

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ISOLAMENTO E ENUMERAÇÃO DE *Listeria monocytogenes*
EM PRODUTOS CÁRNEOS COMERCIALIZADOS NO VAREJO
DA REGIÃO DE BOTUCATU, SP.

LOREDANA D' OVIDIO

BOTUCATU - SP

Agosto 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ISOLAMENTO E ENUMERAÇÃO DE *Listeria monocytogenes*
EM PRODUTOS CÁRNEOS COMERCIALIZADOS NO VAREJO
DA REGIÃO DE BOTUCATU, SP.

LOREDANA D' OVIDIO

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Ass. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto

BOTUCATU-SP

AGOSTO 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

d'Ovidio, Loredana.

Isolamento e enumeração de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos comercializados no vajejo da região de Botucatu, SP / Loredana d'Ovidio. – Botucatu : [s.n.], 2008

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.

Orientador: José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Assunto CAPES: 50402005

1. Carne - Qualidade 2. Carne - Inspeção 3. Carne - Comercio - Botucatu

CDD 664.9

Palavras-chave: Brasil; Contaminação; Enumeração; *Listeria monocytogenes*; Produtos cárneos

Nome do autor: Loredana d' Ovidio

Título: ISOLAMENTO E ENUMERAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* EM PRODUTOS CÁRNEOS COMERCIALIZADOS NO VAREJO DA REGIÃO DE BOTUCATU, SP.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Paes de A. N. Pinto
Presidente e Orientador
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof^a. Dr^a. Vera Lúcia Mores Rall Instituição:
Membro
Departamento de Microbiologia e Imunologia
IBB – UNESP - Botucatu

Prof^a. Dr^a. Márcia de Aguiar Ferreira Barros
Membro
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
FAV – UNB - Brasília

Data da Defesa: 14 de agosto 2008

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por me apoiarem em todas as minhas decisões e teimosias, sempre me incentivando e tentando mostrar o melhor caminho, e o mais importante, permitindo que eu errasse sem nunca me julgar.

Ao meu orientador, o Prof. José Paes de Almeida Nogueira Pinto que aceitou e confiou orientar uma desconhecida, recém-formada e que queria trabalhar com um microrganismo mirabolante. Pacientemente compreendeu as minhas trapalhadas, ligações aos prantos quando perdia o meu cachorro, além de todas as minhas crises existenciais! Pelos consolos toda vez que errava e principalmente por sempre me incentivar e me orientar, em qualquer situação, com toda a boa vontade do mundo.

À minha irmã, Fabíola e meu sobrinho, Ricardo, pelo apoio e compreensão.

À querida Julia Arantes Galvão, ao qual eu a persegui pelos corredores do laboratório e praticamente a forcei ser minha amiga e que acabou se tornando uma irmã, me ajudando, consolando e aconselhando em todos os meus momentos de pânico, terror e aflição.

Aos meus queridos amigos Juliana Alves Dias, Patrícia Fernandes Nunes da Silva e Rafael Sabioni (Micuim), pela amizade incondicional, me aconselhando, ajudando ou simplesmente estando presentes em minha vida.

À querida Gilda Pinto do Amaral, sua irmã Cida e sua sobrinha Eileen, ao qual foram uma família para mim em Botucatu, sempre carinhosamente dispostas a ajudar em qualquer situação.

Às queridas Kate e Marly, pelos momentos de terapia em grupo, me ouvindo pacientemente, e sempre garantindo boas risadas.

A todas minhas "irmãs" mais novas que Botucatu me deu! Azia, Pirlim, Tipi, Mirregue, Dia, Isva, Taka e que fizeram os meus dias em Botucatu mais felizes!

À Jambú, Fú e Saúva, que me acolheram em Botucatu, como parte da família "Albergue", sem receio algum.

Ao querido amigo Java, pelos cafés recheados de muita música.

À D. Cidoca, que sempre cuidou de mim com um carinho materno.

À Cleise, uma amiga ao qual conheci graças à *Listeria monocytogenes* e sempre disposta a oferecer um ombro todas às vezes em que perguntava "posso chorar?".

A um casal muito querido, Maria Carolina e Márcio, que sempre me apoiaram e sempre estiveram presentes apesar da distância geográfica.

À D. Luzia Maimone, pelas boas risadas e sempre me ajudando, principalmente nos meus momentos mais difíceis como aparelho de fax.

À D. Zeza, Karina Amaral, Karina Basso e Silva Gotardi, sempre dispostas todas as vezes que precisei de ajuda.

Às Professoras Vanerli Beloti e Márcia de Aguiar Ferreira Barros que me ensinaram tudo o que sei hoje sobre microbiologia e que sem esse conhecimento, este trabalho não poderia ser realizado.

Ao Thiago, "irmão" de orientação, sempre bem humorado, alegrando o laboratório da pesquisa.

Ao Prof. Luciano do Santos Bersot, pelas orientações, dicas e formatação das tabelas nos meus momentos de desavença com o "word".

À Prof^a. Vera Lúcia Mores Rall pelo auxílio em todos os momentos e por ceder gentilmente a cepa de *L. monocytogenes* ATCC 7644.

À Prof^a. Maria Teresa Destro pelo auxílio durante toda a execução do projeto.

À CAPES pela concessão da bolsa.

"Ninguém ignora tudo, ninguém sabe tudo, por isso aprendemos sempre."
Paulo freire.

Resumo

D'OVIDIO, L. **Isolamento e enumeração de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos comercializados no varejo da região de Botucatu, SP.** 2008 88f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – Botucatu

No presente trabalho foram analisadas 243 amostras de produtos cárneos processados e frescos, sendo 192 amostras encaminhadas ao Serviço de Orientação à Alimentação Pública (SOAP-FMVZ) e 51 amostras adquiridas no varejo da cidade de Botucatu, SP, com o objetivo de: avaliar a ocorrência de *L. monocytogenes* em uma gama variada de alimentos, tanto frescos como naqueles que foram submetidos a algum tipo de tratamento térmico, ambos com ampla aceitação do mercado consumidor; quantificar *L. monocytogenes* em alguns destes produtos, de modo a contribuir na formação de um banco de dados sobre o nível de contaminação dos alimentos por este patógeno no Brasil; avaliar a influência da contaminação das amostras por coliformes à 35°C e *Escherichia coli* no isolamento e enumeração de *L. monocytogenes*. Das 192 amostras analisadas encaminhadas ao SOAP, 183 eram de produtos que haviam sofrido algum tipo de processamento, sendo que *L. monocytogenes* foi detectada em 15 (8,2%) delas. Já nas amostras do varejo 18 (35,3%) das 51 amostras analisadas encontravam-se contaminadas por *L. monocytogenes*. Apenas dois tipos das amostras (lingüiça de pernil e espetinho de coração) apresentaram contagens para *L. monocytogenes*. Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que: A contaminação por *L. monocytogenes* se deu em uma gama variada de produtos, tanto frescos como nos submetidos a processamentos térmicos e pode ser resultante de matéria-prima de má qualidade, processamento inadequado e/ou recontaminação do produto; dois dos produtos avaliados apresentaram contagens elevadas do patógeno e se consumidos mediante tratamento térmico insuficiente, podem representar um perigo aos consumidores susceptíveis. A presença de *E. coli* em alimentos, em elevadas contagens, pode exercer uma influência na detecção de *L. monocytogenes*.

Abstract

D'OVIDIO, L. **Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* in meat products from retail market in Botucatu city, São Paulo state.** 2008 88f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – Botucatu

A survey was undertaken to determine the occurrence and contamination level in a variety of meat products (cooked meat products and raw meat products, dried or not). Two hundred and forty-three samples were analyzed, one hundred and ninety-two samples were from “Serviço de Orientação à Alimentação Pública” (SOAP-FMVZ) and fifty-one were purchased in a local retail market of Botucatu city, São Paulo state. The objectives were to evaluate the occurrence of *L. monocytogenes* in a large variety of meat products (fresh, heat-treated and ready-to-eat products). All products were chosen by majority of consumers' preference in Brazil. Also enumeration of *L. monocytogenes* was conducted to determine the contamination level and to contribute for constitution of data base about the pathogen in our country. Also the contamination level of total coliforms and *Escherichia coli* were evaluated to verify if there is an influence in the isolation and enumeration of *L. monocytogenes*. From one hundred and ninety-two samples analyzed sent to SOAP, fifteen (8,2%) were positive for *L. monocytogenes* and from fifty-one samples purchased in the local market, eighteen (35,3%) were contaminated by the pathogen. Only two kind of the samples presented counts for *L. monocytogenes* (fresh sausages and chicken heart skewer). Based on these results, we conclude: a large variety of meat products (fresh, heat-treated and ready-to-eat products) were contaminated by *L. monocytogenes*, the contamination could be from raw material, during the manufacturing process and/or recontamination in the final product. Two products evaluated presented high contamination levels and could be consumed without proper heating, representing a hazard for susceptible populations. The presence of *E. coli* in foods, in high level, could influence in the detection of *L.monocytogenes*.

Lista de Figuras

- FIGURA 01-** Metodologia preconizada pelo International Standard Organization ISO 11290-1 e ISO 11290-2 para Enumeração e Isolamento de *Listeria monocytogenes*.....23
- FIGURA 02-** Alimentos colhidos no comércio varejista de Botucatu, SP: porcentagem de amostras negativas e positivas para *L. monocytogenes* e porcentagem de amostras contaminadas por possíveis cepas não hemolíticas do patógeno.48

Lista de Tabelas

TABELA 1- Tipo e número total de amostras encaminhadas ao Serviço de Orientação à Alimentação Pública (SOAP), para pesquisa de <i>L. monocytogenes</i>	19
TABELA 2- Tipo e número total de amostras colhidas no comércio varejista de Botucatu, SP para pesquisa e enumeração de <i>L. monocytogenes</i>	20
TABELA 3- Características bioquímicas das espécies do gênero <i>Listeria</i>	25
TABELA 4- Amostras enviadas ao SOAP: tipo, número total analisado e número de amostras positivas para <i>L. monocytogenes</i>	28
TABELA 5- Amostras do comércio varejista de Botucatu-SP: tipo, número total analisado e número de amostras positivas para <i>L. monocytogenes</i>	36
TABELA 6- Medidas descritivas da contagem de Coliformes a 35°C e <i>E. coli</i> segundo a ocorrência de <i>Listeria monocytogenes</i>	41
TABELA 7- Resultado da enumeração de <i>L. monocytogenes</i> nas 5 amostras do comércio varejista.	455
TABELA 8- Amostras analisadas, amostras positivas para <i>L. monocytogenes</i> e número de amostras contaminadas por possíveis cepas não hemolíticas de <i>L. monocytogenes</i> em alimentos do comércio varejista de Botucatu-SP.....	477
TABELA 9- Valores mínimos, medianas e valores máximos das contagens de coliformes a 35°C e <i>E. coli</i> em amostras de alimentos colhidas no comércio varejista de Botucatu, SP.....	50

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Características do microrganismo	3
2.2 Listeriose nos animais	5
2.3 Ambiente e papel dos animais na cadeia epidemiológica da Listeriose em humanos	6
2.4 Animais silvestres	8
2.5 Vias de transmissão para os animais.....	9
2.6 <i>Listeria monocytogenes</i> na indústria e nos alimentos	9
2.7 <i>Listeria monocytogenes</i> no ambiente doméstico	11
2.8 Vias de transmissão para o homem	12
2.9 Listeriose no homem.....	13
2.10 Listeriose no Brasil.....	14
3. OBJETIVOS.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 Material.....	17
4.2 Metodologia.....	20
4.2.1 Enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i>	21
4.2.2 Isolamento de <i>Listeria monocytogenes</i>	21
4.2.3 Identificação bioquímica das colônias isoladas.....	24
4.2.4 Contagem de Coliformes a 35°C e <i>Escherichia coli</i>	26
4.2.5 Análise Estatística	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1 Amostras encaminhadas ao SOAP	29
5.2 Amostras do Comércio Varejista da Região de Botucatu-SP.....	36
5.3 Análise estatística.....	41
5.4 Enumeração de <i>L.monocytogenes</i>	43
5.5 Possíveis cepas de <i>L. monocytogenes</i> não-hemolíticas	45
5.6 Coliformes a 35°C, <i>Escherichia coli</i> e a legislação brasileira.....	48
6. CONCLUSÕES	51

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
8. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	63

1. Introdução

Doenças causadas por alimentos contaminados ainda são uma das principais causas de morbidade em diversos países, podendo gerar sérias conseqüências para a saúde pública (ANGELILLO et al., 2000). Essas enfermidades são denominadas toxinfecções alimentares e a sua maioria é causada pelo consumo de alimentos contaminados com os denominados “perigos biológicos”, representados principalmente pelas bactérias patogênicas (MEER & MISNER, 1999).

A presença de microrganismos patogênicos nos alimentos é resultante de uma complexa interação de fatores que envolvem o patógeno em si, o alimento que irá veiculá-lo e a pessoa que vai ingeri-lo, que podem atuar para amplificar ou atenuar a contaminação e os níveis de multiplicação destes microrganismos. Entre estes fatores, pode-se citar o processamento, a distribuição, o consumo e a imunidade da população (HANSEN et al., 2003; SCHLUNDT, 2002; ZWIETERING & VAN GERWEN, 2000; LAMMERDING & PAOLI, 1997, McMEEKIN et al., 1997).

Entre os patógenos causadores de toxinfecções alimentares, destaca-se *Listeria monocytogenes*, microrganismo que se encontra amplamente disseminado na natureza, sendo que tanto o homem como várias espécies animais servem como reservatório para essa bactéria. Esse microrganismo tem sido isolado de diversos alimentos em vários países do mundo e no Brasil já foi relatado em leite, queijos, carne bovina, suína e de aves, peixes e produtos de origem vegetal (DESTRO et al., 1991; MOURA et al., 1993; SILVA et al., 1998; DESTRO, 2000; HOFER et al., 2000; SILVA et al., 2001; SILVA et al., 2003). Segundo Schlech III (2000), os alimentos são reconhecidos como principal veículo de *L. monocytogenes* para o homem.

O primeiro surto de listeriose humana associada ao consumo de alimentos descrito na literatura ocorreu em Massachussets, Estados Unidos, em 1979. Vinte pacientes foram hospitalizados, sendo que destes, 10 eram imunodeprimidos e 5 vieram a óbito. Os principais alimentos envolvidos foram alface, cenoura e rabanete (HO et al., 1986 apud DONNELLY, 2001).

Posteriormente, em 1981, um novo surto ocorreu no Canadá, tornando evidente a participação dos alimentos como veículos do patógeno. O alimento implicado foi uma salada de repolho, tendo sido registrados 34 casos da doença em gestantes e 07 casos em não gestantes. Vinte e sete por cento dos recém-nascidos morreram após o parto e a investigação do surto revelou que o repolho utilizado na salada provinha de uma fazenda onde estavam ocorrendo casos de listeriose em carneiros e que a plantação dos vegetais era fertilizada com fezes dos animais portadores do agente (SCHLECH III et al., 1983).

A partir da descrição desses dois surtos, vários outros foram relatados em vários países do mundo, envolvendo uma grande variedade de alimentos, tais como leite pasteurizado, leite achocolatado, patê de carne, língua de porco em gelatina, salsichas, carne pronta para o consumo, vários tipos de embutidos, carne de peru e queijos (FLEMING et al., 1985; LINNAN et al., 1988; McLAUCHLIN et al., 1991; SALVATI et al., 1995; GOULET et al., 1995; DALTON et al., 1997; CDC, 1999, 2000, 2001, 2002).

A enfermidade apresenta uma taxa de mortalidade próxima dos 50% (McLAUCHLIN, 1996.; LOW & DONACHIE, 1997.; ROCOURT, 2000). Valores assim tão elevados têm gerado uma enorme preocupação, e a listeriose passou a ser considerada um problema grave de saúde pública.

No Brasil, *Listeria monocytogenes* tem sido isolada de material clínico de vários processos patológicos e de portadores humanos, mas nunca se conseguiu estabelecer uma relação direta entre o consumo do alimento contaminado pelo agente e a ocorrência da doença em humanos.

Relatos de listeriose na gravidez, causando aborto ou infecção no recém-nascido também têm sido descritos, sem que, no entanto tenha se chegado à origem da infecção (PACHECO et al., 1967; PACHECO & SILVA, 1972; LEAL et al., 1983).

No Brasil, relatos de listeriose foram descritos por Landgraf et al. (1999). Os autores relataram a ocorrência de um surto envolvendo *Listeria monocytogenes* do sorotipo 4b em 5 crianças nascidas em um centro obstétrico da grande São Paulo. Mais uma vez a fonte de contaminação desses casos permaneceu desconhecida.

Os animais também são acometidos por essa doença, sendo evidente a sua importância na cadeia epidemiológica. Há relatos de manifestações clínicas como encefalites, abortos, mastite, septicemia e ceratoconjuntivite (KOZAK, 1996; JENSEN, 1996; LOW & DONACHIE, 1997; HO, 2006), sendo que a principal fonte de contaminação é a silagem de baixa qualidade.

No Brasil, vários casos de listeriose em animais têm sido descritos, sendo que recentemente Ribeiro et al. (2006) relataram dois quadros de encefalite em ovinos leiteiros, causados por *L. monocytogenes*.

Mesmo não apresentando sinais clínicos, ainda sim os animais podem eliminar o agente nas fezes, tornando-se importantes disseminadores da bactéria pelo rebanho e ambiente (NIGHTINGALE et al., 2004; HO et al., 2006).

2. Revisão de Literatura

2.1 Características do microrganismo

O gênero *Listeria* abrangia anteriormente as seguintes espécies, em número de oito: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. denitrificans* e *L. murrayi*. Posteriormente, *L. denitrificans* foi reclassificada como *Jonesia denitrificans* e *L. grayi* e *L. murrayi* foram agrupadas em uma única espécie, *Listeria grayi*. A espécie *L. ivanovii*, por sua vez, foi subdividida em duas subespécies: *L. ivanovii* subsp. *Ivanovii* e *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* (FRANCO, 1996). Tem-se atualmente, portanto, seis espécies, sendo que apenas *L. monocytogenes* tem sido relatada como causadora de enfermidade em humanos (JAY, 2000).

