey, K. J. Boor and M. Wiedmann. 2000. Application of the BAX for screening/genus *Listeria* polymerase chain reaction system for monitoring *Listeria* species in cold-smoked fish and in the smoked fish processing environmental. J. Food Prot. 63:343-346.

- Norton, D. M., M. A. McCamey, K. L. Gall, J. M. Scarlett, K. Horton, K. J. Boor and M. Wiedmann. 2001. Molecular studies on the ecology of *Listeria monocytogenes* in the smoked fish processing industry. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:198-205.
- Notermans, S. H. W., J. Dufrenne, M. Leimeister-Wächter, E. Domann, and T. Chakraborty. 1991. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2666-2670.
- Pritchard, T. J., K. J. Flanders and C. W. Donnelly. 1995. Comparison of the incidence of *Listeria* on equipment versus environmental sites within dairy processing plants. *Int. J. Food Microbiol.* 26:375-384.
- Restaino, L., E. W. Frampton, R.M. Irbe, G. Schabert, and H. Spitz. 1999. Isolation and detection of *Listeria monocytogenes* using fluorogenic and chromogenic substrates for phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J. Food Prot.* 62:244-251.
- Ryser, E.T., S.M. Arimi, M.M.-C. Bunduki and C.W. Donnelly. 1996. Recovery of different *Listeria* ribotypes from naturally contaminated, raw refrigerated meat and poultry products with two primary enrichment media *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1781-1787.
- Saltijeral, J. A., V. B. Alvarez, and B. Garcia. 1999. Presence of *Listeria* in Mexican cheeses. *J. Food Safety* 19:241-247.
- Sauders, B. D., E. D. Fortes, D. L. Morse, N. Dumas, J. A. Kiehlbauch, Y. Schukken, J. R. Hibbs, and M. Wiedmann. 2003. Molecular subtyping to detect human listeriosis clusters. *Emerg. Infect. Dis.* 9:672 – 680.
- Silva, M. C. D., E. Hofer, and A. Tibana. 1998. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Food Prot.* 61:354-356.

- Sinde, E. and J. Carballo. 2000. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. Food Microbiol. 17:439-447.
- Sutherland, P., and R. Porritt. 1996. Dissemination and ecology of *Listeria monocytogenes* in Australian dairy factory environments. Food Australia 48:172, 174-176, 178.
- Tompkin, R. B. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. J. Food Prot. 65: 709-725.
- Torres, N. and R. C. Chandan. 1981. Latin American white cheese – a review. J. Dairy Sci. 64:552-557.
- USDA NASS (U.S. Department of Agriculture National Agricultural Statistics Service. 2002. Agricultural Statistics 2002, Chapter VIII. Dairy and Poultry Statistics (accessed at <http://www.usda.gov/nass/pubs/agr02/>)
- Wiedmann, M., J. L. Bruce, C. Keating, A. E. Johnson, P. L. McDonough, and C. Batt. 1997. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. Infect. Immun. 65:2707-2716.
- Wiedmann, M. 2002. Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. J. AOAC Int. 85:524-531
- Wong, S., D. Street, S. I. Delgado, and K. C. Klonts. 2000. Recalls of foods and cosmetics due to microbial contamination reported to the U.S. Food and Drug Administration. J. Food Prot. 63:1113-1116.

Table 1. Occurrence of *L. monocytogenes* in Latin-style fresh cheese processing plants

Plant	Visit	Finished Product ¹		Environmental		
		Number of samples	<i>L. monocytogenes</i> positive samples	Number of samples	<i>L. monocytogenes</i> positive samples	<i>Listeria</i> spp. positive samples ²
A	1	10	0	27	2	5
	2	18	0	23	1	5
	3	18	0	23	1	3
	4	18	0	24	0	5
	Subtotal	64	0 (0.0%)	97	4 (4.1%)	18 (18.5%)
B	1	5	0	17	3	1
	2	6	0	13	2	0
	3	6	0	13	1	2
	4	6	0	12	2	0
	Subtotal	23	0 (0.0%)	55	8 (14.5%)	3 (5.4%)
C	1	6	1	23	5	3
	2	6	3	22	6	1
	3	6	3	25	2	1
	4	6	0	24	2	1
	Subtotal	24	7 (29.2%)	94	15 (15.9%)	6 (6.4%)
Total		111	7 (6.3%)	246	27 (11.0%)	27 (11.0%)