L. monocytogenes é um bacilo Gram-positivo, não formador de esporo, anaeróbio facultativo. É móvel devido à presença de flagelos

peritríquios, apresentando movimento característico denominado tombamento e tendo motilidade ótima a 25 °C. Apresenta crescimento em ampla faixa de temperatura (2,5 °C a 44 °C), embora existam relatos de seu crescimento a 0 °C (FRANCO, 1996; KONEMAM, 2001).

O pH ótimo para o crescimento desta bactéria está entre seis e oito, porém ela pode crescer em uma faixa maior, entre cinco e nove (FRANCO, 1996).

Em relação à concentração de NaCl, *L. monocytogenes* apresenta uma sobrevivência em concentrações de 10,5% e 13% quando incubada a 37 °C por 15 e 10 dias respectivamente, porém à temperatura de 4 °C e em concentrações entre 10,5% e 30,5%, ela apresenta um tempo de sobrevivência acima de 100 dias (FRANCO, 1996).

A atividade de água ótima para o seu crescimento é próxima a 0,97, entretanto essa bactéria tem a capacidade de se multiplicar em valores de 0,92, considerado baixo para a multiplicação de um patógeno (FRANCO, 1996). Apenas os estafilococos, sendo estes também patógenos veiculados por alimentos, têm a capacidade de crescer em atividade de água menor que 0,92 (JAY, 2000).

Como características bioquímicas, ela apresenta reação positiva para catalase e negativa para oxidase (FRANCO, 1996). É produtora de β -hemólise que usualmente não se difunde muito além das bordas das colônias, sendo este o principal fator de virulência do microrganismo (FRANCO, 1996; KONEMAM, 2001). Realiza a fermentação da ramnose, da glicose, trealose e salicilina, bem como a hidrólise da esculina e não é produtora de H₂S (JAY, 2000; KONEMAM, 2001).

Com base em antígenos somáticos (O) e flagelares (H), existem 16 sorovares de *L. monocytogenes*, porém a doença só é causada pelos sorovares 4b, 1/2a e 1/2b (FRANCO, 1996; DIMAIO, 2000; KONEMAM, 2001). Entretanto, somente o sorotipo 4b tem sido responsável por casos de listeriose causada por alimentos. A ocorrência desse fato pode ter como explicação a maior virulência deste sorotipo, melhor adaptação a alimentos, maior distribuição no ambiente ou melhor sobrevivência em humanos (DIMAIO, 2000).

2.2 Listeriose nos animais

L.monocytogenes foi isolada pela primeira vez em um surto ocorrido em coelhos e porquinhos da Índia, em um laboratório, em 1926 por Murray et al. (1926).

Atualmente a listeriose é uma enfermidade amplamente disseminada, sendo relatada em mais de 40 espécies animais, entre animais domésticos e silvestres (LOW & DONACHIE, 1997).

Tem maior importância em bovinos, ovinos e caprinos. Frequentemente encefalites e infecções uterinas são identificadas, porém pode causar outras manifestações clínicas.

Encefalite: relatada pela primeira vez em ovinos na Nova Zelândia, sendo chamada de “circling disease”, pelo fato dos animais acometidos andarem em círculos. Os sinais clínicos são resultado do local da infecção no cérebro (LOW & DONACHIE, 1997).

Aborto: pode ocorrer em outras espécies domésticas além de ruminantes. Há relatos de abortos causados por *Listeria ivanovii*, porém menos frequente em relação *L. monocytogenes*, e extremamente rara como agente de outras manifestações clínicas (LOW & DONACHIE, 1997).

Septicemia: relativamente incomum e ocorre em neonatos em pós infecção uterina. Frequentemente são encontradas lesões granulomatosas em órgãos parenquimatosos, como fígado e baço (LOW & DONACHIE, 1997).

Ceratoconjuntivite: é relatada ocasionalmente e ocorre mais frequentemente quando se introduz a silagem na alimentação dos animais (LOW & DONACHIE, 1997).

Mastite: somente alguns casos são relatados. O primeiro relato foi na Dinamarca em 1973 por Jensen e Larsen. *L. monocytogenes* pode causar mastite clínica ou subclínica, com excreção do agente por longos períodos (LOW & DONACHIE, 1997). Em quartos afetados podem ser excretadas até 10.000 UFC/mL de leite. Apresenta reação inflamatória intensa, com contagem de células somáticas de 5×10^6 /mL (JENSEN et al, 1996).

Em animais monogástricos a listeriose é rara, porém há relatos de septicemia e meningoencefalite. Em aves, pode causar septicemia e necrose de miocárdio (LOW & DONACHIE, 1997).

2.3 Ambiente e papel dos animais na cadeia epidemiológica da Listeriose em humanos

Os animais têm uma função importante na cadeia epidemiológica da listeriose em humanos. Eles favorecem a manutenção do microrganismo no ambiente, através da contaminação com fezes, da água, solo, vegetação, pastagem e de outros animais, que passam a amplificar a distribuição do microrganismo.

Como este agente tem característica ubiquitária, ou seja, está amplamente disseminado no ambiente, como vegetação, água de rios, material em decomposição, esgoto, efluentes de fábricas, etc, é comum a silagem estar contaminada com *L. monocytogenes* (LOW & DONACHIE, 1997). Ela pode ser contaminada diretamente com as fezes dos animais domésticos ou silvestres, adubo utilizado na sua cultura (ex: silagem de milho) ou até mesmo material de aborto e cadáveres podem contaminar pastagens e culturas, portanto, é importante ter um destino adequado para este tipo de dejetos dentro das propriedades.

Wilesmith & Gitter (1986) observaram o aumento na incidência de listeriose no rebanho quando a silagem era introduzida na alimentação dos animais.

A associação da listeriose em animais com o inverno é devido ao confinamento, onde são expostos a uma alta contaminação do ambiente e à alimentação com silagem (LOW & DONACHIE, 1997). Atualmente, na criação intensiva, este tipo de produto faz parte do manejo alimentar de rebanhos. Quando animais que antes se alimentavam de pastagem passaram a receber silagem, observou-se um aumento na excreção de *L. monocytogenes* (FENLON et al., 1996).

PERRY & DONNELLY (1990) observaram a influência do pH na qualidade microbiológica da silagem. 13% das amostras com pH abaixo de 5.0 continham *Listeria* sp., já nas amostras com pH maior que 5.0, esse percentual subiu para 64%. A presença de bolores e leveduras pode influenciar na multiplicação do agente na silagem, já que elevam o pH do meio onde estão presentes (KALAC, 1982).

Animais alimentados com silagem contaminada podem ser portadores do agente e disseminá-la no rebanho, através das fezes e também no leite (PERY & DONNELLY, 1990; MANZANO et al., 1998; BOVILL et al., 2000).

Segundo Ho et al. (2007), a eliminação de *L. monocytogenes* nas fezes, em bovinos, pode variar com o tempo e está associada com a contaminação da silagem. A eliminação do agente pelas fezes pode ocorrer como parte de um surto ou ser eliminada esporadicamente. Comumente, subtipos isolados de infecções em humanos são também encontrados na silagem.

Um animal pode albergar mais de um sorotipo e a eliminação do agente nas fezes pode variar radicalmente de um dia para o outro.

Segundo Fenlon et al. (1996), o nível de contaminação da silagem não tem relação com o nível de eliminação do agente nas fezes.

Ho et al. (2007) em seu estudo, observaram que 56% dos animais tratados com medicamentos para ectoparasitas, neste caso a cipermetrina, passaram a eliminar *L. monocytogenes* nas fezes. Argumenta-se que a cipermetrina é imunodepressora e somado ao manejo dos animais, para aplicação do medicamento, seja um fator de estresse para os mesmos, ocasionando a eliminação do agente nas fezes.

Ho et al. (2007) também observaram também que a eliminação da bactéria nas fezes ocorre em pouco tempo após o consumo de silagem contaminada. A eliminação pode ocorrer no mesmo dia ou um dia após o consumo, indicando que não há infecção. Porém, alguns animais passaram a eliminar o agente 2 a 4 dias após o consumo do alimento contaminado, segundo o autor, este resultado indica que houve infecção. Ho et al. (2007) relatam que bovinos raramente se tornam portadores do agente por longo período e com eliminação diária. Saliente-se que também foram observados

animais eliminando *L. monocytogenes* nas fezes, não estando a silagem contaminada.

Ho et al. (2007) neste trabalho isolaram ribotipos de *L. monocytogenes* em fezes e silagem que haviam sido previamente associados com doença em humanos; isso demonstra a presença do agente no local de produção e a sua relação com doenças em humanos. Sendo esses animais destinados à produção de alimentos, a relação da transmissão do agente através de produtos de origem animal se torna mais evidente.

2.4 Animais silvestres

No modelo epidemiológico da *L. monocytogenes* nas propriedades rurais, existe uma contaminação do solo e culturas (tanto das culturas destinadas para a produção da silagem, como milho, assim como culturas destinadas ao consumo humano.) por animais silvestres e aves (NIGHTINGALE et al., 2004). Como determinadas culturas são utilizadas na produção de silagem, deve-se considerar estes animais como participantes e disseminadores da contaminação.

Zaytseva et al. (2007) encontraram roedores silvestres portadores do sorotipo 4b no leste da Rússia. Além dos roedores, encontraram também animais marinhos (estrela-do-mar), portadores do mesmo sorotipo. Outro dado importante obtido com este estudo, foram amostras positivas para *L. monocytogenes* do sorotipo 4b em pescado, água de rio e casos de aborto, evidenciando a importância dos animais silvestres na cadeia epidemiológica da doença.

2.5 Vias de transmissão para os animais

Para os animais a via mais importante é a oral. É através da silagem ou até mesmo pastagem contaminada com *L. monocytogenes* que os animais podem adquirir o agente (LOW & DONACHIE, 1997; NIGHTINGALE et al., 2004; Ho et al., 2007). A partir deste momento, eles se tornam disseminadores do microrganismo.

Outra rota é durante a ordenha. É importante que as boas práticas nesta operação sejam seguidas, já que *L. monocytogenes* pode causar mastite, tanto clínica como subclínica (JENSEN et al., 1996). Realizar a higienização dos tetos com soluções desinfetantes adequadas antes e após a ordenha (pré-dipping e pós-dipping), secagem dos tetos com papel-toalha descartável, higienização adequada de teteiras e equipamentos de ordenha, são ações indispensáveis para evitar a disseminação do agente pelo rebanho (FONSECA & SANTOS, 2000).

2.6 *Listeria monocytogenes* na indústria e nos alimentos

Esse microrganismo tem sido isolado de diversos alimentos em vários países do mundo, bem como no Brasil. A sua presença já foi relatada em leite cru e pasteurizado, queijos, carne bovina, suína, de aves, peixes, embutidos, carne moída de diferentes animais, produtos cárneos crus e termoprocessados, além de produtos de origem vegetal e refeições preparadas (DESTRO et al., 1991; MOURA et al., 1993; FRANCO, 1996; SILVA et al., 1998; DESTRO, 2000; HOFER et al., 2000; SILVA et al., 2001; SILVA et al., 2003). Segundo Schlech III (2000), os alimentos são reconhecidos como a principal fonte de transmissão de *L. monocytogenes* para o homem.

Com relação à carne e produtos cárneos, animais doentes ou não, que excretam *L. monocytogenes* nas fezes, podem contaminar o couro de outros animais nas propriedades ou durante o transporte. Essa contaminação do couro e a de origem fecal podem causar uma

contaminação cruzada de equipamentos e carcaças durante o abate e nas plantas de processamento (Ho et al.,2007).

Já nos produtos lácteos, o leite cru contaminado é uma importante rota de contaminação dentro da indústria de laticínios. Além disso, há a possibilidade de causar listeriose se for consumido cru (KOZAK et al., 1996).

L. monocytogenes proveniente de fezes, carcaças e material de aborto podem também contaminar água destinada à irrigação de culturas, vegetais e frutas destinados ao consumo humano, além de fertilizantes (Ho et al., 2007).

Uma vez dentro da indústria, este microrganismo é capaz de formar biofilmes. Biofilme é a capacidade de um microrganismo aderir a uma superfície através de uma matriz polissacarídica, podendo se localizar em diferentes locais dentro da indústria de alimentos, tais como encanamentos de água, superfícies de manipulação de alimentos, áreas de estocagem de alimentos, superfícies de processamento, tais como plástico e aço inoxidável.

Na indústria de alimentos, a formação de biofilme é importante devido à transferência de células bacterianas para os alimentos (GANDHI et al., 2006). Além da produção de biofilme, dentro da indústria pode haver a contaminação cruzada entre equipamentos, ambiente, trabalhadores e alimentos, tanto crus, como prontos para o consumo.

Barros et al. (2007) em seu estudo em açougues, encontraram *L. monocytogenes* em amaciadores, moedores, caixas plásticas utilizadas para armazenar carne *in natura*, piso, além de produtos como cortes, carcaças, lingüiça frescal e carne moída. Este estudo evidencia a contaminação de equipamentos e a possível contaminação cruzada do alimento, já que foi encontrado o mesmo sorotipo (1/2a) na carne moída e no moedor.

Peixes e frutos do mar também têm sido reconhecidos como veiculadores do patógeno. Entre 1998 a março de 1999, na União Européia, foram recolhidos do mercado produtos como salmão, peixe defumado, bacalhau entre outros, por estarem contaminados com *L. monocytogenes* (ROCOURT et al., 2000). McLauchlin (1996) relatou 03 casos de listeriose na Nova Zelândia, associados a mariscos defumados, prontos para o consumo.

Kozak et al. (1996) relataram uma incidência de 3-4% de espécies de *Listeria* em amostras de leite cru. Relataram também que na maioria das amostras as contagens eram inferiores a 10 UFC/mL. A pasteurização se mostrou eficiente, porém a contaminação pós-pasteurização deu-se a partir do ambiente, na planta de processamento.

McLauchlin (1996) relatou entre 1983 a 1988 nos Estados Unidos da América, Nova Zelândia e Inglaterra, casos de listeriose em humanos, onde o alimento incriminado era um tipo de queijo cremoso (“soft cheese”). Em todos os casos, o leite utilizado havia passado por algum tipo de tratamento térmico e submetido a um processamento após esse tratamento. Em todos os casos esse alimento foi consumido posteriormente sem qualquer tipo de cozimento.

Deve se ressaltar que mesmo a pasteurização sendo eficiente, hoje em dia em muitos países, inclusive no Brasil, ainda são produzidos produtos lácteos utilizando leite cru. Do ponto de vista da saúde pública, esse tipo de alimento é de extremo risco para a população, não somente pela possível presença de *L. monocytogenes*, mas também de outros patógenos de caráter zoonótico.

Entre 1998 e 2001, só nos Estados Unidos foram relatados 3 surtos de listeriose em diversos estados. Foram confirmados laboratorialmente 81 casos, sendo que deste total 16 eram recém-nascidos e 8 casos resultaram em aborto. Todos os casos foram associados a alimentos como queijos produzidos com leite cru, carne de peru e salsicha (CDC,2005) .

2.7 *Listeria monocytogenes* no ambiente doméstico

É importante salientar que este patógeno possui a capacidade, não só de sobreviver, mas também se multiplicar em temperatura de refrigeração. Outra característica importante é a formação de biofilme, portanto, deve-se considerar possível a sua presença em refrigeradores domésticos, aumentando o risco de contaminação cruzada de outros tipos de alimentos,

até mesmo daqueles já prontos para o consumo. Sergelidis et al. (1997) estudaram a prevalência de *Listeria* sp. em refrigeradores domésticos, varejistas e industriais, na Grécia. Encontraram 1,5% das amostras positivas para *L. monocytogenes*.

Em um outro estudo, onde o objetivo foi avaliar a contaminação do ambiente doméstico, foram analisadas amostras provenientes de compartimentos de frutas e verduras de refrigeradores, panos de prato e de escovas de dentes. Foi isolada *Listeria* sp. de 62,4% das amostras, deste total, 65,1% estavam contaminadas com *L. monocytogenes* (DUGGAN & PHILLIPS, 1998).

Mais recentemente, Jackson et al. (2007) na Irlanda, analisaram 342 refrigeradores domésticos e encontraram 1,2% contaminados com *L. monocytogenes*. Estes dados destacam a necessidade de melhor higienização no ambiente doméstico e principalmente, a conscientização da população para tais riscos.

2.8 Vias de transmissão para o homem

Para o homem, a via de transmissão mais importante é através dos alimentos de origem animal e até mesmo de origem vegetal. Uma extensa diversidade de alimentos tem sido relatada como responsáveis por surtos e casos esporádicos (MCLAUHLIN,1996).

Porém, outras vias são descritas. O contato direto com animais enfermos, na maioria dos casos com bovinos, pode resultar em infecção cutânea em fazendeiros e veterinários que não têm uma proteção adequada.

Foram registrados também alguns surtos nosocomiais não associados a alimentos, a maior parte em berçários. Há relatos de infecção do neonato no canal do parto, onde pode existir a presença do microrganismo na cérvix (MCLAUHLIN,1996). Outra forma relatada foi através de transplante de órgãos (LIMAYE, 1998).

2.9 Listeriose no homem

O período de incubação da listeriose é, em média, de 3 a 4 semanas, com uma variação de 3 a 90 dias. As pessoas com maior risco de adquirir listeriose são gestantes, crianças e recém-nascidos, idosos e indivíduos imunossuprimidos. (KONEMAM, 2001).

Bloqueadores de receptores de Histamina (H_2), antiácidos, laxantes e úlcera gástrica mostraram promover a doença, indicando que o ácido gástrico tem um efeito protetor contra a infecção. Outro fator importante é o ferro, que parece promover a virulência de *L. monocytogenes* (DIMAIO, 2000).

O intestino é o ponto de entrada de *L. monocytogenes* no organismo, através das células epiteliais do ápice das microvilosidades. Elas se difundem não só pelo interior destas células, como também de uma célula para outra. Na fase seguinte, são ingeridas por macrófagos, porém não induzem uma resposta inflamatória significativa. Dentro dos macrófagos elas se encontram protegidas dos leucócitos polimorfonucleares (FRANCO, 1996).

Os fatores de virulência que parecem estar associados à patogenicidade de *L. monocytogenes* são:

Listeriolisina O (LLO): é uma hemolisina determinante da patogenicidade desta espécie bacteriana. A sua função provável é mediar a lise dos vacúolos que contém as células bacterianas.

Fosfolipases: hidrolisam os lipídios da membrana, causando a ruptura da célula.

p60: é uma proteína secretada por *L. monocytogenes* e parece estar associada à capacidade invasiva da bactéria.

Internalina: é uma proteína envolvida no mecanismo de invasão da célula do hospedeiro (FRANCO, 1996).

Em pessoas saudáveis, a infecção por *L. monocytogenes* pode ser assintomática ou causar uma doença leve, com sintomas semelhantes a uma gripe, com ou sem febre (RYSER & MARTH, 1999). Ao contrário, em pessoas imunocomprometidas (pacientes com câncer, com AIDS, diabéticos, receptores de transplante de órgãos e pessoas que submetem-se

à hemodiálise), bem como em mulheres grávidas, recém-nascidos e idosos, o agente pode causar infecções graves, com elevadas taxas de letalidade (ROCCOURT & BILLE, 1997).

Clinicamente a doença pode se manifestar como septicemia, infecção do sistema nervoso central, gastrointestinal, focal, neonatal, placentária e endocardite (DIMAIO, 2000; DOGANAY, 2003).

Durante a gravidez, a infecção é frequentemente observada no terceiro trimestre. Entretanto pode se manifestar em qualquer estágio da gestação (DIMAIO, 2000; KONEMAM, 2001; DOGANAY, 2003).

L. monocytogenes tem predileção pela placenta, onde frequentemente não é alcançada pelo sistema imunológico. Os sinais de infecção intra-uterina são: diarreia, náusea, dor nas costas, dor abdominal e sangramento vaginal (DIMAIO, 2000). A única prova diagnóstica costuma ser o hemocultivo positivo. Em alguns casos a infecção pode ser mais grave, resultando em septicemia e meningite, ou então, precipitar o trabalho de parto resultando em feto morto ou prematuro infectado (p.ex. granulomatose infantil séptica). A infecção quase sempre envolve placenta e membranas fetais (KONEMAM, 2001).

Nas infecções do neonato, a doença é geralmente diagnosticada 1 a 2 semanas pós-parto. O modo de transmissão provavelmente é o canal do parto ou infecção nosocomial (DIMAIO, 2000).

Nos casos de infecção de gestantes por *L. monocytogenes*, mais de 90% dos fetos são afetados e acima de 22% dos casos de listeriose resultam em aborto ou morte do neonato (DIMAIO, 2000; DOGANAY, 2003).

2.10 Listeriose no Brasil

No Brasil há uma séria deficiência no diagnóstico e notificação de surtos de listeriose, mesmo sendo esta obrigatória pelo corpo médico, tanto na rede pública quanto na rede privada.

É importante salientar que no Brasil a listeriose não é, na maioria das vezes, diagnosticada na gravidez, como em outras manifestações clínicas, pois a sintomatologia é confundida com outras doenças, além da cultura e isolamento do agente não serem considerados exames de rotina. Tal fato, provavelmente, impeça a avaliação da importância de *L. monocytogenes* na saúde pública em nosso país (SCHWAB et al., 2003).

Não há relato de surtos de listeriose pelo Ministério da Saúde, porém há vários relatos de casos clínicos na literatura.

Hofer et al., no período entre 1969 e 2000, analisaram 266 amostras de material clínico, como líquido cefalorraquidiano, sangue, sangue de transplantados renais, fezes, secreção vaginal, adenite, lesões cutâneas e fígado. Essas amostras eram provenientes dos estados de Pernambuco, Bahia, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, sendo a grande maioria das amostras (201), provenientes de São Paulo e Rio de Janeiro. Deste total, 245 amostras foram positivas para *L. monocytogenes*, com predominância do sorotipo 4b (154) em todos os estados (exceto Bahia), seguido do sorotipo 1/2a (74). O sorotipo 1/2a sobressaiu nos estados do Paraná e Bahia.

Esses dados revelam a necessidade da conscientização das equipes médicas para o diagnóstico da doença. Somente com o diagnóstico do agente será possível realizar uma investigação epidemiológica, que deverá ser conduzida de forma adequada, possibilitando identificar o alimento responsável por veicular o patógeno. Inúmeros estudos já demonstraram a ocorrência de *L. monocytogenes* em alimentos e material clínico em nosso país, porém não existem estudos que identifiquem o alimento como veiculador do agente, resultando em infecção.

3. Objetivos

Considerando a carência de dados no Brasil sobre isolamento e enumeração de *L. monocytogenes* em produtos de origem animal, os objetivos deste trabalho foram:

- Avaliar a ocorrência de *L. monocytogenes* em uma gama variada de alimentos, tanto frescos como naqueles submetidos a algum tipo de tratamento térmico, ambos com ampla aceitação do mercado consumidor.
- Quantificar *L. monocytogenes* em alguns destes produtos, de modo a contribuir na formação de um banco de dados sobre o nível de contaminação dos alimentos por este patógeno no Brasil.
- Avaliar a influência da contaminação das amostras por coliformes à 35°C e *Escherichia coli* no isolamento e enumeração de *L. monocytogenes*.

4. Material e Métodos

4.1 Material

A pesquisa foi desenvolvida inicialmente com amostras de alimentos encaminhadas ao Serviço de Orientação à Alimentação Pública (SOAP) e, em uma segunda fase, com amostras colhidas no comércio varejista de Botucatu, SP.

No total foram analisadas 243 amostras, sendo 192 do SOAP e 51 do varejo.

a) Amostras encaminhadas ao Serviço de Orientação à Alimentação Pública (SOAP).

O SOAP é um serviço criado pela disciplina de Inspeção Sanitária de Alimentos de Origem Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus de Botucatu, e tem como objetivo analisar amostras de alimentos encaminhadas por indústrias, comércio varejista e público em geral. Todas as amostras recebidas pelo SOAP durante o período de 28/06/2006 a 10/02/2008 e que tinham como solicitação a pesquisa de *L. monocytogenes* foram utilizadas no presente estudo.

A relação completa dos tipos e número de amostras analisadas encontra-se na Tabela 01.

b) Amostras do comércio varejista.

Neste caso, optou-se por alimentos que haviam mostrado uma maior ocorrência de resultados positivos para *L. monocytogenes* nas amostras encaminhadas ao SOAP. Além disso, procurou-se trabalhar com produtos de amplo consumo pela população, especialmente aquele pronto para o consumo.

As amostras foram colhidas no período de 04/07/2007 a 10/02/2008 no comércio varejista de Botucatu, SP, acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e

transportadas ao Laboratório de pesquisas da disciplina de Inspeção da FMVZ, UNESP para a realização das análises. A relação dos tipos e número de amostras analisadas, nesta segunda fase do experimento, encontra-se na Tabela 02.

Houve uma variação no número de amostras de cada tipo de produto, pois nem sempre os mesmos eram encontrados no varejo.

TABELA 1: Tipo e número total de amostras encaminhadas ao Serviço de Orientação à Alimentação Pública (SOAP), para pesquisa de *L. monocytogenes*.

Amostras	Nº de amostras analisadas
<i>Produtos in natura</i>	
Carne bovina	24
Carne suína	18
Coração bovino	3
Pescado	12
Joelho/Rabo/Pé suíno	4
Barriga suína	2
Espetinho de carne bovina	3
Espetinho de carne de frango	2
Espetinho de coração	2
Espetinho de carne suína	2
Miúdos	1
<i>Embutidos de massa crua</i>	
Lingüiça frescal	12
Lingüiça de carne de frango	1
Salame tipo Italiano	1
<i>Produtos curados defumados</i>	
Lingüiça calabresa	14
Costela suína defumada	2
Cupim defumado	1
Picanha defumada de bovino	1
Bacon	11
<i>Produtos curados não cozidos</i>	
Carne seca	1
Jerked Beef	6
<i>Embutidos de massa cozida</i>	
Lombo temperado	9
Kassler	1
Lombo canadense	1
Fiambre	1
Pollo	1
Salsicha	13
Salsicha branca	2
Salsichão	3
Mortadela	7
Mortadela branca	1
Mortadela de Frango	2
Rosbife	1
Paio	3
Outros embutidos	4
<i>Embutidos de massa escaldada</i>	
Morcela	2
<i>Produtos curados cozidos</i>	
Presunto	5
Presunto defumado de frango	1
Apresentado	4
<i>Derivados de leite</i>	
Queijo mussarela	1
Queijo tipo Prato	1
<i>Outros</i>	
Envoltório	2
Salmoura tratada	2
Salmoura filtrada	2
Total	192

TABELA 2: Tipo e número total de amostras colhidas no comércio varejista de Botucatu, SP para pesquisa e enumeração de *L. monocytogenes*.

Amostra	Nº de Amostras Analisadas
Lingüiça de Pernil	5
Lingüiça Toscana	5
Lingüiça Calabresa	5
Coração a Granel	1
Espetinho de Coração	4
Espetinho de Frango	3
Espetinho de Carne Bovina	4
Salsicha Hot Dog a Granel	5
Salsicha Hot Dog	5
Jerked Beef	3
Charque	2
Presunto Cozido	5
Lombo Temperado	4
Total	51

4.2 Metodologia

Nas amostras referentes à rotina do Serviço de Orientação à Alimentação Pública, foi realizado somente o isolamento de *L. monocytogenes*; já nas amostras coletadas no comércio varejista, foi realizado o isolamento e a enumeração do patógeno, além da enumeração de coliformes a 35°C e *E. coli*.

Para o isolamento e enumeração de *L. monocytogenes* foi utilizada a metodologia preconizada pelo International Standard Organization ISO 11290-1 e ISO 11290-2, respectivamente (Figura 01). Para as amostras da

rotina, a metodologia foi modificada, sendo a pesquisa do patógeno realizada em 10g do produto.

4.2.1 Enumeração de *Listeria monocytogenes*

Na enumeração, 25g das amostras foram submetidas a um enriquecimento seletivo primário em 225mL de caldo (1:9) Half Fraser (Oxoid) sem suplemento, com incubação realizada a 20°C por 1 hora; a seguir, 0,1mL da cultura foi semeada por superfície com o auxílio de um bastão em “L” em placas de ágar ALOA (Agar Listeria Ottaviani Agosti, Biolife), incubadas posteriormente a 35°C/24h. Após este período, as colônias presuntivas foram enumeradas e submetidas à confirmação bioquímica, descrita posteriormente.

4.2.2 Isolamento de *Listeria monocytogenes*

a) Enriquecimento seletivo primário e secundário

Após retirar a alíquota de 0,1mL para realização da enumeração, foi realizado o enriquecimento seletivo primário, adicionando-se à cultura o suplemento do caldo Half Fraser, sendo a incubação realizada a 30°C por 24 horas. A seguir realizou-se o enriquecimento seletivo secundário, transferindo-se 0,1 mL do caldo Half Fraser para tubos contendo 10 mL de caldo Fraser (Oxoid), incubados a 35°C por 48 horas.

b) Isolamento em ágar seletivo

Tanto do enriquecimento seletivo primário como do enriquecimento seletivo secundário, foi retirado uma alíquota de 0,1mL e semeados por espalhamento em superfície, com o auxílio de um bastão em “L”, em ágar ALOA (Agar Listeria Ottaviani Agosti, Biolife) e em ágar Oxford modificado (Oxoid), sendo as placas incubadas a 35°C por 24-48 horas.

c) Identificação presuntiva das colônias suspeitas de *Listeria* sp.

No ágar Oxford modificado (Oxoid) as colônias de *Listeria* sp. apresentam coloração negra com presença de halo também negro, referente à hidrólise da esculina. No ágar ALOA (Agar Listeria Ottaviani Agosti, Biolife) as colônias apresentam coloração verde-azulada com presença de halo opaco.

Foram selecionados de 03 a 05 colônias características em ambos os ágares e transferidos, para purificação das colônias, em placas de ágar soja tripticase com 0,6% de extrato de levedura (TSA–YE), incubadas a 37°C por 24 horas, sendo então examinadas sob luz transmitida a 45° (método de Henry). As colônias suspeitas com características de aspecto de vidro moído e coloração azulada foram submetidas à identificação bioquímica.

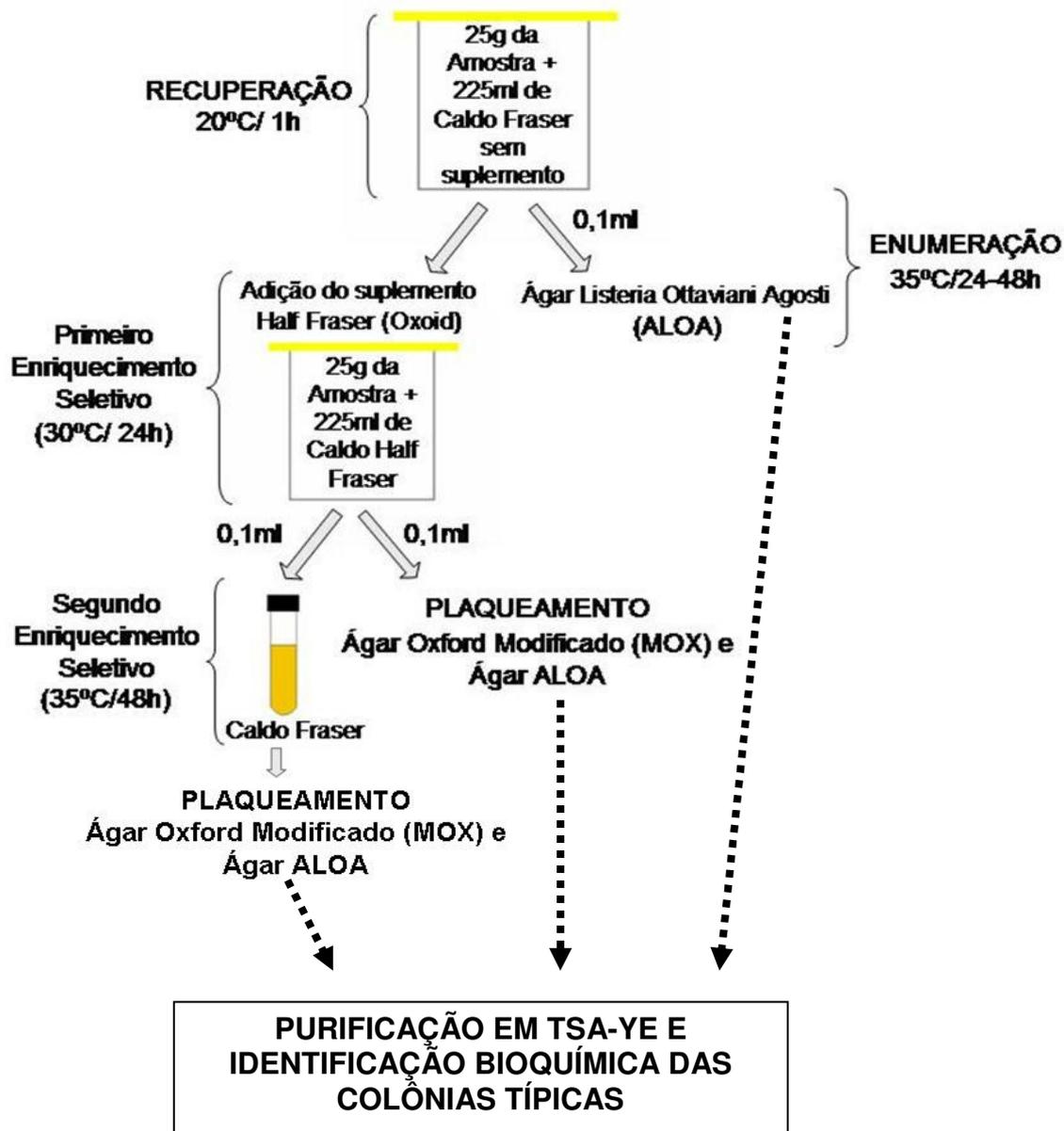


FIGURA 1. Metodologia preconizada pelo International Standard Organization ISO 11290-1 e ISO 11290-2 para Enumeração e Isolamento de *Listeria monocytogenes*.

4.2.3 Identificação bioquímica das colônias isoladas

Para identificação bioquímica uma colônia característica (aspecto de vidro moído e coloração azulada) de cada placa de TSA-YE foi selecionada e estocada em tubos contendo TSA-YE. A partir dos tubos, foram realizados os testes bioquímicos de reação de catalase, fermentação de carboidratos, e teste de verificação de hemólise e outros testes complementares como coloração de Gram e teste de motilidade. Todas as provas foram realizadas na presença de um controle positivo (*L. monocytogenes* ATCC 7644), para descartar qualquer falha dos reagentes ou preparo dos meios de cultura.

a) Coloração de Gram

Foi realizada a coloração de Gram das colônias isoladas, segundo Silva et al (1997). A observação de bastonetes curtos, Gram-positivos, isolados ou em cadeias, foi considerado sugestivo de *Listeria* sp.

b) Reação de Catalase

Verificou-se a produção de catalase através da adição de peróxido de hidrogênio (3%) sobre a colônia bacteriana no meio TSA-YE, previamente incubado a 35°C por 24 horas. A produção de bolhas foi indicativo de positividade da reação. Colônias de *Listeria* sp. são produtoras de catalase, portanto, produzem bolhas quando em contato com o peróxido de hidrogênio.

c) Fermentação de Carboidratos

Para verificar a fermentação dos carboidratos, uma colônia de cada placa de TSA-YE foi selecionada e transferida para placas contendo ágar púrpura de bromocresol (Difco) adicionado dos carboidratos (1%), xilose (INLAB, Brasil), dextrose (INLAB, Brasil), manitol (Difco) e ramnose (VETEC, Brasil). As soluções dos açúcares foram esterilizadas por membrana filtrante (poro 0,2µm, Sartorius Cellulose Acetate Filter). As placas foram incubadas a 35 °C por 24 -48 horas. A fermentação do carboidrato era indicada pela mudança de cor do indicador, de púrpura para amarelo (PAGOTTO et al., 2005). Para a identificação da espécie bacteriana, empregaram-se as características listadas por Pagotto et al. (2006) (Tabela 03).