¹Finished product samples negative for *L. monocytogenes* were also negative for *Listeria* spp.²Number of samples negative for *L. monocytogenes*, but positive for *Listeria* spp.**Table 2.** Occurrence of *L. monocytogenes* in environmental samples collected in three Latin-style soft cheese processing plants

Type of surface sampled	Number of samples tested	Number of positive samples (%)
Food contact surfaces	119	2 ¹ (1.7)
Floors Drains	40	12 (30.0)
Floors	34	7 (20.6)
Walls	38	0
Miscellaneous	15 ^c	6 ² (40.0)
TOTAL	246	27 (11.0)

¹Positive samples were a plastic connecting tube and a polytetrafluorethylene table (plant C)²Positive samples were crates and plastic milk packages

Table 3. *L. monocytogenes* contamination patterns and subtyping results for three Latin-style soft cheese processing plants

Plant	Visit	Sites (sample code)	<i>actA</i> type	<i>hlyA</i> type	Lineage	Ribotype (DUP)	RiboPrinter™ pattern
A	1	Drain 10, processing area 2	4	1	I	1044A	
		Floor, processing area 2	4	1	I	1044A	
	2	Drain, cooler room	4	2	II	1062C	
B	1	Drain, processing area	4	1	I	1042C	
		Floor, processing area	4	1	I	1042C	
		Crate	3	1	I	1042A	
	2	Drain, processing area	4	1	I	1042C	
		Crate ¹	3	1	I	1042A	
			4	2	II	1049A	
	3	Drain, processing area	4	1	I	1042C	
	4	Crate ¹	3	1	I	1042A	
			4	2	II	1062C	
		Milk package	3	1	I	1052	
C	1	Cheese	4	1	I	1044A	
		Drain 1, processing area 1	4	1	I	1044A	
		Drain 2, processing area 2	4	1	I	1044A	
		Drain 3, processing area 3	4	1	I	1044A	
		Floor 2, processing area 2	3	2	II	1045B	
		Floor 4, cooler room	4	1	I	1044A	
	2	Cheese	4	1	I	1044A	
		Cheese	4	1	I	1044A	
		Cheese	4	1	I	1044A	
		Plastic connecting tube, processing area 2	4	1	I	1044A	
		Drain 1, processing area 1	4	1	I	1044A	
		Drain 2, processing area 2	3	2	II	1045B	
		Drain 3, processing area 3	4	1	I	1044A	
		Floor 3, processing area 3	4	1	I	1044A	
	3	Floor 4, cooler room	4	1	I	1044A	
		Cheese	4	1	I	1044A	
		Cheese	4	1	I	1044A	
		Cheese	4	1	I	1044A	
		Floor 4, cooler room	4	1	I	1044A	
	4	Crate	4	2	II	1039C	
		Polytetrafluorethylene table, processing area 3	4	1	I	1044A	
		Drain 2, processing area 2	3	2	II	1045B	

¹ Two subtypes as determined by allelic analysis of *hly* and *actA* were isolated from these samples; subtype characteristics for both strains are shown.

Table 4. Comparison of BCM-LMDS with FDA method for detection of *L. monocytogenes* from 246 environmental samples

Isolation methods	Number of positive samples ¹	Number of negative samples	Number of false positives	Number of false negatives	Sensitivity (%) ²	Specificity (%) ³
LMDS	13	219	0	14	48.2	100
FDA	23	219	0	4	85.2	100

¹ A total of 27 samples were positive by one or both methods.

² % sensitivity = 100 x [true positives/ (true positives + false negatives)]

³ % specificity = 100 x [true negatives/ (true negatives + false positives)]