TABELA 3. Características bioquímicas das espécies do gênero *Listeria*

Espécie	Carboidratos				β-Hemólise
	Dextrose	Xilose	Ramnose	Manitol	
<i>L. monocytogenes</i>	+ ^a	-	+	-	+ ^b
<i>L. innocua</i>	+	-	d ^a	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	+	-	-	+
<i>L. ivanovii</i>	+	+	-	-	+ ^c
<i>L. welshimeri</i>	+	+	d	-	-
<i>L. grayi</i>	+	-	-	+	-
<i>L. murrayi</i>	+	-	d	+	-

a Símbolo padrão: +, ≥ 90% positivo; -, ≥90% negativo; d, 11-89% das cepas são positivas.

b Nem todas as cepas de *L. monocytogenes* exibem β-hemólise – a cepa ATCC 15313 não é hemolítica em sangue de cavalo, carneiro e bovino.

c Um halo fraco ou múltiplos halos de hemólise usualmente são exibidos pelas cepas de *L. ivanovii*.

d) Teste de Motilidade

As colônias características provenientes dos tubos de TSA-YE foram inoculadas por picada, no centro do meio de cultura, até uma distância de 1 cm do fundo do tubo. Foi utilizado ágar semi-sólido, em tubos, específico para teste de motilidade (GI Motility Medium Difco). Os tubos foram incubados a 25°C por até 07 dias, sendo realizadas observações diárias. O gênero *Listeria* apresenta motilidade e desenvolve uma zona de migração típica, espalhando-se na parte superior do meio, devido as suas características microaerófilas, e mantendo-se restrito ao local da picada no fundo do tubo. Esse tipo de multiplicação característico se assemelha a um guarda-chuva.

e) Teste de verificação de Hemólise

As colônias características foram estriadas em ágar sangue eqüino, para observação da capacidade de hemólise. Foi utilizado como base TSA-YE, adicionado de 5% de sangue estéril de cavalo desfibrinado. Após inoculação, as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas.

4.2.4 Contagem de Coliformes a 35°C e *Escherichia coli*.

De cada amostra foram coletados 25g e diluídos em 225mL de água peptonada a 0,1%. Desta diluição, 1mL foi semeado em Petrifilm EC (3M), sendo as placas incubadas a 35°C por 48h. Após esse período foi realizada a leitura, considerando-se as colônias de coloração azul e com presença de gás como *Escherichia coli* e as colônias avermelhadas e com presença de gás, acrescidas das colônias azuis com gás, como coliformes totais, independente do tamanho da mesma e intensidade da coloração.

4.2.5 Análise Estatística

Utilizou-se o Teste de Spearman, com um nível de significância de 5%, para verificar a ocorrência de uma associação entre as contagens de coliformes a 35°C e *E. coli* e a presença/ausência de *L. monocytogenes* nas amostras colhidas no comércio varejista de Botucatu, SP.

5. Resultados e Discussão

Os resultados referentes às amostras encaminhadas ao SOAP e às amostras colhidas no comércio varejista encontram-se nas Tabelas 04 e 05 respectivamente.

TABELA 4. Amostras enviadas ao SOAP: tipo, número total analisado e número de amostras positivas para *L. monocytogenes*.

Amostras	Nº de amostras analisadas	Nº de amostras positivas para <i>L. monocytogenes</i> (%)
<i>Produtos in natura</i>		
Carne bovina	24	0 (0)
Carne suína	18	0 (0)
Coração bovino	3	0 (0)
Pescado	12	0 (0)
Joelho/Rabo/Pé suíno	4	0 (0)
Barriga suína	2	0 (0)
Espetinho de carne bovina	3	2 (66,7)
Espetinho de carne de frango	2	1 (50)
Espetinho de coração	2	2 (100)
Espetinho de carne suína	2	0 (0)
Miúdos	1	0 (0)
<i>Embutidos de massa crua</i>		
Lingüiça frescal	12	4 (33,4)
Lingüiça de carne de frango	1	0 (0)
Salame tipo Italiano	1	0 (0)
<i>Produtos curados defumados</i>		
Lingüiça calabresa	14	0 (0)
Costela suína defumada	2	0 (0)
Cupim defumado	1	0 (0)
Picanha defumada de bovino	1	0 (0)
Bacon	11	1 (9)
<i>Produtos curados não cozidos</i>		
Carne seca	1	0 (0)
Jerked Beef	6	1 (16,7)
<i>Embutidos de massa cozida</i>		
Lombo temperado	9	1 (11,1)
Kassler	1	1 (100)
Lombo canadense	1	0 (0)
Fiambre	1	0 (0)
Pollo	1	0 (0)
Salsicha	13	1 (7,7)
Salsicha branca	2	0 (0)
Salsichão	3	0 (0)
Mortadela	7	0 (0)
Mortadela branca	1	0 (0)
Mortadela de Frango	2	0 (0)
Rosbife	1	1 (100)
Paio	3	0 (0)
Outros embutidos	4	0 (0)
<i>Embutidos de massa escaldada</i>		
Morcela	2	0 (0)
<i>Produtos curados cozidos</i>		
Presunto	5	0 (0)
Presunto defumado de frango	1	0 (0)
Apresentado	4	0 (0)
<i>Derivados de leite</i>		
Queijo mussarela	1	0 (0)
Queijo tipo Prato	1	0 (0)
<i>Outros</i>		
Envoltório	2	0 (0)
Salmoura tratada	2	0 (0)
Salmoura filtrada	2	0 (0)
Total (%)	192 (100)	15 (7,8)

5.1 Amostras encaminhadas ao SOAP

Das 192 amostras analisadas, 183 eram de produtos que foram submetidos a algum tipo de processamento, sendo que *L. monocytogenes* foi detectada em 15 (7,8%) delas. Segundo Jay (1996), são estes os alimentos que apresentam uma maior contaminação pelo patógeno. Em uma compilação de dados, oriundos de 09 países, referentes a diferentes produtos cárneos processados, observou-se, segundo este autor, uma ocorrência de 16% de amostras contaminadas por *L. monocytogenes*, superior, portanto, à encontrada em nosso trabalho.

Das 48 amostras de embutidos cozidos encaminhadas ao Serviço, quatro foram positivas para *L. monocytogenes*, sendo uma de salsicha tipo aperitivo, uma de lombo temperado, uma de kassler e uma de rosbife (Beef Lunch). Uma característica importante com relação a esses produtos é o processo de cozimento. Eles são comercializados de forma a serem consumidos sem qualquer tipo de tratamento térmico domiciliar, o que torna o resultado encontrado preocupante do ponto de vista de saúde pública.

No caso das amostras de lombo temperado e kassler, onde isolou-se o patógeno, deve-se salientar que tais produtos são produzidos exclusivamente com carne suína. Jay (1996) em uma compilação de dados de diversos países encontrou uma positividade de 20% de *L. monocytogenes* em carne suína, tendo esta sido detectada na carne *in natura*, triturada, moída, no presunto cozido e em lingüiças.

Mataragas et al. (2008) analisando o perfil de risco de carne suína, encontraram uma prevalência de *L. monocytogenes* em 12,3% das amostras durante o processamento, 9,9% das amostras de carne *in natura* ofertadas no varejo e 3,2% das amostras de produtos prontos para o consumo.

Em outro estudo, em uma indústria onde se realizava o abate e a produção de produtos cárneos de suínos, encontrou-se 10% dos produtos finais, tanto frescos quanto curados, e menos que 10% das carnes processadas utilizadas na elaboração desses produtos, contaminados com *L. monocytogenes*. O patógeno também foi encontrado nos equipamentos

de processamento, sendo o triturador um dos locais onde a contaminação foi detectada (LÓPEZ et al., 2008).

Todos estes dados mostram que a contaminação pode ter tido origem na matéria-prima empregada na elaboração dos produtos, ou ter se originado do ambiente, e, por processos de contaminação cruzada, permanecido no produto final a ser entregue ao comércio varejista.

Em relação às salsichas, das 18 amostras analisadas, somente uma mostrou-se positiva para *L. monocytogenes*, resultado inferior ao descrito por Pettinatti et al. (2006), em trabalho também realizado em nosso país. Estes pesquisadores analisaram 394 amostras de salsicha tipo “Hot Dog” e o patógeno foi encontrado em 56 amostras, sendo que 41,2% das cepas isoladas pertenciam ao sorotipo 1/2a e 1/2c e 17,6% ao sorotipo 4b, este último mais comumente associado à doença em humanos e animais.

Os produtos de salsicharia podem ser compostos por carnes de diferentes espécies de animais de açougue, carne mecanicamente separada (CMS), além de miúdos (estômago, coração, língua, rins, miolos, fígado). A matéria-prima, também neste caso, pode ter sido a origem da contaminação do produto final. Em relação à CMS, saliente-se que Chiarini (2007) ao analisar este tipo de produto, detectou a sua contaminação por *L. monocytogenes* em dois matadouros de aves no Brasil. Além da CMS, carcaças, equipamentos, utensílios e mão dos manipuladores estavam contaminados. Outro dado importante foi a presença do mesmo perfil genético ao longo de toda a linha de processamento. Esse dado mostra que o patógeno foi capaz de se manter no ambiente de processamento. Sendo a CMS utilizada na elaboração de salsichas, esta pode ser uma importante fonte de contaminação dentro da indústria de embutidos.

Nas amostras de lingüiça frescal, duas (16,7%) das 12 amostras analisadas encontravam-se contaminadas por *L. monocytogenes*, resultado este inferior aos encontrados por Barros et al. (2007) e De Cesare et al. (2007), que detectaram o patógeno em 22,2% e 38,9% dos produtos pesquisados, respectivamente.

As lingüiças são definidas como produtos cárneos industrializados, obtidos de carnes de animais de açougue, adicionadas ou não de tecidos adiposos, ingredientes, embutidas em envoltório natural ou artificial e

submetidas a processo tecnológico adequado. Podem ser elaboradas exclusivamente a partir de carne suína ou serem mistas (BRASIL, 2000).

A matéria-prima, como já discutido anteriormente em relação à carne suína, pode ter um importante papel na origem da contaminação. Em relação à carne bovina, isto também pode ocorrer. No Brasil, por exemplo, Barros et al. (2007) encontraram 25,9% de carcaças bovinas contaminadas por *L. monocytogenes*. Estes autores também detectaram o patógeno no ambiente (piso) e equipamentos, tais como amaciador, moedor, serras e caixas plásticas de plantas processadoras de bovinos. Bonardi et al. (1997), na Itália, encontraram 01 carcaça contaminada com *L. monocytogenes* logo após a esfolagem. Além da contaminação pelo patógeno, encontraram 07 carcaças contaminadas com *L. innocua*, o que segundo Kathariou (2002), indica a probabilidade de contaminação por *L. monocytogenes*.

O encontro de *L. innocua* também foi relatado por Madden et al. (2000), em um estudo em matadouros bovinos no norte da Irlanda. Estes autores pesquisaram quatro diferentes patógenos, entre eles, *L. monocytogenes*. Das 200 carcaças analisadas, nenhuma estava contaminada com *L. monocytogenes*, porém encontraram 05 carcaças contaminadas com *L. innocua*.

Deve-se salientar que as lingüiças frescas são produtos de grande aceitação popular junto ao mercado consumidor brasileiro, e, muitas vezes, são consumidas mal passadas, hábito que aumenta o risco no caso de se encontrarem contaminadas, não só por *L. monocytogenes*, mas também por outros patógenos, como frequentemente tem se verificado em nosso país (THOMAZELLA, 2005).

Em relação ao Rosbife, embutido cozido, elaborado com carne bovina e suína, na única amostra analisada, detectou-se o patógeno. Como já discutido anteriormente, *L. monocytogenes* já foi isolada em plantas processadoras de carne suína e bovina, além dos produtos finais. Uyttendaele et al. (1999) na Bélgica, por exemplo, ao analisarem produtos cárneos cozidos, encontraram 4,9% das amostras contaminadas com o patógeno. O rosbife é comercializado pronto para o consumo, além de poder ser fatiado no varejo; mais uma vez, a contaminação pós-processamento e durante a manipulação são pontos críticos de controle neste tipo de produto.

Nas amostras de Jerked Beef, apenas uma (16,7%), das seis analisadas, apresentou-se contaminada em nosso estudo. Este é um produto elaborado com carne bovina e sofre um processamento de cura, salga e dessecação. Picchi (1999) avaliou a microbiota patogênica em Jerked Beef, e, em nenhuma amostra foi isolada *L. monocytogenes*; porém, 10,4% da carne bovina utilizada como matéria prima estava contaminada com o patógeno. Em outro estudo, também realizado por Picchi (2002), foi avaliada a sobrevivência de *L. monocytogenes* no produto embalado a vácuo. Mais uma vez, o patógeno não foi isolado de nenhuma amostra, mesmo daquelas que haviam sido inoculadas experimentalmente com cepas de *L. monocytogenes* (ATCC7644). Nos dois estudos conduzidos por Picchi (1998, 2002), um fator que talvez tenha contribuído para o não isolamento do patógeno tenha sido a metodologia utilizada. O autor analisou as amostras através do “swab” de superfície, metodologia esta, distinta da utilizada no presente trabalho.

Em relação ao bacon, das onze amostras analisadas, apenas uma (9%) foi positiva para *L. monocytogenes*, resultado inferior ao encontrado por Uyttendaele et al. (1999) na Bélgica. Em seu estudo, estes pesquisadores encontraram 18,3% de positividade. Porém, como discutido anteriormente, é evidente a presença deste patógeno em carnes *in natura* e principalmente no ambiente de processamento, sendo a contaminação cruzada, pós-processamento, de extrema importância para a inocuidade dos alimentos.

As amostras de espetinho de frango e coração de aves, bem como os de carne bovina, também apresentaram contaminação pelo patógeno. Em relação aos de carne bovina, das três amostras analisadas, duas (66,7%) estavam contaminadas com *L. monocytogenes*; nos espetinhos de frango, das duas amostras analisadas, em uma (50%) delas obteve-se o isolamento e nas duas amostras de espetinho de coração, ambas (100%) encontravam-se contaminadas. Estes tipos de produto, apesar da comercialização *in natura*, sofrem um processamento, ou seja, são temperados. Não existem muitos estudos sobre os mesmos, porém há relatos da presença do patógeno no ambiente de processamento e nas carnes *in natura* empregadas em sua elaboração, como já citado anteriormente. No Brasil, existe o hábito cultural de se preparar churrascos nas próprias residências,

sendo os espetinhos muito consumidos nestas ocasiões. A forma de preparo, isto é, se mal passados, pode permitir que células de *L. monocytogenes* permaneçam viáveis, constituindo-se em um risco para o consumidor.

A exemplo da carne bovina, a de aves também pode estar contaminada por *L. monocytogenes*. Em um estudo realizado no Brasil por Chiarini (2007), foram analisados dois matadouros de aves, o primeiro com evisceração automática e o segundo com processo manual; no primeiro (automático), foram encontrados 16,7% dos cortes resfriados e 50% dos cortes congelados contaminados com *L. monocytogenes*. Já no matadouro com evisceração manual, a contaminação foi maior em cortes resfriados (33,3%) em relação aos cortes congelados (16,7%). Neste mesmo estudo, em ambas as plantas, a maior ocorrência de produtos positivos para *L. monocytogenes* foi obtida em amostras coletadas após a etapa de resfriamento por imersão, na zona limpa do matadouro, indicando a possível disseminação do microrganismo neste local.

Também foi detectado o patógeno nos ganchos de pendura das carcaças, luvas de aço, afiadores de facas, facas, carrinhos e esteiras, entre outros equipamentos, além do piso e mãos dos manipuladores. Este estudo deixa patente a importância da contaminação cruzada dentro do ambiente de processamento, já que em toda a linha de processamento foi encontrado o mesmo perfil genético de *L. monocytogenes*.

Em Portugal, Mena et al. (2004) encontraram 60% dos frangos resfriados comercializados no varejo contaminados com *L. monocytogenes*; já Vitas et al. (2004), na Espanha, detectaram o patógeno em 36% das amostras de carne de frango colhidas no comércio varejista.

Gudbjörnsdóttir et al. (2004) analisando a frequência de *L. monocytogenes* em plantas processadoras de carne de aves nas Ilhas Faroé, Islândia, Finlândia, Noruega e Suécia, encontraram 8,3% das amostras de carne *in natura* e 22,2% das do produto final processado cru contaminados com o patógeno.

Também há relatos da contaminação em carne de frango triturada *in natura* comercializada em embalagem primária e a granel na Bélgica (UYTTENDAELE et al., 1999).

Todos estes dados ratificam a importância da matéria-prima e do ambiente de processamento na contaminação dos produtos por *L. monocytogenes*.

Em nosso estudo, as amostras de mortadela não apresentaram contaminação por *L. monocytogenes*. No entanto, pesquisa anterior realizada em nosso país por Bersot et al. (2001), com amostras colhidas no varejo, detectou 08 amostras positivas para o patógeno em 30 analisadas, evidenciando a importância desses produtos na veiculação de *L. monocytogenes*, principalmente para a população de risco.

De modo similar à mortadela, as amostras de carne bovina e suína *in natura* não apresentaram nenhuma contaminação pelo patógeno; porém como já discutido anteriormente, são vários os estudos em que ela já foi evidenciada, tanto no caso de bovinos, suínos e de aves (BONARDI et al., 1997; PICCHI, 1999; UYTENDAELE et al., 1999; GUDBJÖRNSDÓTTIR et al., MENA et al., 2004; 2004; BARROS et al., 2007; CHIARINI, 2007; DE CESARE et al., 2007; MATARAGAS et al., 2008; LÓPEZ et al., 2008)

Outro fator importante a ser considerado é a forma de comercialização destes produtos. Quando refrigerados, as células do patógeno, se presentes, podem se multiplicar, aumentando ainda mais o risco para o consumidor.

Esta multiplicação poderá ocorrer tanto no varejo, como no ambiente doméstico, possibilitando a contaminação cruzada, através do ambiente, utensílios e manipuladores.