CONCLUSÕES GERAIS

1. O uso de leite pasteurizado na produção de queijo tipo frescal não elimina a possibilidade de contaminação por *L. monocytogenes* no produto final.
2. A contaminação por *L. monocytogenes* após a etapa de pasteurização do leite pode ocorrer a partir de fontes ambientais durante o processamento de queijos.
3. A presença de mesmo ribotipo de *L. monocytogenes* nos múltiplos isolados do ambiente e do produto final da indústria C sugere que esta bactéria está amplamente espalhada nessa linha de processamento.
4. Embalagens de leite e caixas vazadas podem ser a fonte de introdução da contaminação por *L. monocytogenes* dentro da área de processamento de queijos tipo frescal. Estratégia especial deve ser adotada para prevenir a entrada de contaminação na indústria por estes veículos.
5. Melhorias nos procedimentos operacionais de sanificação reduziram o número de locais com presença de *L. monocytogenes* e o risco de contaminação do produto final.
6. A aplicação de técnicas moleculares constitui excelente ferramenta para detectar a contaminação persistente e também, desenvolver e monitorar a efetividade de estratégias de controle de contaminação por *L. monocytogenes*, a qual requer integração de um eficiente programa de sanificação e boas práticas de fabricação.
7. *L. monocytogenes* pode persistir no ambiente de indústrias de queijo frescal e representar importante fonte de contaminação do produto acabado. Portanto, estratégias de eliminação e monitoramento da contaminação ambiental persistente por *L. monocytogenes*, devem ser adotadas, não somente em indústrias processadoras de queijo frescal e produtos lácteos, mas também em todos os estabelecimentos processadores de alimentos.

8. O método da FDA é mais efetivo que o método BCM LMDS para detectar *L. monocytogenes* de amostras ambientais de indústrias produtoras de queijo fresco.
9. A inclusão dos meios de cultura LMPM e LMCM não melhora o desempenho do método da FDA para detecção de *L. monocytogenes* em amostras de queijo fresco.

APÊNDICE

APÊNDICE A

DESCRIÇÃO DAS INDÚSTRIAS

Os três estabelecimentos produtores de queijo tipo frescal avaliados neste trabalho localizavam-se na cidade de Nova Iorque, Nova Iorque, EUA. Os estabelecimentos foram codificados em *Plant A*, *Plant B* e *Plant C*, e, de acordo com a quantidade de leite processado, foi classificado como de porte grande, pequeno e médio, respectivamente. Uma breve descrição de cada unidade é apresentada a seguir.

Plant A

Esta indústria foi classificada como de grande porte e processava cerca de 12.000 a 18.000 galões (45.421 a 68.131 L) de leite pré-pasteurizado e homogeneizado por dia, 6 vezes por semana, para produção de queijos tipo frescal que eram distribuídos para 12 estados dos EUA. Além da produção de queijos frescal estilo Salvadorenho (*Fresh White Cheese* com diferentes sabores, por exemplo com pimenta, e formas), produzia também *cream cheese*, *sour cream* e *hard white cheese*.

As instalações eram separadas em quatro grandes áreas: a) estocagem de matéria prima, b) pasteurização e coagulação do leite, c) dessoragem, salga, enformagem e embalagem, e d) sala refrigerada (*cooler room*) de estocagem. Na sala de coagulação, havia 3 tanques grandes de 2.000 galões (7.570 L) e 2 pequenos de 1000 galões (3.785 L). Na sala de enformagem havia 2 tanques para prensagem da coalhada e drenagem do soro, equipamento para moagem, equipamentos de prensagem horizontal e uma mesa longa para enformagem e embalagem manual. A temperatura das salas de processamento era mantida a 12,5°C. A temperatura da sala refrigerada era de 1°C.

Processamento

A matéria prima (leite pasteurizado), armazenada em 2 silos, era transferida para um trocador de calor a placas através de tubulações de aço inoxidável com o auxílio de uma bomba, e o leite era re-pasteurizado a 72°C por 17 segundos. O

leite repasteurizado era transferido para os tanques de coagulação, passando pelo sistema de tubulações de aço inoxidável. A coagulação ocorria a 28°C e, enquanto a cultura lática, o coalho e o ácido láctico eram adicionados ao leite, procedia-se a mistura por 30 minutos. O leite coagulado era transferido através de tubulações de aço inoxidável para outros tanques em outra sala, para drenagem do soro. A coalhada era prensada para o fundo dos tanques e manualmente cortada em cubos grandes. A massa era colocada em recipientes grandes de plástico e levada ao equipamento de moagem, onde a massa era salgada simultaneamente com a moagem. Sobre uma mesa grande de aço inoxidável revestida com filme de cloreto de polivinil (PVC), trocada de hora em hora, a massa moída e salgada era manualmente colocada nas formas (cilíndrica) para enformagem, e em seguida era embalada em filme de PVC e rotulada ou então a massa era manualmente colocada em embalagem plástica semi-rígida. A massa para a produção de queijo *Chunky*, após prensagem, era cortada em cubos pequenos que eram mantidos por 48 horas em tanque com salmoura preparada a partir do soro de leite e sal. Os produtos acabados, após serem embalados em sacos de polietileno de baixa densidade, eram mantidos sob refrigeração a 1°C na sala de refrigeração até sua distribuição.