Outro produto que não apresentou contaminação pelo patógeno foi a morcela, um tipo de lingüiça elaborada com sangue coagulado. Entretanto há relatos na literatura em que *L. monocytogenes* foi detectada neste tipo de produto. Mena et al. (2004), por exemplo, em Portugal, encontraram 11,1% das amostras contaminadas. Na Bélgica, resultado idêntico foi relatado por Uyttendaele et al. (1999), com 11,1% de positividade nas morcelas vendidas a granel e 8,76% nas comercializadas em embalagem primária.

No tocante aos produtos lácteos analisados em nosso estudo, as duas amostras de queijo mostraram-se negativas para *L. monocytogenes*. A literatura, no entanto, registra que o leite e seus derivados possuem um papel de destaque na veiculação do patógeno. Sua importância já foi

comprovada pelo seu envolvimento em diversos surtos no mundo (DONNELLY, 2001; RYSER & MARTH, 1999). *L. monocytogenes* já foi isolada de queijos elaborados com leite pasteurizado (MENA et al., 2004), além do ambiente de processamento (KOZAK et al., 1996). Destro et al. (1991) encontraram 5% das amostras de queijos, comercializadas em Campinas-SP, contaminados com *L. monocytogenes*. Um importante fator contribuinte para a contaminação cruzada deste produto é o fatiamento no varejo. Nesse processo, o queijo pode contaminar-se a partir das superfícies de contato e, ao ser mantido sob refrigeração até o momento do consumo, são dadas condições para a multiplicação das células do patógeno, aumentando o risco para o consumidor (REIJ & AANTREKKER, 2004; GANDHI et al., 2006).

5.2 Amostras do Comércio Varejista da Região de Botucatu-SP.

TABELA 5. Amostras do comércio varejista de Botucatu-SP: tipo, número total analisado e número de amostras positivas para *L. monocytogenes*.

Amostra	Nº de Amostras Analisadas	Nº de Amostras positivas para <i>L. monocytogenes</i> (%)
Lingüiça de Pernil	05	04 (80)
Lingüiça Toscana	05	02 (40)
Lingüiça Calabresa	05	01 (20)
Coração a Granel	01	01 (100)
Espetinho de Coração	04	04 (100)
Espetinho de Frango	03	02 (66,7)
Espetinho de Carne Bovina	04	02 (50)
Salsicha Hot Dog a Granel	05	02 (40)
Salsicha Hot Dog	05	0
Jerked Beef	03	0
Charque	02	0
Presunto Cozido	05	0
Lombo Temperado	04	0
Total (%)	51 (100%)	18 (35,3%)

Os resultados referentes às amostras colhidas no comércio varejista de Botucatu encontram-se na Tabela 5.

Pode-se observar que 18 (35,3%) das 51 amostras analisadas encontravam-se contaminadas por *L.monocytogenes*.

As lingüiças frescas de pernil e do tipo Toscana foram as que apresentaram o maior número de resultados positivos, já que das dez amostras analisadas, seis (60%) encontravam-se contaminadas por *L. monocytogenes*, sendo quatro lingüiças de pernil e duas lingüiças tipo Toscana. Tais resultados são superiores aos descritos por Barros et al.

(2007) no Brasil e De Cesare et al. (2007) na Itália, que detectaram 22,2% e 38,9% das amostras contaminadas pelo patógeno, respectivamente.

Silva et al. (2004) em estudo realizado em plantas processadoras de lingüiça frescal mista, em Pelotas, RS encontraram *L. monocytogenes* em 33,3% das amostras de carne bovina, 33,3% de carne suína e em 20% das amostras de gordura suína. Detectaram o patógeno também em equipamentos, tais como trituradores (33,3%), misturadores (50%) e embutideiras (25%). O encontro de equipamentos contaminados por *L. monocytogenes*, bem como produtos finais, tanto frescos como curados, em uma indústria que realizava tanto o abate dos animais como também a elaboração de derivados cárneos, também foi descrito por López et al. (2008), na Espanha.

Estes estudos evidenciam a possibilidade de contaminação cruzada no ambiente de processamento, bem como a capacidade deste patógeno de produzir biofilme, com reflexos na contaminação do produto final (REIJ & AANTREKKER, 2004; GANDHI et al., 2006).

Isto foi bem evidenciado por Nesbakken et al. (1996), ao analisarem amostras provenientes de cestos de descarte, carne desossada, carne resfriada, ambiente de processamento e produto final (carne curada desidratada), em seis diferentes estabelecimentos na Noruega. Estes autores detectaram *L. monocytogenes* com o mesmo perfil genético em quatro das seis plantas, tendo a mesma sido isolada da carne resfriada, carne *in natura*, ambiente de processamento e cestos de descarte. Nas outras duas plantas, os isolados também apresentaram o mesmo perfil genético, mas o patógeno não foi encontrado na carne *in natura*. Outro dado importante neste trabalho foi a detecção de cepas colonizando a planta de processamento, com o mesmo perfil genético de isolados anteriores, configurando a sua persistência no ambiente por pelo menos quatro anos.

É importante ressaltar que mesmo as lingüiças frescas sendo consumidas mediante tratamento térmico, em nosso país, como já discutido anteriormente, há o hábito cultural do churrasco, que possibilita o consumo deste produto mal passado. Um aquecimento insuficiente pode possibilitar a manutenção de células viáveis no alimento, que se consumido por indivíduos dos chamados “grupos de risco” pode ter reflexos danosos à saúde,

podendo levar inclusive à morte dos indivíduos. Outro fator a ser considerado é a contaminação cruzada que pode ocorrer no ambiente doméstico, já que as lingüiças frescas podem carrear o patógeno para as cozinhas e, aí, ocorrer a sua disseminação para outros alimentos. Ao preparem uma refeição, grande parte dos consumidores não tem consciência ou conhecimento de que produtos cárneos crus devem ser manipulados após o preparo de alimentos que serão consumidos crus, como legumes e vegetais, ou de alimentos já prontos para o consumo. Além disso, aconselha-se a não utilização de utensílios onde anteriormente foram manipuladas carnes cruas, sem que tenha havido uma higienização correta dos mesmos. Tais cuidados são fundamentais para que o processo de contaminação cruzada não ocorra (REIJ & AANTREKKER, 2004; GANDHI et al., 2006).

Diferentemente das lingüiças frescas, em relação às lingüiças calabresas analisadas, das cinco amostras analisadas, apenas uma (20%) foi positiva para *L.monocytogenes*. Este resultado foi semelhante ao encontrado por Thévenot et al. (2005). Estes pesquisadores em seu estudo analisaram 13 plantas de processamento de lingüiças curadas desidratadas na França.

A forma de processamento desses embutidos é semelhante ao da lingüiça calabresa, variando apenas na disponibilidade de alguns ingredientes e na etapa de fermentação, que ocorre anteriormente à dessecação. Das 30 amostras de produto final analisadas, 3 foram positivas para *L. monocytogenes*. Thévenot et al. (2005) atribuíram esse resultado ao tipo de processamento. Segundo eles, o nível de contaminação diminuía ao final do estágio de cura, e principalmente ao final do processo de desidratação. Verificaram também, que o produto final apresentava um pH inferior a 5.0 e a_w de 0,80, além de uma alta concentração de sal. Com relação à lingüiça calabresa, a dessecação ou desidratação contribui para a redução da a_w , além de aumentar também a concentração final de sal no produto. Estes fatores podem explicar a baixa ocorrência do patógeno neste tipo de produto.

Em lingüiças defumadas, produto semelhante à lingüiça calabresa, Mena et al. (2004) também não isolaram *L. monocytogenes* nas amostras

pesquisadas, porém, na análise da planta de processamento, antes de serem iniciadas as atividades, encontraram 15,1% dos equipamentos contaminados com *L. monocytogenes*, sendo que esta proporção aumentava para 50,9% durante os trabalhos. Estes mesmos pesquisadores encontraram uma taxa de 33,9% da carne crua contaminada pelo patógeno, sendo que esta se elevava para 71,6% nas amostras de carne triturada e lingüiças em processo de estufagem. Este estudo mostra a persistência de *L. monocytogenes* no ambiente de processamento, mesmo após a higienização, favorecendo a contaminação cruzada e formação de biofilmes.

Em termos gerais, portanto, apesar de utilizarem o mesmo tipo de matéria prima (carne suína, principalmente) em sua elaboração, as lingüiças frescas e aquelas que sofrem algum tipo de tratamento adicional (dessecamento, fermentação, por exemplo) diferem nos resultados referentes à contaminação por *L. monocytogenes*, sendo normalmente menores nestas últimas. Este resultado também foi encontrado por De Cesare et al. (2007), ao analisarem lingüiças frescas e fermentadas provenientes do comércio varejista no norte da Itália, sendo que nas lingüiças frescas encontraram uma prevalência de 38,9% contra 15,2% em lingüiças fermentadas.

Esta maior segurança, no entanto, está condicionada à aplicação das chamadas Boas Práticas de Fabricação (BPF), essenciais no controle da contaminação cruzada, como atestam os trabalhos já citados.

Em nosso estudo, a maior contaminação pelo patógeno foi encontrada nos produtos elaborados com carne de aves. Das oito amostras analisadas, sete (87,5%) foram positivas para *L. monocytogenes*, sendo uma amostra de coração a granel, quatro de espetinho de coração e duas de espetinho de carne de frango. Não encontramos dados na literatura sobre este tipo de produto, porém há relatos de alimentos processados e carne *in natura* de frango, contaminados com *L. monocytogenes*, como já discutido anteriormente (UYTTENDAELE et al., 1999; GUDBJÖRNSDÓTTIR et al., MENA et al., 2004; 2004; CHIARINI, 2007; MATARAGAS et al., 2008).

L. monocytogenes também foi isolada de duas (50%) das quatro amostras de espetinho de carne bovina. Estes tipos de produto, apesar da comercialização *in natura*, sofrem um processamento, ou seja, são

temperados. Não existem muitos estudos sobre os mesmos, porém há relatos da presença do patógeno no ambiente de processamento e nas carnes *in natura* empregadas em sua elaboração, como já citado anteriormente (BONARDI et al.,1997; KATHARIOU, 2002; BARROS et al., 2007).

É importante salientar que, em nosso caso, as amostras de espetinhos de coração e espetinhos de frango, além dos de carne bovina, eram provenientes de uma mesma indústria, havendo assim a possibilidade dos produtos terem se contaminado durante o processamento, a partir de isolados persistentes no ambiente da planta. Para confirmação dessa hipótese, no entanto, são necessários mais estudos, como sorotipagem das cepas, além da identificação de seu perfil genético, ferramentas indispensáveis para atestar a persistência do patógeno e a contaminação cruzada dos diversos produtos.

Em relação às amostras de salsicha tipo “hot dog”, *L. monocytogenes* foi isolada apenas daquelas comercializadas a granel. Das cinco amostras analisadas, duas (40%) estavam contaminadas com o patógeno. Este resultado evidencia mais uma vez a importância das BPF, já que o produto pode ter se contaminado a partir dos utensílios utilizados no varejo, ou até mesmo pelos manipuladores. Mesmo não isolando *L. monocytogenes* das amostras de salsichas comercializadas em embalagem primária, não se pode assegurar que estas também não cheguem ao varejo contaminadas pelo patógeno, já que o mesmo foi isolado em uma amostra encaminhada ao SOAP (Tabela 04). Só nos Estados Unidos da América (EUA), entre 1998 e 1999, ocorreram dois surtos de listeriose, onde o alimento incriminado era o “Hot Dog” (CDC, 2008).

Nas amostras de Jerked Beef e Charque também não foi detectado o patógeno, resultado coincidente ao encontrado por Picchi (1999, 2002). Este autor analisou amostras de Jerked Beef, a matéria-prima utilizada, e amostras inoculadas com o patógeno, porém só isolou *L. monocytogenes* na matéria-prima. Mesmo não apresentando contaminação, não devemos dar menos importância a este tipo de produto, já que no presente estudo em uma (16,7%) amostra de Jerked Beef encaminhada ao SOAP foi isolada *L. monocytogenes*.

Com relação às amostras de presunto fatiado e lombo temperado, também não foi detectada a presença do patógeno, porém, como discutido

anteriormente, há relatos na literatura de contaminação desses alimentos por *L. monocytogenes*. Na União Europeia em 2005, detectou-se este patógeno em 26,5% das amostras analisadas de produtos pronto para o consumo (NØRRUNG & BUNCIC, 2008), e nos Estados Unidos produtos cárneos, como presunto e lombo, têm sido responsáveis pela ocorrência de vários surtos, demonstrando a sua importância para a saúde pública (CDC, 2008).

5.3 Associação entre a presença de Coliformes a 35°C, *Escherichia coli* e detecção de *L. monocytogenes*.

Os resultados do Teste de Spearman que procurou medir esta associação encontram-se na Tabela 06.

TABELA 6. Medidas descritivas da contagem de Coliformes a 35°C e *E. coli* segundo a ocorrência de *Listeria monocytogenes*.

Grupo (Isolamento <i>L. monocytogenes</i>)	Nº de amostras	Correlação de Spearman (Coliformes a 35°C x <i>E. coli</i>)	P- valor
Negativo	33	0,531	p<0,005
Positivo	18	-0,411	p>0,05

Pode-se observar que no caso das amostras em que o patógeno não foi detectado, há uma correlação positiva e significativa estatisticamente ($p < 0,05$) entre as contagens de coliformes a 35°C e *E. coli*, ou seja, nestas amostras, as contagens de ambos os indicadores eram elevadas, sendo superiores a $2,5 \cdot 10^5$ UFC/g.

Ao contrário, nas amostras positivas para *L. monocytogenes*, esta correlação foi negativa, embora não significativa do ponto de vista estatístico ($p > 0,05$). Neste caso, as contagens de coliformes a 35°C eram elevadas, mas as de *E. coli* não.

Algumas considerações podem ser formuladas com base nos resultados desta análise estatística. Nas amostras negativas para o patógeno, as contagens dos indicadores ao serem elevadas poderiam estar exercendo alguma influência sobre *L. monocytogenes*, inibindo a sua multiplicação, por exemplo.

Aragon-Alegro (2007), ao estudar a influência dos coliformes sobre *L. monocytogenes* em queijo minas-frescal, relatou que quando ambos eram transferidos para um meio de cultura, as populações do patógeno eram mais baixas se comparadas àquelas detectadas quando somente ele estava presente na matriz inoculada experimentalmente. Verificou também que ao transferir 01 UFC/mL de *L. monocytogenes* para uma cultura de coliformes, não havia um aumento da população do patógeno, indicando que este, se presente em baixas concentrações, pode não ser isolado de alimentos que contêm uma microbiota competitiva, no caso os coliformes.

Em relação aos nossos dados, não parecem ser os coliformes a 35°C o grupo a estar exercendo essa ação inibitória, já que nas amostras em que as suas contagens foram as mais elevadas (espetinhos de coração), *L. monocytogenes* também foi detectada em grande número.

Essa ação poderia estar sendo exercida então por *E. coli*, já que no grupo de amostras que apresentaram resultados positivos para o patógeno, observou-se uma correlação negativa entre as contagens deste indicador e as de coliformes a 35°C, ou seja, as elevadas contagens desses últimos não foram acompanhadas por um aumento no número de colônias de *E. coli*. Essa correlação negativa, no entanto, não foi significativa estatisticamente, exigindo maiores estudos que possam comprovar ou não essa tendência observada em nossos dados.

De qualquer maneira, fica patente que tanto *E. coli* como os coliformes a 35°C não devem ser utilizados como indicadores da presença de *L. monocytogenes* em alimentos.

Segundo Forsythe (2002), microrganismos indicadores são utilizados para avaliar a segurança e a higiene do alimento, devendo apresentar algumas características importantes como:

- Possuir histórico de associações constantes com o patógeno cuja presença visa indicar;
- Estar sempre presente quando o patógeno de interesse estiver presente;
- Ser um microrganismo cujos números possam ser correlacionados às quantidades do patógeno de interesse;
- Estar ausente dos alimentos que são livres de patógenos, com exceção, de números mínimos.

Nossos resultados mostram que tais postulados não se aplicam quando o microrganismo de interesse é *L. monocytogenes*. Esse fato é preocupante do ponto de vista de saúde pública, pois torna mais complexo o monitoramento microbiológico de nossos suprimentos alimentares no tocante a este importante agente etiológico de ETA.

5.4 Enumeração de *L.monocytogenes*

Dentre as amostras colhidas no comércio varejista, apenas as de lingüiças de pernil e espetinhos de coração apresentaram contagens para *L. monocytogenes*. Mesmo sendo uma pequena variedade de produtos, as contagens obtidas foram elevadas, onde em um produto o valor encontrado foi superior a $2,5 \cdot 10^4$ UFC/g. Não foi encontrado resultado semelhante a este na literatura, ressaltando a importância deste dado para a saúde pública (Tabela 7).

São poucos os estudos onde se realizou a enumeração de *L. monocytogenes*, sendo que os dados existentes referem-se a uma pequena variedade de alimentos.

Uyttendaele et al. (1999), por exemplo, em estudo realizado na Bélgica, encontraram 5,8% dos produtos cárneos curados crus com contagens maiores que 10 UFC de *L. monocytogenes* /g do alimento, sendo que nos cozidos essa porcentagem foi ainda menor (0,5%). Em nosso estudo, nos produtos em se conseguiu realizar a enumeração do microrganismo, as contagens mínimas foram de 100 UFC do patógeno/g do alimento, superiores, portanto, às descritas por eles. Essa diferença pode ser explicada, em nosso entender, pelo tipo de amostra analisada. As lingüiças e espetinhos são produtos em que não há adição de sais de cura (nitrito e nitrato) ou ela é pequena, e estes ingredientes podem dificultar a multiplicação de *L. monocytogenes*. Portanto, é natural que as contagens em nosso estudo tenham sido superiores às descritas por Uyttendaele et al. (1999).

Cornelius et al. (2008), porém, ao analisarem presuntos cozidos comercializados no varejo da Nova Zelândia, encontraram 13 das 301 amostras com contagens que variavam de <50 UFC/g até $1,6 \cdot 10^3$ UFC/g. Mesmo estes alimentos sendo cozidos e adicionados de nitrato e nitrito, as contagens foram elevadas.