Plant B

A indústria processava 75 galões (283,8 L) de leite, para produção de queijo fresco estilo Colombiano, 3 vezes por semana. O estabelecimento era pequeno e a produção ocorria em uma pequena sala onde havia um tanque de pasteurização, um tanque de coagulação, um moedor, uma mesa de aço inoxidável e um refrigerador. As paredes eram de aço inoxidável e o piso era cerâmico com algumas imperfeições. A matéria prima, leite pasteurizado, era recebida embalada em porções de 6 galões (22,7 L) em embalagem plástica protegida por uma caixa de papelão. As caixas eram colocadas em caixas plásticas vazadas e mantidas em uma câmara fria.

Processamento

A matéria prima era trazida nas caixas vazadas (*crate*) e dentro da área de processamento, o leite era colocado no tanque de pasteurização para receber um tratamento térmico a 57-60°C por 30 minutos. O leite repasteurizado era transferido ao tanque de coagulação através de tubulação de aço inoxidável. A coagulação era realizada a 39-41°C por 10 minutos com adição de coalho, cloreto de cálcio e vinagre. Após coagulação, o soro era drenado e a coalhada era prensada diretamente no tanque com o auxílio de uma bandeja perfurada de aço inoxidável. A massa era removida manualmente para recipientes de aço inoxidável e mantida sob refrigeração a 3,5-5,7°C até o dia seguinte. A massa, após a moagem, era colocada em recipientes de aço inoxidável onde o sal era adicionado e então, era manualmente misturado. A massa era enformada manualmente em forma (tigela de plástico), embalada em filme PVC, rotulada e colocada em saco plástico (polietileno de baixa densidade com fecho hermético). O produto final era armazenado no refrigerador a 3,5-5,7°C por cerca de uma hora até sua distribuição.

Plant C

Esta indústria foi classificada de porte médio e processava cerca de 1.000 a 1.200 galões (3.785 a 4.542 L) de leite homogeneizado pré-pasteurizado por dia, 5 vezes por semana, para produção de queijo fresco estilo Mexicano. Além disso, produzia também queijo mussarela.

As instalações eram separadas em áreas para estocagem de matéria prima, sala de pasteurização, coagulação e prensagem, sala de moagem, salga e enformagem e sala refrigerada (*cooler room*). As paredes eram revestidas com azulejos e o piso era cerâmico.

Processamento

A matéria prima (leite pasteurizado), armazenada em 2 tanques, era transferida para o tanque de pasteurização, através de tubulações de aço

inoxidável e de plástico com o auxílio de uma bomba, onde era pasteurizada. O leite repasteurizado era transferido para os tanques de coagulação através de tubulação de plástico. A coagulação ocorria a 30°C e, enquanto o coalho e a cultura láctica eram adicionados ao leite, procedia-se a mistura por 30-40 minutos. Após a coagulação, o soro era drenado. A coalhada era colocada, com o auxílio de uma peneira de plástico, em um tecido no qual era espremida. Ainda envolta pelo tecido, a coalhada era colocada em uma prensa pneumática para terminar a dessoragem. A massa, então, era colocada em recipientes grandes de plástico e era levada ao equipamento de moagem. A massa moída era transferida para um misturador onde era salgada. Sobre uma mesa de polietileno, a massa moída e salgada era manualmente colocada nas formas (cilíndrica) para enformagem. Em seguida, os queijos eram colocados em embalagem plástica semi-rígida e eram mantidos sob refrigeração a 2°C na sala de refrigeração, até sua distribuição.

Durante o desenvolvimento do trabalho, sugestões sobre Boas Práticas de Fabricação foram enviadas às indústrias. Em particular, na indústria C, a constatação de amostras de queijo positivas para *L. monocytogenes*, conduziu a modificações no processo de higienização (por exemplo: alteração no sanitizante a base de cloro, utilizado na desinfecção dos drenos, por composto de amônio quaternário) e substituição da tubulação de plástico, conectada na saída do pasteurizador, por tubulação de aço inoxidável. Após estas modificações, foi observada uma redução no número de amostras positivas para *L. monocytogenes*.