Segundo a legislação dinamarquesa, para produtos não cozidos, com validade menor que uma semana, tolera-se até 100 UFC em 1g do alimento. Em outros países, como França e Alemanha, também é permitido este mesmo nível de contaminação (LAKE, 2002). Pelos resultados obtidos em nossa pesquisa, apenas as lingüiças de pernil seriam liberadas para o consumo segundo a legislação vigente nesses países. Já no Reino Unido, valores entre 10^2 e 10^3 UFC/g tornam o produto insatisfatório, e valores $>10^3$ UFC/g tornam o produto inaceitável (JAY, 2000). Neste estudo foi encontrado uma amostra de espetinho de coração com contagem superior a $2,5 \cdot 10^4$ UFC/g. Resultado semelhante a este não foi encontrado na literatura. Porém, em nenhum dos países já citados, este alimento seria liberado para consumo.

A Comissão Internacional em Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF) sugere que, se as contagens de *L. monocytogenes* não excederem 100 UFC/g do alimento, este pode ser considerado aceitável para indivíduos que não pertencem aos grupos de risco (JAY, 2000).

Mais uma vez, é importante ressaltar o perigo representado pelo consumo deste tipo de alimento, quando submetido a tratamentos térmicos insuficientes, como já discutido anteriormente.

TABELA 7. Resultado da enumeração de *L. monocytogenes* nas 5 amostras do comércio varejista.

Amostra	Contagem <i>L. monocytogenes</i> (UFC/g)
Lingüiça de pernil	100
Lingüiça de pernil	100
Espetinho de coração	600
Espetinho de coração	2700
Espetinho de coração	>25000
Total (%): 5 (9,8%)	

5.5 Possíveis cepas de *L. monocytogenes* não-hemolíticas

Cinco cepas isoladas não apresentaram hemólise, porém obtiveram reação característica para *L. monocytogenes* nos testes bioquímicos realizados (Tabela 8 e Figura 2). Saliente-se que nas amostras onde foram isoladas tais cepas, estas não foram consideradas positivas para *L. monocytogenes*, pois são necessárias outras análises para confirmação da espécie.

É importante lembrar que de 11 - 89% das cepas de *L. innocua* fermentam a ramnose, determinando um perfil bioquímico idêntico à *L. monocytogenes*, sendo *L. innocua* apenas diferenciada pela incapacidade de produzir β -hemólise. Portanto não se pode descartar a possibilidade destes isolados encontrados serem *L. innocua*.

Porém, há relatos na literatura de cepas de *L. monocytogenes* não produtoras de hemolisina, devendo esta característica ser avaliada com cuidado. Allerberger et al.(1997) detectaram, na Áustria, *L. monocytogenes*

sorotipo 1/2a não hemolítica em produtos lácteos. Dado semelhante foi encontrado por Chiarini (2007) ao trabalhar com amostras provenientes de matadouros de aves no Brasil, onde das 210 cepas de *L. monocytogenes* avaliadas, 49 delas não apresentaram hemólise nos testes bioquímicos, porém foram confirmadas através do BAX[®] system e Multiplex-PCR 16S rRNA.

Estes dados mostram a importância de uma melhor análise ao se encontrar cepas não hemolíticas, porém com perfil bioquímico característico para *L. monocytogenes*, principalmente pelas indústrias. Ao realizar as análises, as indústrias devem avaliar com mais cuidado a possibilidade de resultados falsos negativos, para não liberarem lotes contaminados, principalmente em alimentos prontos para o consumo.

As cepas não hemolíticas isoladas neste estudo necessitam de análises complementares, que caracterizem o perfil genético para confirmação da espécie, e, posteriormente o sorotipo, para então se avaliar o risco à saúde pública.

TABELA 8. Amostras analisadas, amostras positivas para *L. monocytogenes* e número de amostras contaminadas por possíveis cepas não hemolíticas de *L. monocytogenes* em alimentos do comércio varejista de Botucatu-SP.

Amostra	Nº de amostras analisadas	Nº de amostras positivas para <i>L. monocytogenes</i>	Nº de amostras positivas para possíveis <i>L. monocytogenes</i> não hemolíticas
Lingüiça Toscana	5	2	3
Lingüiça Calabresa	5	1	1
Salsicha Hot Dog a Granel	05	2	1
Outras amostras analisadas	36	13	0
Total (%)	51(100%)	18 (35,3%)	05 (9,80%)



Figura 2. Alimentos colhidos no comércio varejista de Botucatu, SP: porcentagem de amostras negativas e positivas para *L. monocytogenes* e porcentagem de amostras contaminadas por possíveis cepas não hemolíticas do patógeno.

5.6 Coliformes a 35°C, *Escherichia coli* e a legislação brasileira.

Entre os vários padrões microbiológicos fixados pela ANVISA na RDC nº12 (BRASIL, 2001) para avaliar a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos em nosso país, destaca-se a enumeração dos coliformes a 45°C ou termotolerantes. Em nosso estudo utilizamos Petrifilm EC™ (3M), que permite somente a detecção de coliformes a 35°C e, dentre estes, *E. coli*, pertencente ao grupo dos termotolerantes, mas que não pode ser considerada o seu único representante. Assim, na presente discussão, embora possamos estar subestimando o número de coliformes a 45°C, só serão consideradas fora do padrão as amostras que tiveram contagens de *E. coli* acima do fixado pela legislação, dada a limitação da metodologia por nós utilizada.

Para produtos como embutidos cozidos ou não, salsicha, presunto, lingüiças dessecadas, charque, Jerked Beef e Lombo, a RDC nº12 determina

uma contagem máxima de 10^3 UFC/g de coliformes a 45°C. No presente estudo, todas as amostras analisadas pertencentes a este tipo de produto obedeceram ao padrão estipulado (Tabela 09), e nenhuma delas, inclusive, apresentou contaminação por *E. coli*.

Já para produtos como lingüiças frescas e espetinhos, a legislação determina uma contagem máxima de coliformes a 45°C de $5 \cdot 10^3$ UFC/g e 10^4 UFC/g respectivamente. Das amostras analisadas, apenas uma (espetinho de coração) não seria liberada para consumo, pois apresentava uma contagem acima do fixado pela RDC. Deve-se ressaltar, no entanto, que das 51 amostras analisadas, *E. coli* foi isolada em nove (17.6%) delas (lingüiça pernil, lingüiça toscana, espetinho de carne bovina e espetinho de coração), indicando uma má qualidade higiênica do produto, embora as contagens estivessem dentro do padrão estipulado.

No entanto, das 50 amostras que seriam liberadas para o consumo de acordo com a RDC nº12, 17 (34%) delas encontravam-se contaminadas com *L. monocytogenes*. A RDC nº12 exige ausência do patógeno apenas em queijos de alta e muito alta umidade, não contemplando outros tipos de produtos. Os resultados do presente estudo mostram com clareza, em nossa opinião, a necessidade de uma revisão desta Resolução, com o estabelecimento de limites de contagem para *L. monocytogenes* também em outros alimentos, além daqueles já contemplados.

Nossa legislação apresenta um ponto em comum com a legislação da União Européia, que determina ausência do patógeno apenas em 25g para queijos de alta e muito alta umidade. Porém, a legislação da união Européia ainda contempla produtos como leite pasteurizado e outros produtos lácteos, determinando ausência em 25mL e 1g de produto, respectivamente. Outros países, tais como EUA, Itália e Nova Zelândia, no entanto, são mais restritivos e a tolerância é zero em grande parte dos alimentos prontos para o consumo. Austrália, Canadá, Dinamarca, Reino Unido, França e Alemanha, por sua vez, são menos rigorosos, tolerando alguma contaminação, porém em nenhum deles a contaminação deverá ser maior que 100 UFC/g do alimento no momento da venda (LAKE et al., 2002).

TABELA 9. Valores mínimos, medianas e valores máximos das contagens de coliformes a 35°C e *E. coli* em amostras de alimentos colhidas no comércio varejista de Botucatu, SP.

Amostra (n ^o)	Mínimo (UFC/g)		Mediana (UFC/g)		Máximo (UFC/g)	
	Coliformes a 35°C	<i>E. coli</i>	Coliformes a 35°C	<i>E. coli</i>	Coliformes a 35°C	<i>E. coli</i>
Lingüiça Pernil (05)	<10	<10	90	10	900	50
Lingüiça Toscana (05)	10	<10	160	<10	1800	90
Lingüiça Calabresa (05)	<10	<10	<10	<10	160	<10
Espetinho de Carne Bovina (04)	60	<10	120	25	310	180
Espetinho de Coração (04)	2200	<10	33000	<10	>250000	>250000
Coração a Granel (01)	<10	<10	-	-	20	10
Espetinho de Frango (03)	20	<10	30	<10	110	<10
Salsicha Hot Dog (05)	<10	<10	<10	<10	10	<10
Salsicha Hot Dog a Granel (05)	<10	<10	<10	<10	270	<10
Jerked Beef (03)	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Charque (02)	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Lombo Temperado (04)	<10	<10	5	<10	490	<10
Presunto (05) cozido	<10	<10	<10	<10	50	<10

6. Conclusões

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que:

- A contaminação por *L. monocytogenes* foi verificada em uma gama variada de produtos, tanto frescos como nos submetidos a processamentos térmicos e pode ser resultante de matéria-prima de má qualidade, processamento inadequado e/ou recontaminação do produto.
- Dois dos produtos avaliados, lingüiça de pernil e espetinho de coração, tendo em vista a possibilidade de serem consumidos após tratamento térmico insuficiente, e por apresentarem contagens elevadas do patógeno, podem representar um perigo aos consumidores pertencentes aos chamados grupos de risco.
- A presença de *E. coli* em alimentos, em elevadas contagens, pode exercer uma influência na detecção de *L.monocytogenes*.

7. Referências bibliográficas

ALLERBERGER, F.; DIERICH, M.; PETRANYI, G.; LALIC, M.; BUBERT, A. Nonhemolytic strains of *Listeria monocytogenes* detected in milk products using VIDAS immunoassay kit. **Zentralblatt fuer Hygiene und Umweltmedizin**, v.200, n.2/3, p.189-195, 1997.

ANGELILLO, I. F.; VIGGIANI, N. M. A.; RIZZO, L.; BIANCO, A. Food Handlers and food-borne diseases: Knowledge, attitudes and reported behavior in Italy. **Journal of Food Protection**, v.63, n.3, p. 381-385, 2000.

ARAGON-ALEGRO L.C. **Influência dos coliformes no comportamento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal** 2007 Tese (Doutorado. em Ciência dos Alimentos - Bromatologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BARROS, M.A.F.; NERO, L.N.; SILVA, L.C.; D'OIDIO, L.; MONTEIRO, F.A.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; HOFER, E.; BELOTI, V. *Listeria monocytogenes*: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. **Meat Science**, v.76, p.591-596, 2007.

BERSOT, L.S.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T. Production of mortadella: behavior of *Listeria monocytogenes* during processing and storage conditions. **Meat Science**, v. 57, p.13-17, 2001.

BONARDI, S.; BOTARELLI, A.; FUSARO, S.; BENTLEY, S.; GNAPPI, A.; MORINI, A. Epidemiological investigation on *Listeria* spp. in a bovine slaughterhouse. **Università degli Studi di Parma, Annali della Facoltà di Medicina Veterinária**, v. XVII, 1997.

BOVILL, R.; BEW, J.; COOK, N.; DAGOSTINO, M.; WILKINSON, N.; BARANYI, J. Predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella*

spp. during fluctuating temperature. **Int. J. Food Microbiol.** V.59, p.157-165, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura , Pecuária e Abastecimento. **Regulamento Técnico de identidade e qualidade de lingüiças. Instrução Normativa n º 04 de 05/04/2000.** Brasília, 2000. Disponível em:<<http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=7778>> .Acesso em:14 abr. 2008

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144>> Acesso em : Junho 2008.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em <<http://www.cdc.gov>> Acesso em: Novembro 2005.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em <<http://www.cdc.gov>> Acesso em: Maio 2008.

CHIARINI, E. ***Listeria monocytogenes* em matadouros de aves: marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação.** 2007 Tese (Doutorado. em Ciência dos Alimentos - Bromatologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CORNELIUS, A. J.; HUDSON, J. A.; WONG, T.L. Enumeration and growth of naturally occurring *Listeria* spp. in unpackaged ham. **Food Microbiology**, v.25, p. 407-412, 2008.

CUTTER, C.; MCELROY, D. Control of *Listeria monocytogenes* in Retail Establishments. Disponível em:

<<http://pubs.cas.psu.edu/FreePubs/pdfs/uk187.pdf>> Acesso em: Março 2006.

DALTON, C.B.; AUSTIN, C.C.; SOBEL, J.; RAYES, P.S.; BIBB, W.F.; GRAVES, L.M.; SWAMINATAM, B.; PROCTOR, M.E.; GRIFFIN, P. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *L. monocytogenes* in milk. **N. Engl. J. Med.**, v.336, p.100-105, 1997

DE CESARE, A.; MIONI, R.; MANFREDA, G. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in fresh and fermented Italian sausages and ribotyping of contaminating strains. **Int. J. Food Microbiol.** v.120, p. 124-130, 2007.

DESTRO, M. T.; SERRANO, A. M.; KABLIK, D. Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. *Food Control*, Guildford, v.2, p.110-112, 1991.

DESTRO, M.T. Incidence and significance of *Listeria* in fish and fish products from Latin America. **Int. J. Food Microbiol.** V.62, p.191-196, 2000.

DIMAIO, H. Listeria Infection in Women. **Prim Care Update Ob/Gyns**, v.7, n.1, p.40-45, 2000.

DOGANAY, M. Listeriosis: clinical presentation. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.35, p.173-175, 2003.

DONNELLY, C.W. *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. **Nutrition Rev.**, v.59, n.6, p.183-194, 2001.

DUGGAN, J.; PHILLIPS, C.A. *Listeria* in the domestic environment. **Nutrition & Food Science**, n.2, p.73-79, 1998.

FENLON, D.R.; WILSON, J.; DONACHIE, W. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. **J. Applied Bacteriol.** v. 81, n.6, p.641-650, 1996.

FLEMING, D.W.; COCHI, S.L.; MACDONALD, K.L.; BRONDUM, J.; HAYES, P.S.; PLIKAYTIS, B.D.; HOLMES, M.B.; AUDURIER, A.; CLAIRE, V.B.; REINGOLD, A.L. Pasteurized Milk as a Vehicle of Infection in an Outbreak of Listeriosis. **The New England Journal of Medicine**, v.312, n.7, p.404-407, 1985.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, L. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 182p, 1996.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 175 p., 2000.

FORSYTHE, S. J.; **Microbiologia da Segurança Alimentar**. 1ed, Artmed, 424p., 2002.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. **Int. J. Food Microbiol.** v. 113, p. 1-15, 2006.

GOULET, V.; JACQUET, C.; VAILLANT, V.; REBIÈRE, I.; MOURET, LORENTE, E.; STEINER, F.; ROCOURT, J. Listeriosis from consumption of raw milk cheese. **Lancet**, v.345, p.1581-1582, 1995.

GUDBJÖRNSDÓTTIR, B.; SUIHKO, M. L.; GUSTAVSSON, P.; THORKESSON, G.; SALO, S.; SJÖBERG, A. M.; NICLASEN, O.; BREDHOLT, S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. **Food microbiology**, v. 21, p.217-225, 2004.

HANSEN, J.; HOLM, L.; FREWER, L.; ROBINSON, P.; SANDOE, P. Beyond the knowledge deficit: recent research into lay and expert attitudes to food risks. **Appetite**, v.41, p.111-121, 2003.

HO, A.J.; IVANEK, R.; GRÖHN, Y.T.; NITGHTIGALE, K.K.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* fecal shedding in dairy cattle shows high levels of day-to-day variation and includes outbreaks and sporadic cases of shedding of specific *L. monocytogenes* subtypes. **Preventive Veterinary Medicine**. V. 80, p.287-305, 2007.

HOFER, E., RIBEIRO, R., FEITOSA, D.P. Species and serovars of de Genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.95, n.5, p.615-620, 2000.

JACKSON, V.; BLAIR, I.S.; MACDOWELL, D.A.; KENNEDY, J.; BOLTON, D.J. The incidence of significant foodborne pathogens in domestic refrigerators. **Food control**, v. 18, n. 4, p. 346-351, 2007.

JAY, J. M.; Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. **Food Control**, v. 7, n. 415, p. 209-214, 1996.

JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. 6.ed. Aspen: Gaithersburg, 2000. 854p.

JENSEN, N.E.; AARESTRUP, F.M.; JENSEN, J.; WEGENER, H.C. *Listeria monocytogenes* in bovine mastitis. Possible implication for human health. **Int. J. Food Microbiol.** V. 32, p.209-216, 1996.

JOHANSSON, T. Enhanced detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* from foodstuffs and food-processing environments. **Int. J. Food Microbiol**, v. 40, p.77-85, 1998.

KALAC, P. A review of some aspects of possible association between feeding of silage and animal health. **British Vet. Journal**. v.138, p.314-315, 1982.

KATHARIOU,S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. **J. Food Prot.**, v.65, n. 11, p. 1811-1829, 2002.

KONEMAM, E. W. **Diagnóstico Microbiológico**. 5.ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica, 2001. 1465p.

KOZAK, J.; BALMER, T.; BYRNE, R.; FISHER, K. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods: Incidence in dairy products., **Food Control**. V.7,n.4/5, p.215-221, 1996.

LAKE, R.; HUDSON, A.; CRESSEY, P.; NORTJE, G. Risk profile: *Listeria monocytogenes* in processed ready-to-eat meats. Disponível em: <<http://www.nzfsa.govt.nz/science/risk-profiles/listeria-in-rte-meat.pdf>> Acesso em : Setembro 2006.

LAMMERDING, A. M.; PAOLI, G.M. Quantitative risk assessment: an emerging tool for emerging food-bourne pathogens. **Emerging infectious Diseases**, v.3, n.4, p.483-487, 1997.

LANDGRAF, I.M., MASSUMI, M.K.A., JAKABI, M., ALVES, K.C.R., MARCHI, C.R. Na outbreak of *Listeria monocytogenes* meningitis in neonates. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.58, n.1, p.63-67, 1999.