APÊNDICE B

DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS DE PCR

1. Lise das células de *Listeria*

Duzentos e cinquenta μ l de uma cultura em caldo de infusão de cérebro e coração (caldo BHI) incubados a 37°C sob agitação a 250 rpm por 18 h, foram centrifugados a 13,000xg por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 95 μ l de 1 x tampão PCR, tratadas com 1 mg/ml de lisozima em temperatura ambiente por 15 min e digeridas com 200 μ g/ml de proteinase K a 60°C por 30 min, seguida de fervura por 10 min, como descrito previamente por Furrer *et al.* (1991).

2. Identificação de *L. monocytogenes*

Os isolados suspeitos de serem *Listeria* foram confirmados como *L. monocytogenes* pela técnica de PCR para fragmento do gene codificador da hemolisina (*hly A*), conforme descrito por Norton *et al.* (2000). A técnica foi realizada utilizando-se os primers α 1 (5' CCT AAG ACG CCA ATC GAA AAG AAA 3') e β 1 (5' TAG TTC TAC ATC ACC TGA GAC AGA 3'), os quais permitem a amplificação de um fragmento de *hly A* de 858 bp. A mistura de reação de 25 μ l continha: 1 x tampão PCR (Gibco BRL®, Life Technologies), 1,5 mM de $MgCl_2$ (Gibco BRL®), 50 μ M de cada dATP, dCTP, dGTP and dTTP (New England Biolabs®), 0,4 μ M de cada primer, 1U Taq DNA polimerase recombinante (Gibco BRL®) e 2,0 μ l de uma diluição 1:10 de células lisadas (preparadas conforme item 2.1.). A reação térmica foi realizada no termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CT). As amostras foram colocadas no termociclador a uma temperatura de 90°C e os ciclos de amplificações foram: um ciclo inicial a 94°C por 2 min; seguido de 40 ciclos a 95°C por 10 s, 60°C por 30 s e 72°C por 30 s; e um ciclo final a 72°C por 10 min. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Promega, Madison, WI) em solução tampão de Tris-borato EDTA (TBE), a 120V, corados com solução de

brometo de etídio (0,5 µg/ml) e fotografados. A foto de um gel pode ser visualizada na Figura 1.



Figura 1. Gel de eletroforese do fragmento de *hlyA* amplificado para identificação de *L. monocytogenes*. Colunas, 1, 3, 5, 6 e 7, isolados positivos; 2 e 4 isolados negativos; 8, controle positivo; 9, controle negativo; M marcador de peso molecular (pGEM®, Promega)

3. Tipagem de *L. monocytogenes* através do polimorfismo alélico dos genes *actA* e *hly*

As culturas de *L. monocytogenes* foram subtipadas para o polimorfismo alélico dos genes codificadores de listeriolisina O (*hlyA*) e ActA (*actA*). O polimorfismo alélico de *actA* foi verificado por PCR e *hlyA* por PCR-polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição, “*Restriction Fragment Length Polymorphism*” (PCR-RFLP) usando-se as enzimas de restrição *HhaI* e *HpaII*, como descrito previamente por Wiedmann *et al.*(1997).

Brevemente, a técnica de PCR para *actA* foi realizado com os primers actA-946F (5' TAA AAG TGC AGG GTT ATT G 3') e actA-1834R (5' GGA TTA CTG GTA GGC TCG G 3'). Estes primers permitem amplificação de fragmentos de 821 bp ou 926 bp, respectivamente, para os tipos alélicos 3 e 4. Cada 25 µl de mistura de reação continha: 1 x tampão PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 50 µM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 0,5 µM de cada primer, 1U Taq DNA polimerase e 1,0 µl da diluição 1:10 de células lisadas (preparadas conforme item 2.1). A reação térmica foi realizada no termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer). Os ciclos

de amplificação foram: um ciclo inicial a 94°C por 2 min; seguido por 35 ciclos a 94°C por 1 min, 50°C por 1 min e 72°C por 1 min; e um ciclo final a 72°C por 5 min. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Promega, Madison, WI), em tampão TBE, a 120V, corados com solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml) e fotografados. Este ensaio permite distinguir 2 tipos alélicos de *actA*, tipos 3 e 4 (Figura 2) que correspondem a 3 e 4 regiões de PRR, respectivamente.