LEAL, N.C.; HOFER, E.; COSTA, M.F.; SÁ, A.T. Isolamento de *Listeria monocytogenes* de líquido cefalorraquidiano, em Recife, Pernambuco. **Ver. Microbiol.**, v.14, n.4, p.290-291, 1983.

LIMAYE, A.P.; PERKINS, J.D.; KOWDLEY, K.V. Listeria Infection After Liver Transplantation: Report of a Case and Rewiew of the Literature. **The American Journal of Gastroenterology**, v.93, n.10, 1998.

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.;

PLINKAYTIS, B.D.; FANNIN, S.L.; KLEKS, A.; BROOME, C.V. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. **N. Engl. J. Med.** v. 319, p.823-828, 1988.

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

LOW, J.C.; DONACHIE, W. A review of *Listeria monocytogenes* an listeriosis. **The veterinary Journal.** V. 153, p. 9-29, 1997.

MANZANO, M., COCOLIN, L., CANTONI, C., COMI, G. A rapad method for identification and partial serotyping of *Listeria monocytogenes* in food by PCR and restriction enzyme analysis. **Int. J. Food Microbiol.** v. 42, p.207-212, 1998.

MATARAGAS, M.; SKANDAMIS, P.N., DROSINOS, E.H. Risk profiles of pork and poultry meat and risk ratings of various pathogen/ product combinations. **Int. J. Food Microbiol,** v. 126, p. 1-12, 2008.

MCLAUCHILN, J., LOW, J.C. Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational disease of veterinarians and farmers. **Veterinary Record,** v.135, p.615-617, 1994.

MCLAUCHILN, J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. **Food Control.,** v.7, n.4/5, p.187-193, 1996.

McMEEKIN, T.A.; BROWN, J.; KRIST, K.; MILES, D.; NEUMEYER, K.; NICHOLS, D.S.; OLLEY, J.; PRESSER, K.; RATKOWSKY, D.A.; ROSS, T. SCHLUNDT, J. New directions in foodborne diseases prevention. **International Journal of Food Microbiology,** v.78, p.3-17, 2002.

MEER, R.; MISNER, S. What is food-bourne illness? **The University of Arizona- Cooperative Extension**, AZ1065, n.5, 1999.

MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; HOGG, T.; GIBBS, P. A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. **Food microbiology**, v. 21, p. 213-216, 2004.

MURRAY, E.G.D., WEBB, R.A., SWANN, M.B.R. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes.*, **J. Pathology and Bacteriology**, n.72, p.99-103, 1926.

MOURA, S.M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D. Incidence of *Listeria* species in raw an pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil. **Int. J. Food Microbiol.**, v.19, p.229-237, 1993.

NESBAKKEN, T.; KAPPERUD, G.; CAUGANT, D. A. Pathways of *L. monoytogenes* contamination in meat processing industry. **Int. J. Food Microbiol.**, v.31, p.161-171, 1996.

NIGHTINGALE, K.K.; SCHUKKEN, Y.H.; NIGHTINGALE, C.R.; FORTE, E.D.; HO, A.J.; HER, Z.; GROHN, Y.T.; MCDONOUGH, P.L.; WIEDMANN, M. Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. **Applied and Environmental Microbiology**. V.70, n.8, p.4458-4467, 2004.

NØRRUNG, B.; BUNCIC, S. Microbial safety of meat in the European Union. **Meat Science**. V. 78, p. 14-24, 2008. 2008

PACHECO, G.; RODRIGUES, F.; HOFER, M.B. Um caso de listeriose crônica. **Hospital**, v.72, p.119-123, julho, 1967.

PACHECO, G.; SILVA, D.S. Listeriose no aborto habitual. **Ginecologia Brasileira**.v.4, n.2, p.47-54, 1972.

PAGOTTO, F.; CORNEAU, N.; FARBER, J. *Listeria monocytogenes* infections In: RIEMANN, H.; CLIVER, D., eds. **Food-borne infections and intoxications**. 3.ed. New York, London: Academic Press, 2006. cap.9, p.313–340.

PERRY, C.M.; DONNELLY, C.W. Incidence of *Listeria monocytogenes* in silage and its subsequent control by specific and nonspecific antagonism. **J. Food Prot.** v.53, n.8, p.642-647, 1990.

PETTINATTI, N.N.; TELLES, E.O.; BALLIAN, S.C. *Listeria monocytogenes* in hot dog sausages obtained from groceries stores in the city of São Paulo – A comparative and retrospective analysis of human listeriosis isolates. **Vet. Zootec.**, v.13, n. 2, p. 182-191, 2006.

PICCHI, V. **Estudo da microbiota patogênica no processo de elaboração da carne bovina salgada curada seca (Jerked Beef)** 1998. 104p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Epidemiologia Experimental Aplicada à Zoonoses) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PICCHI, V. ***Listeria monocytogenes*: Sobrevivência na carne bovina salgada curada dessecada (Jerked Beef) mantida sob vácuo em diferentes condições ambientais** 2002. 137p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - Epidemiologia Experimental Aplicada à Zoonoses) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RIBEIRO, L.A.O.; RODRIGUES, N.C.; FALLAVENA, L.C.B.; OLIVEIRA, S.J.; BRITO, M.A. Listeriose em rebanho de ovinos leiteiros na região serrana do Rio Grande do Sul: relato de caso. **Arq. Bras. Vet. Zootec.**, v.58, n.3, p.316-319, 2006.

REIJ, M.W.; AANTREKKER, E.D. D.; ILSI EUROPE RISK ANALYSIS IN MICROBIOLOGY TASK FORCE. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. **Int. J. Food Microbiol.**, v.91, p.1-11, 2004.

RYSER, E.T., MARTH, E.H. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc. 738 p. New York, USA, 1999.

ROCOURT, J.; BILLE, J. Foodborne listeriosis. **Wld. Hlth. Statist. Quart.** v.50, p.67-73, 1997.

ROCOURT, J.; JACQUET, C.; REILLY, A. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. **Int. J. Food Microbiol.**, v.62, p.197-209, 2000.

SALVAT, G.; TOQUIN, M.T.; MICHEL, Y.; COLIN, P. Control of *Listeria monocytogenes* in the delicatessen industries: the lessons of a listeriosis outbreak in France. **Int. J. Food microbial.**, v.25, p.75-81, 1995.

SCHLECH III, W.F.; LAVIGNE, P.M.; BARTOLUSSI, R.A.; ALLEN, A.C.; HALDANE, E.V.; WORT, A.J.; HIGHTWER, A.W.; JOHNSON, S.E.; KING, S.H.; NICHOLLS, E.E.; BROOME, C.V. Epidemic listeriosis evidence for transmission by food. **New England J. Med.**, v.308, n.44, p.203-206, 1983.

SCHLECH III, W.F. Foodborne listeriosis. **Clin. Infec. Dis.** N.31, p.770-775, 2000.

SCHWAB, J.P.; EDELWEISS, M.I.A. Identificação Imuno-histoquímica de *Listeria monocytogenes* em placentas fixadas em formol e embebidas em parafina. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. V.25, n.7, p.501-505, 2003.

SERGELIDIS, D.; ABRAHIM,A.; SARIMVEI,A.; PANOULIS,C. KARAIOANNOGLOU,P.; GENIGEORGIS, C. Temperature distribution and

prevalence of *Listeria* spp. In domestic, retail and industrial refrigerators in Greece. **International Journal of Food Microbiology**, v.34, p.171-177, 1997

SILVA, W. P.; LIMA, A. S.; GANDRA, E. A.; ARAÚJO, M. R.; MACEDO, M. R. P.; DUVALL, E. H. *Listeria* spp. no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.3, p.911-916, 2004.

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, p.256-354, 1998.

SILVA, M.C.D.; DESTRO, M.T.; HOFER, E.; TIBANA, A. Characterization and evaluation of some virulence markers of *Listeria monocytogenes* strains isolated from Brazilian cheeses using molecular, biochemical and serotyping techniques. **Int. J. Food Microbiol.**, v.63, p.275-280, 2001.

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. **Int. J. Food Microbiol.**, v.81, p.241-248, 2003.

THÉVENOT, D.; DELIGNETTE – MULLER, M. L.; CHRISTIEANS, S.; VERNZOY – ROZAND, C. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. **Int. J. Food Microbiol**, v.102, p. 85-94, 2005.

THOMAZELLA, F.M.D. **Matéria prima e ingredientes como fonte de contaminação de lingüiças frescas por *Salmonella* spp.** 2005. 40p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

UYTTENDAELE, M.; DE TROY, P.; DEBEVERE, J. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on Bealgian retail market. **Int. J. Food Microbiol**, v.53, p.75-80, 1999.

VITAS, A.I.; AGUADO, V.;GARCIA-JALON, I. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **Int. J. Food Microbiol**, v.90, p. 349-356, 2004.

ZAR, J.H. Biostatistical Analysis. 4^{ed}. New Jersey: Prentice-Hall, 1999. 663p.

ZWIETERING, M.H.; van GERWEN, S.J.C. Sensitivity analysis in quantitative microbial risk assessment. **Int. J. Food Microbiol**, v.58, p.213-221, 2000.

8. Artigo para Publicação

Trabalho a ser enviado para a revista *Food control*.

1 **Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* in meat products from retail**
2 **markets.**

3
4 **Loredana d' Ovidio, Julia Arantes Galvão, José Paes de Almeida Nogueira Pinto*¹**

5
6 *Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Botucatu, São Paulo, Brasil*
7 *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia*
8 *Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública*
9

10 **Abstract**

11
12 In this study, fifty-one samples collected at retail markets of Botucatu-SP, Brazil, were analyzed
13 with the purpose of evaluating the occurrence and quantifying *L. monocytogenes* in meat
14 products (fresh and processed), in order to contribute for the development of a database of the
15 level contamination of this pathogen in Brazil. The results obtained showed that 18 (35.3% of
16 the samples presented contamination with *L. monocytogenes* and two types of samples (pork
17 meat sausage and chicken heart skewer) showed high counts for *L. monocytogenes* (between
18 100 and >25000 CFU/g). The contamination with *L. monocytogenes* was found in a variety
19 range of products, being 100% of chicken heart skewer, 66.7% of poultry meat skewer, 60% of
20 fresh sausage, 50% of bovine meat skewer, 40% of "Hot Dog" sausages in bulk and 20% of
21 Calabrese sausage.

22

23 **Key words:** *Listeria monocytogenes*; enumeration; isolation; meat products

24

25 **Introduction**

26 The diseases transmitted by contaminated foods still represent one of the most
27 important causes of morbidity in several countries and they can produce serious consequences
28 for public health (Angelillo, Viggiani, Rizzo & Bianco, 2000). These diseases are known as food
29 toxoinfections, and its majority are caused by the consumption of foods contaminated with the so
30 called "biological hazards" mainly represented by pathogenic bacteria (Meer & Misner, 1999).

Corresponding autor: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Medicina Veterinária, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Campus Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/nº, 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil. Tel +55 14 38116273
e-mail: josepaes@fmvz.unesp.br

31 The presence of pathogenic organisms in food results from a complex interaction of
32 factors that involve the pathogen itself, the food that will transmit it and the individual that will
33 consume it, which can function in increasing or lessening the contamination and the
34 multiplication levels of these organisms. Among these factors, the processing, distribution,
35 consumption and population immunity can be noted. (Hansen, Holm, Robinson & Sandoe,
36 2003; Zwietering & Van Gerwen, 2000; Lammerding & Paoli, 1997; Mcmeekin, Brown, Krist,
37 Miles, Neumeyer & Nichols, 1997).

38 Among the pathogens that cause food toxoinfections, it can be mentioned *Listeria*
39 *monocytogenes*, an organism widely distributed in Nature, the humans and several animal
40 species acts as reservoirs for this bacterium. This organism has been isolated from several
41 foods and in Brazil it has been found in milk, cheeses, poultry, bovine and pork meat, seafood
42 and vegetable products (Destro, Serrano & Kablik., 1991; Moura, Destro & Franco, 1993; Silva,
43 Hofer & Tibana, 1998; Destro, 2000; Hofer, Ribeiro & Feitosa, 2000; Silva, Destro, Hofer &
44 Tibana, 2001; Silva, Almeida, Alves & Almeida, 2003). According to Schlech III (2000), the
45 foods are identified as the principal vehicles of *L. monocytogenes* for humans.

46 Listeriosis has become a concern since the 80's, when two outbreaks occurred in North
47 America, the participation of foods became evident. Since the report of these two outbreaks,
48 several others have been reported in several countries, including a wide variety of foods, such
49 as pasteurized milk, chocolate milk, meat pâté, pork tongue in jelly, sausages, ready-to-eat
50 meat, different sausages types, turkey meat and cheeses (Fleming *et al.*, 1985; Linnan *et al.*,
51 1988; Mclauchlin & Low, 1991; Salvat, Toquin, Michel & Colin, 1995; Goulet *et al.*, 1995; Dalton
52 *et al.*, 1997; CDC, 1999, 2000, 2001, 2002).

53 The disease shows a mortality rate near 50% (Mclauchlin, 1996.; Low & Donachie,
54 1997.; Rocourt, Jacquet & Reilly, 2000). Values so high have originated great concern and
55 listeriosis began to be considered a serious problem for public health.

56 *Listeria monocytogenes* has been isolated in Brazil from clinical material of several
57 pathological processes and from human carriers, but still now it was not observed a direct
58 relation between the consumption of contaminated food by the agent and the occurrence of the
59 disease in humans.

60 Taking into consideration the lack of data in Brazil on the isolation and enumeration of
61 *L. monocytogenes* in products of animal origin and the importance of this pathogen for public
62 health, the objectives of this work were to evaluate the occurrence of *L. monocytogenes* both in
63 fresh and in processed foods, largely accepted in the consumer market, and quantify *L.*
64 *monocytogenes* in these products, in order to contribute to the development of a database of
65 the contamination level of foods with this pathogen in Brazil.

66

67 **Materials and Methods**

68 **Samples**

69 The purpose of this study was to evaluate products largely consumed by people,
70 especially those ready-to-eat products, presented in Table 1. The collected samples were
71 packaged and transported in isothermal boxes containing reusable ice. There was a variation in
72 the number of samples of each type of product, once the same were not always found at retail
73 market.

74 The samples were collected at retail markets in the region of Botucatu, São Paulo State.
75 In these samples the isolation and the enumeration of the pathogen were performed.

76 For *L. monocytogenes* isolation and enumeration, the methodologies approved by
77 International Standard Organization ISO 11200-1 and ISO 11290-2, were used, respectively.

78 In the enumeration, 25g of the samples were submitted to a primary selective
79 enrichment in 225 ml of Half Fraser (Oxford) broth (1.9) without supplement, with incubation
80 performed at 20°C for 1 hour; then, 0.1 ml of the culture was applied by surface with a Drigalsky
81 spatula in ALOA (Agar Listeria Ottaviani Agosti, Biolife) agar plates and then incubated at 35°C
82 for 24 h. After this period, the supposed colonies were enumerated and submitted to
83 complementary tests for their identification, described later.

84 After removing the aliquot of 0.1 ml to perform the enumeration, the primary selective
85 enrichment was made to obtain the pathogen isolation, by adding the supplement of Half Fraser
86 broth, the incubation being at 30°C for 24 hours. Then, the secondary selective enrichment was
87 made, by transferring 0.1 ml of Half Fraser broth to tubes containing 10 ml of Fraser (Oxford)
88 broth, that were incubated at 35°C for 48 hours.

89 0,1 ml from both the primary selective enrichment and the secondary selective
90 enrichment were applied by spreading in surface with a Drigalsky spatula in ALOA (Agar
91 *Listeria Ottasviani* Agosti, Biolife) and in Modified Oxford Agar (Oxoid), the plates being
92 incubated at 35°C for 24-48 hours.

93 Three to five characteristic colonies in both agars were selected and transferred, for
94 purification, to plates of Trypticase Soy Agar with 0.6% yeast extract (TSA-YE), incubated at
95 37°C for 24 hours, then being examined under light transmitted at 45°C (Henry's Method). The
96 suspect colonies, bluish in color, were submitted to complementary tests for their identification
97 (Gram staining, catalase reaction, carbohydrate fermentation, motility test and haemolysis test
98 on 5% equine blood agar). All the tests were performed in presence of a positive control (*L.*
99 *monocytogenes* ATCC 7644), to discard any failure of the reagents or in preparing the culture
100 media.

101

102 **Enumeration of Total Coliforms and *Escherichia coli*.**

103

104 From each sample 25 g were collected and diluted in 225 ml of 0.1% peptoned water.
105 Of this dilution, 1 ml was plated in Petriilm EC (3M) plates and incubated at 35°C for 48 h. The
106 enumeration was performed after this period, the blue colonies with gas being considered as
107 *Escherichia coli* and the reddish colonies with gas together, with the blue colonies with gas as
108 total coliforms, no matter their size and color intensity.

109

110 **Results and Discussion**

111 **Isolation of *L. monocytogenes***

112 The results concerning the samples collected at retail market in Botucatu are shown in
113 Table 1.

114 It can be seen that 18 (35.3%) of the 51 analyzed samples were contaminated with *L.*
115 *monocytogenes*.

116 The fresh sausages showed a high number of positive results, once 6 out of 10
117 analyzed samples were contaminated with *L. monocytogenes*, 4 being of pork meat and 6 of

118 Tuscan type. These results are higher than those described by Barros *et al.* (2007) in Brazil and
119 De Cesare, Mioni and Manfreda (2007) in Italy, detected 22.2% and 38.9% of the samples
120 contaminated with the pathogen, respectively. The contamination of our samples can have
121 resulted from the used raw material or from equipments of the processing industries of
122 sausages. In Brazil, previous works already detected the pathogen in several types of meat
123 (bovine and pork meats, 33.3% and in fatness, 20%) used in the preparation of sausages, as
124 well in the equipments, such as grinders (33.3%), mixers (50%) and sausage stuffer (25%)
125 (Silva, Lima, Gandra, Araújo, Macedo & Duvall, 2004).

126 The detection of equipments contaminated with *L. monocytogenes*, as well final
127 products, both fresh and cured, in a plant that performed slaughter of animals and the
128 preparation of meat products, had also been described by López *et al.* (2008), in Spain.