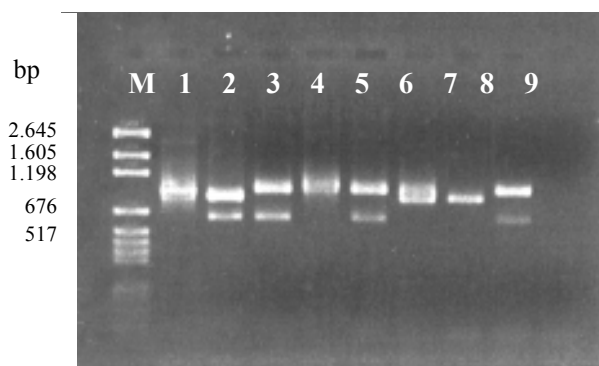


Figura 2. Gel de eletroforese do polimorfismo alélico do *actA*. Colunas 1, 3, 4 e 5, *actA* tipo 4; 2 e 6, *actA* tipo 3; 7, controle positivo do tipo 3; 8, controle positivo do tipo 4; 9, controle negativo; M, marcador de peso molecular (pGEM®, Promega)

Brevemente, o PCR-RFLP para *hlyA* foi realizado usando-se os primers *hly-F* (5' TGC GTT TCA TCT TTA GAA GC 3') e *hly-R* (5' AAG CCT GTT TCT ACA TTC TTC A 3') para linhagem I e II, e para linhagem III utilizando-se os primers *hly-F* e *hly-βn* (5' GTC GAT GAT TTG AAC TTC ATC TTT 3'). Estes primers permitem amplificação de fragmentos de 1.812 bp e 1.193 bp, respectivamente. Cada 50 µl de mistura para PCR continha: 1X tampão PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 50 µM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 0,5 µM de cada primer, 1U Taq DNA polimerase e 1,0 µl de células lisadas (preparadas conforme item 2.1). A reação térmica foi realizada no termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer). Os ciclos de amplificação foram: um ciclo inicial a 94°C por 3 min; seguido por 35 ciclos a 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min; e um ciclo final a 72°C por 5 min. A Taq DNA polimerase foi adicionada a 80°C no primeiro ciclo (*hot start*). Os

produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Promega, Madison, WI), em tampão TBE, a 120V, corados com solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml) e fotografados. Os produtos de PCR foram digeridos separadamente usando-se as enzimas *Hha*I e *Hpa*II (New England BioLabs®). Uma alíquota de 19 µl do produto de PCR foi adicionada de 2,5µl de tampão NEB #4 (New England Biolabs®), 2,5 µl de 10X BSA e 1µl *Hha* I. A outra alíquota de 19 µl foi adicionada de 2,5µl de tampão NEB #1 (New England Biolabs®), 2,5 µl de 10X BSA e 1µl *Hpa* II. A digestão ocorreu em banho Maria a 37°C por 3 h. O produto digerido foi separado por eletroforese em gel de agarose 3,0%, em tampão TBE, a 120V, corado com solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml) e fotografados. Este ensaio permite distinguir 8 tipos alélicos de *hlyA*.

Nas Figuras 3, 4 e 5 estão apresentadas as fotos dos géis de eletroforese, sendo que neste estudo foram observados somente os tipos 1 e 2.

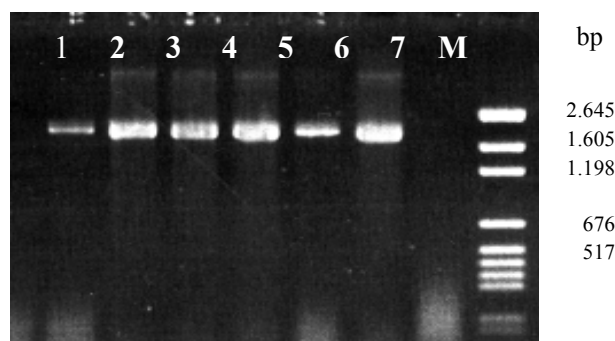


Figura 3. Gel de eletroforese de *hlyA* amplificado para tipagem de *L. monocytogenes*. Colunas 1, 2, 3, 4 e 5 isolados positivos; 6, controle positivo; linha 7, controle negativo; M, marcador de peso molecular (pGEM®, Promega)

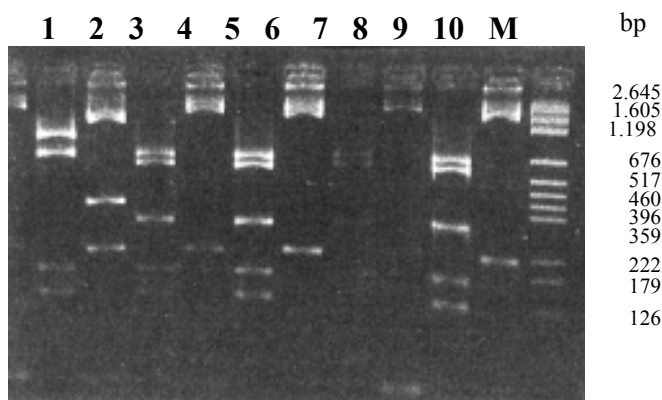


Figura 4: Gel de eletroforese do polimorfismo alélico do *hlyA* após digestão enzimática. Colunas de número par, digestão com *HhaI*; colunas de número ímpar, digestão com *HpaII*. Colunas 1 e 2, isolado positivo para *hlyA* tipo 1; 3 a 10, isolados positivos para *hlyA* tipo 2; M, marcador de peso molecular (pGEM®, Promega)

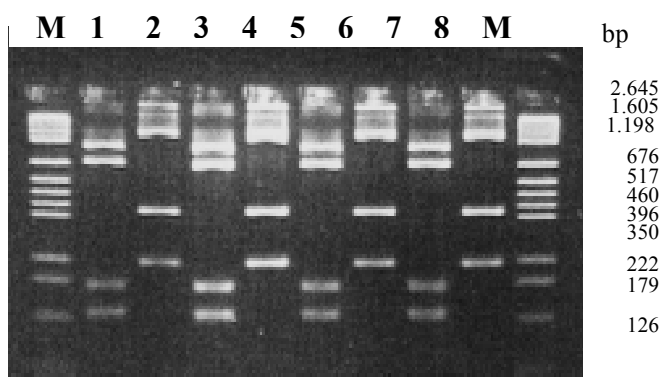


Figura 5: Gel de eletroforese do polimorfismo alélico do *hlyA* após digestão enzimática. Colunas de número par, digestão com *HhaI*; colunas de número ímpar, digestão com *HpaII*. Colunas 1 a 8, isolados positivos para *hlyA* tipo 1; M, marcador de peso molecular (pGEM®, Promega)

4. Referências bibliográficas:

1. FURRER, B.; CANDRIAN, U.; HOEFELIN, Ch.; LUETHY, J. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by *in vitro* amplification of haemolysin gene fragments. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.70, n.5, p. 372-379, May, 1991.
2. NORTON, D. M.; McCAMEY, M. A.; BOOR, K. J.; WIEDMANN, M. Application of the BAX for screening/genus *Listeria* polymerase chain reaction system for monitoring *Listeria* species in cold-smoked fish and in the smoked fish processing environmental. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.63, n.3, p.343-346, Mar., 2000.

3. WIEDMANN, M.; BRUCE, J. L.; KEATING, C.; JOHNSON, A. E.; McDONOUGH, P. L.; BATT, C. A. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. **Infection and Immunity**, Washington, v.65, n.7, p.2707-2716, July, 1997.

APÊNDICE C
IMAGENS DE *L. monocytogenes* EM MEIOS SELETIVOS

**A****B****C**

Figura 6. *L. monocytogenes* em meios seletivos provenientes de uma amostra de queijo fresco. A) ágar Oxford, B) ágar Palcam e C) ágar LMPM.

APÊNDICE D

IMAGENS DAS AMOSTRAS DE QUEIJOS COLETADAS

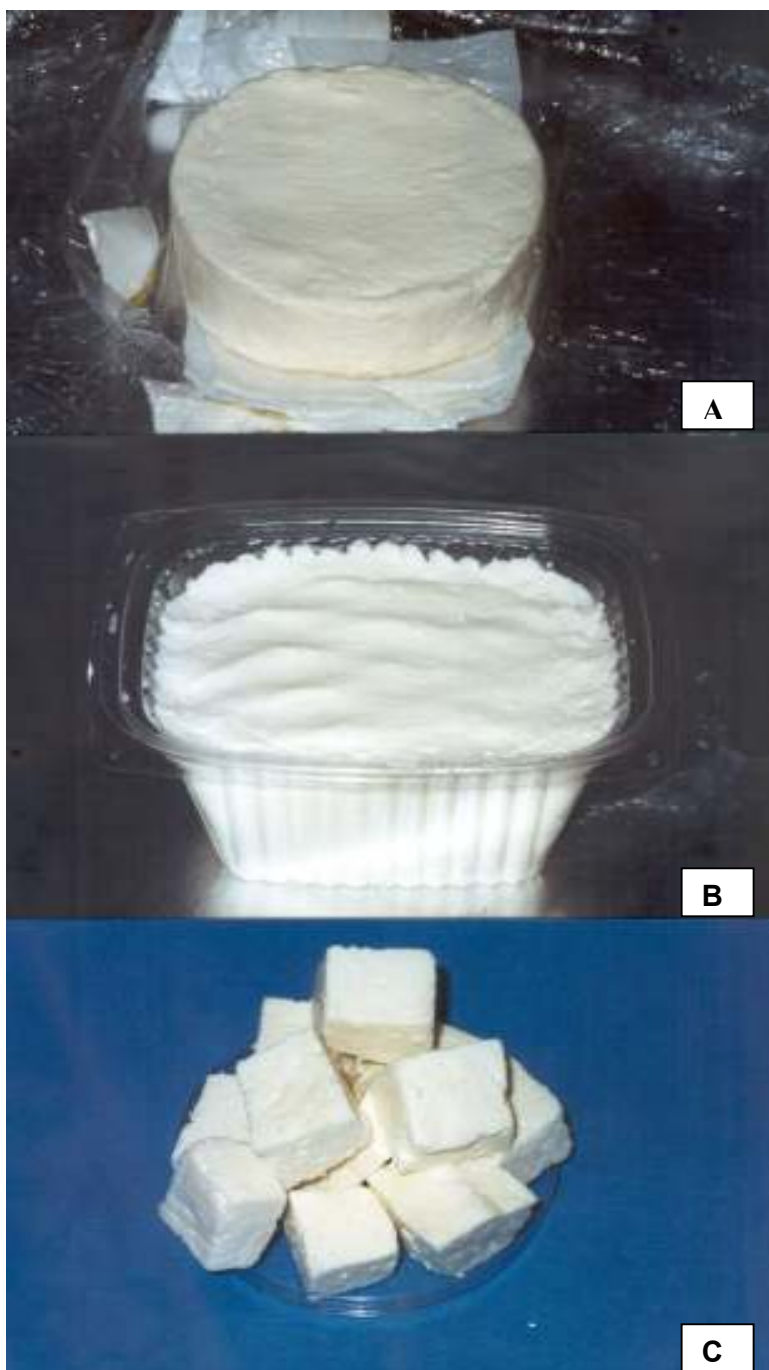


Figura 7. Amostras de queijo coletadas na fábrica A.

A) *Round fresh cheese*

B) *Fresh cheese*

C) *Chunky cheese*



Figura 8. Amostras de queijo coletadas nas fábricas B e C.
 A) *White cheese* coletada na fábrica B
 B) *Fresh cheese* coletada na fábrica C

APÊNDICE E

IMAGENS DE SUPERFÍCIES AMBIENTAIS POSITIVAS PARA *L. monocytogenes*



Figura 9. Amostras ambientais positivas para *L. monocytogenes* encontradas na fábrica A.

- A) dreno da área de processamento
- B) dreno da câmara fria (*cooler room*)
- C) caixa vazada de plástico



Figura 10. Amostras ambientais positivas para *L. monocytogenes* encontradas na fábrica B.

- A) piso da área de processamento
- B) dreno
- C) caixa vazada de plástico



Figura 11 : Amostras ambientais positivas para *L. monocytogenes* encontradas na fábrica C.

- A) tubo de conexão de plástico
- B) mesa de polietileno
- C) caixa vazada de plástico
- D) dreno da área de processamento
- E) piso da área de processamento
- F) piso da câmara refrigerada