129 These studies make evident the possibility of cross contamination in the processing
130 environment, as well this pathogen ability to produce biofilm, with reflexes on the contamination
131 of the final product (Reij & Aantrekker, 2004; Gandhi *et al.*, 2006).

132 This had been well demonstrated by Nesbakken, Kapperud and Caugant (1996),
133 detecting *L. monocytogenes* with the same genetic profile in four out of six examined plants, the
134 organism had been isolated of chilled meat, *in natura* meat, processing environment and
135 discard baskets. In the other two plants, the isolates also presented the same genetic profile,
136 but the pathogen was not found in the *in natura* meat. Another important result in this work was
137 the detection of strains colonizing the processing plant, with the same genetic profile of previous
138 isolates, configuring their persistence in the environment for at least four years.

139 It is important to emphasize that the fresh sausages even being consumed thermally
140 treated, in our country, as already discussed, there is the cultural habit of barbecue, which
141 enables the consumption of this product in underdone condition. An insufficient heating can
142 allow the maintenance of feasible cells in the food that if consumed by immunocompromised
143 people can have harmful reflexes to health, still causing their death.

144 Another factor to be considered is the cross contamination that can occur in the
145 domestic environment, once the fresh sausages can carry the pathogen to the kitchen, where it
146 is transmitted to other foods. In preparing a meal, a great number of the consumers are not

147 aware that the raw meat products must be handled after the preparation of foods that will be
148 consumed in their raw state, like vegetables, or ready-to-eat foods. It is also recommended the
149 non-utilization of tools where raw meat had already been handled, before their proper
150 hygienization. Such care is necessary in order the cross contamination process do not occur
151 (Reij & Aantrekker, 2004; Gandhi & Chikindas, 2006).

152 Differently from the fresh sausages, in relation to the Calabrese sausages, only one out
153 of the five analyzed samples was positive for *L. monocytogenes*. This result was similar to that
154 found by Thévenot, Delignette-Muller, Christieans and Vernozy-Rozand (2005). These authors
155 analyzed 13 processing plants of dried cured sausages in France. The type of processing of
156 these products is similar to that of Calabrese sausages, only varying in the availability of some
157 ingredients and in the fermentation stage that occurs before desiccation. Three out of 30
158 analyzed samples of the final product were positive for *L. monocytogenes*. Thévenot *et al.*
159 (2005) attributed this result to the processing type. They also verified that the final product
160 showed a pH lower than 5.0 and a_w of 0.80, beyond a high salt concentration. With regard to the
161 Calabrese sausage, the desiccation or dehydration contributes to a decrease of a_w , and also
162 increases the final salt concentration in the product. These factors can explain the low
163 occurrence of the pathogen in this type of product.

164 However, in the analysis of the processing plant, before the activities start, they found
165 15.1% of the equipment contaminated with *L. monocytogenes*, this rate increased to 50.9%
166 during processing. These same researchers found a 33.9% rate of the raw meat contaminated
167 with the pathogen, this rate increased to 71.6% in the samples of grinded meat and stuffed
168 sausages. This study shows the persistence of *L. monocytogenes* in the processing
169 environment even after hygienization, facilitating cross contamination and biofilms development.

170 Therefore, generally speaking, despite the utilization of the same type of raw material
171 (mainly pork meat) in their preparation, the fresh sausages and those that undergo some kind of
172 additional treatment (for example, drying, fermentation) differ in the results concerning the
173 contamination with *L. monocytogenes*, being normally lower in the last ones. These results were
174 also found by De Cesare *et al.* (2007), analyzing fresh and fermented sausages deriving from
175 the retail market in North Italy. They found a prevalence of 38.9% in fresh sausages, versus
176 15.2% in fermented sausages.

177 This greater safety, however, is conditioned to the application of Good Manufacturing
178 Practices (GMP), essential in the control of cross contamination, as the already mentioned
179 works attest.

180 In our study, the greater contamination with the pathogen was found in the products
181 prepared with poultry meat. Out of 8 analyzed samples, 7 were positive for *L. monocytogenes*, 5
182 being samples of chicken heart skewer and 2 of poultry meat skewer. We did not find data in
183 the literature about this type of product, but there are reports of processed foods and *in natura*
184 poultry meat contaminated with *L. monocytogenes*. In a study made in Brazil by Chiarini (2007),
185 two poultry slaughter-houses were analyzed, the first with automatic evisceration and the
186 second with manual evisceration; in the first (automatic), 16.7% of the chilled cuts and 50% of
187 the frozen cuts showed to be contaminated with *L. monocytogenes*. In the slaughter-house with
188 manual evisceration, the contamination was higher in chilled cuts (33.3%) compared to frozen
189 cuts (16.7%). In the same study, in both plants, the greater occurrence of positive products for
190 *L. monocytogenes* was obtained in samples collected after the chilling stage by immersion in
191 the clean zone of the slaughter-house, indicating the possible dissemination of the pathogen in
192 the processing plant.

193 The pathogen was also detected in meat-hooks, steel gloves, knife grinder, knives,
194 trolleys and mats, among other equipments, as well in the floor and handler hands. This study
195 shows the importance of cross contamination into the processing environment, once the same
196 genetic profile of *L. monocytogenes* was found all along the processing line.

197 In Portugal, Mena, Almeida, Carneiro, Teixeira, Hogg and Gibbs (2004) found 60% of
198 the chilled chickens marketed in retail contaminated with *L. monocytogenes*; Vitas, Aguado,
199 Garcia-Jalon (2004) in Spain detected the pathogen in 36% of the chicken meat samples
200 collected at the retail market.

201 Gudbjomsdóttir *et al.* (2004) analyzing the frequency of *L. monocytogenes* in poultry
202 meat processing plants in Faroe Islands, Iceland, Finland, Norway and Sweden, found 8.3% of
203 the samples of *in natura* meat and 22.2% of raw processed final product contaminated with the
204 pathogen.

205 There are also reports of contamination of poultry meat ground *in natura* marketed in
206 primary package and in bulk in Belgium (Uyttendaele, De Troy & Debevere, 1999).

207 All these data confirm the importance of raw material and processing environment in the
208 contamination of products with *L. monocytogenes*.

209 Two out of 4 analyzed bovine meat skewer presented contamination with the pathogen.
210 In Brazil, there are not data on the presence of *L. monocytogenes* in this type of product,
211 although it had been isolated in the environment of bovine slaughterhouses and in the
212 carcasses themselves. Barros *et al.* (2007), for example, detected the pathogen in the floor and
213 equipments (tenderizer, grinder, saws and plastic boxes). Bonardi, Botarelli, Fusaro, Bentley,
214 Ganppi and Morini (1997), in Italy, found one carcass contaminated with *L. monocytogenes*
215 after dehidating. Besides the contamination with the pathogen, they found 7 carcasses
216 contaminated with *L. innocua*, which according to Kathariou (2002) indicates the possibility of
217 contamination with *L. monocytogenes*.

218 It is important to emphasize that in our case the samples of chicken heart and poultry
219 meat skewer, besides those of bovine meat skewer, were deriving from the same industry, there
220 being the possibility of cross contamination of the products during the processing, from isolates
221 persistent in the plant environment. To confirm this hypothesis, however, more studies are
222 needed, like serotyping of the strains, besides the identification of their genetic profile, these
223 tools being indispensable to attest the persistence of the pathogen and the cross contamination
224 of the several products.

225 Regarding the samples of "hot dog" sausages, *L. monocytogenes* was isolated only
226 from those marketed in bulk. Two out of 5 analyzed samples were contaminated with the
227 pathogen. This result shows once more the importance of the GMP, since the product can be
228 contaminated after the removal of the primary package, from environment, equipments or
229 during its handling in retail establishments.

230 The pathogen was not isolated from the samples of sliced cooked ham and seasoned
231 loin, but in literature there are reports of contamination of these products with *L.*
232 *monocytogenes*. Only in European Union in 2005, it was detected in 26.5% of the analyzed
233 samples of ready-to-eat products (Nørrung & Buncic, 2008), in the United States these foods
234 being responsible by the occurrence of several outbreaks, showing its importance for public
235 health (CDC, 2008).

236 *L. monocytogenes* was not also isolated from samples as charque (salted and dried
237 bovine meat) and jerked beef (salted, dried and cured bovine meat) analyzed in our study.
238 Although they are popular and largely consumed products in several Brazilian regions, there are
239 no data in literature regarding their contamination with this pathogen, indicating the need for
240 new studies of their role as a vehicle for *L. monocytogenes*.

241

242 **Enumeration of *L. monocytogenes***

243 Out of the samples collected in the retail market, only the fresh pork meat sausages and
244 chicken heart skewer presented counts for *L. monocytogenes*, corresponding to 9.8% of the
245 analyzed samples (Table 2).

246 The studies where the enumeration of *L. monocytogenes* was performed are few, and
247 the existing data refer to a restricted range of products.

248 Uyttendaele *et al.* (1999), for example, in study performed in Belgium, found 5.8% of
249 raw cured meat products with counts higher than 10 CFU/g of *L. monocytogenes* and in the
250 cooked foods this percentage was even lower (0,5%). More recently, Cornelius, Hudson and
251 Wong (2008) analyzing cooked hams commercialized in retail of New Zealand, found 13 out of
252 301 samples with counts that ranged from <50 CFU/g to 1600 CFU/g. The counts were high,
253 even these products being cooked and with the addition of nitrate and nitrite.

254 In our study, in the products where it was possible to perform the enumeration of the
255 pathogen (fresh pork meat sausages and poultry skewer), the counts ranged from 100 to
256 >25000 CFU/g, therefore, higher than those described by Uyttendaele *et al.* (1999). In our
257 understanding, this difference can be explained by the type of analyzed sample. In the case of
258 sausages and skewer, they are largely handled products and submitted to the cominution
259 (sausages), factors that increase the chances of contamination from raw material (pork meat,
260 ingredients), environment and equipments.

261 It must be emphasized that the Brazilian legislation only establish limits for *L.*
262 *monocytogenes* in cheeses with high and very high humidity (absence in 25g), but not
263 contemplating another food products, such as meat and vegetable products. The International
264 Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) suggests that if the counts of

265 *L. monocytogenes* do not exceed 100 CFU/g, at the point of consumption, the food is
266 considered acceptable for not susceptible individuals (Jay, 2000).

267 The high counts detected in our study concerning sausages and skewers are worrying,
268 since such foods submitted to insufficient thermal treatments can become a serious hazard for
269 the consumer health.

270

271 **Association between the presence of Total Coliforms, *Escherichia coli* and *Listeria*** 272 ***monocytogenes***

273

274 The hygienic-sanitary conditions were evaluated in all the samples collected in the retail
275 market through the enumeration of Total Coliforms and *Escherichia coli* (Table 3).

276 Based on the results, it was aimed at studying a possible association between the total
277 coliforms counts and *E. coli* with the presence or absence of *L. monocytogenes*.

278 To verify this association, The Spearman test was used, at 5% significance level. The
279 results are in Table 4.

280 It can be seen that in the case of the samples in which the pathogen was not detected
281 there is a statistically significant positive correlation ($p > 0.05$) between the total coliforms
282 counts and *E. coli*, showing that, both indicators counts were high in these samples.

283 On the contrary, in the positive samples for *L. monocytogenes* this correlation was
284 negative, although not significant from the statistical point of view ($p > 0.05$). In this case, the
285 total coliforms counts were high, but *E. coli* ones were not.

286 Based on the results of this statistical analysis some considerations can be formulated.
287 In the samples negative for the pathogen, the high indicators counts could be exerting some
288 influence on *L. monocytogenes*, inhibiting its multiplication, for example.

289 Aragon-Alegro (2007) studying the influence of the coliforms on *L. monocytogenes* in
290 fresh Minas cheeses, reported that when de culture medium was inoculated with *L.*
291 *monocytogenes* and Coliforms, the pathogen populations were lower if compared to a culture
292 medium inoculated only with the pathogen. They also verified that transferring 1 CFU/ml of *L.*
293 *monocytogenes* to a culture medium inoculated with coliforms, there was no increase in the

294 pathogen population, showing that, if *L. monocytogenes* is present in low concentrations, it
295 could not be isolated from foods that contain a competitive microbiota.

296 According to our data, the total coliforms do not appear to be the group that is exerting
297 this inhibitory action, because the chicken heart skewer samples presented the higher counts
298 for total coliforms, but *L. monocytogenes* was also detected in a high number in the same
299 samples.

300 The results suggest that the inhibitory action could be exerted by *E. coli*, since in the
301 group of samples that presented positive results for the pathogen had a negative correlation
302 between the counts of *E. coli* and total coliforms, that is, the high counts of the last were not
303 accompanied by an increase in the number of *E.coli* colonies. This negative correlation,
304 however, was not statistically significant, needing more studies that can prove or not this trend
305 observed in our study.

306 It is evident that both *E. coli* and total coliforms could not be used as indicator of the
307 presence of *L. monocytogenes* in foods.

308 According to Forsythe (2002), indicator organisms are used to evaluate food safety and
309 hygiene and must have some important characteristics, such as a history of constant
310 associations with the pathogen whose presence must be indicated; being always present when
311 the pathogen of interest is present; being an organism whose numbers can be correlated to the
312 quantities of the pathogen of interest; being absent from the foods that are free of pathogens,
313 except the minimum numbers.

314 Our results show that such postulates are not applicable when the organism of interest
315 is *L. monocytogenes*. This fact is worrying from the point of view of public health, because it
316 renders more complex the microbiological monitoring of our food supplies regarding to this
317 important etiological agent of ETA.

318

319 **6. Conclusions**

320

321 Based on the obtained results we can conclude that the contamination with *L.*
322 *monocytogenes* occurred in a large variety of products, both fresh and submitted to thermal
323 processing. The source of contamination could have been from raw material, improper

324 processing and/or recontamination of the product during processing at industry or retail
325 environment. If the contamination occurs at the industry environment, the final products can be
326 a source of contamination for the retail establishment, cross contaminating the retail
327 environment, others food products, equipment and handlers. Most products analyzed, mainly
328 the fresh ones, were commercialized under refrigeration. *L. monocytogenes* is considered a
329 psychrotrophic pathogen and the refrigeration temperatures could contribute for the growth of
330 the pathogen. Two of the evaluated products, pork meat sausage and chicken heart skewer,
331 can represent a hazard to the risk populations, taking into account the possibility of being
332 consumed undercooked and due to the fact of presenting high counts of the pathogen. Also, not
333 only these two products, but all contaminated products with *L. monocytogenes* may represent a
334 health risk in kitchens. The contaminated products in domestic environment can cross
335 contaminate cooked food, ready-to eat-food and the refrigerator, considering the psychrotrophic
336 and biofilm formation ability of this pathogen. The high *E. coli* counts found in some of the
337 products can be exerting an influence on the detection of *L. monocytogenes*, more studies are
338 necessary to confirm this hypothesis.

339

340 **7. Acknowledgements**

341 The authors are grateful to Dr. Maria Teresa Destro and Dr. Vera Lúcia Mores Rall for their kind
342 help during the course of this study.

343

344 **7. References**

345 ANGELILLO, I. F.;VIGGIANI, N. M. A.; RIZZO, L.; BIANCO, A. (2000). Food Handlers and
346 food-bourne diseases: Knowledge, attitudes and reported behavior in Italy. *Journal of*
347 *Food Protection*, 63 (3), 381-385.

348 ARAGON-ALEGRO L.C. (2007). Influência dos coliformes no comportamento de *Listeria*
349 *monocytogenes* em queijo Minas Frescal. Ph.D. thesis. University of São Paulo.

350 BARROS, M.A.F.; NERO, L.N.; SILVA, L.C.; D'OVIDIO, L.; MONTEIRO, F.A.; TAMANINI, R.;
351 FAGNANI, R.; HOFER, E.; BELOTI,V. (2007). *Listeria monocytogenes* : Occurrence in

- 352 beef and identification of the main contamination points in processing plants. *Meat*
353 *Science*, 76, 591-596,.
- 354 BONARDI, S.; BOTARELLI, A.; FUSARO, S.; BENTLEY, S.; GNAPPI, A.; MORINI, A. (1997).
355 Epidemiological investigation on *Listeria* spp. in a bovine slaughterhouse. *Università*
356 *degli Studi di Parma, Annali della Facoltà di Medicina Veterinária*, v. XVII.
- 357 CDC – Centers for Disease Control and Prevention (2008). Outbreak Surveillance Data.
358 Available online: http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/outbreak_data.htm, last
359 visited: May 14, 2008.
- 360 CHIARINI, E. (2007). *Listeria monocytogenes* em matadouros de aves: marcadores
361 sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação. Ph.D thesis.
362 University of São Paulo.
- 363 CORNELIUS, A. J.; HUDSON, J. A.; WONG, T.L. (2008). Enumeration and growth of naturally
364 occurring *Listeria* spp.in unpackaged ham. *Food Microbiology*, 25, 407-412.
- 365 DALTON, C.B.; AUSTIN, C.C.; SOBEL, J.; RAYES, P.S.; BIBB, W.F.; GRAVES, L.M.;
366 SWAMINATAM, B.; PROCTOR, M.E.; GRIFFIN, P. (1997). An outbreak of
367 gastroenteritis and fever due to *L. monocytogenes* in milk. *The New England Journal*
368 *of Medicine*, .336, .100-105.
- 369 DE CESARE, A.; MIONI, R.; MANFREDA, G. (2007). Prevalence of *Listeria monocytogenes*
370 in fresh and fermented Italian sausages and ribotyping of contaminating strains.
371 *International Journal of Food Microbiology* 120, 124-130.
- 372 DESTRO, M. T.; SERRANO, A. M.; KABLIK, D. Y. (1991).Isolation of *Listeria* species from
373 some Brazilian meat and diary products. *Food Control*, 2, 110-112.
- 374 DESTRO, M.T. (2000).Incidence and significance of *Listeria* in fish and fish products from Latin
375 America. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 191-196.
- 376 FLEMING, D.W.; COCHI, S.L.; MACDONALD, K.L.; BRONDUM,J.; HAYES, P.S.;
377 PLIKAYTIS,B.D.; HOLMES, M.B.; AUDURIER,A.; CLAIRE, V.B.; REINGOLD, A.L.
378 (1985). Pasteurized Milk as a Vehicle of Infection in an Outbreak of Listeriosis. *The New*
379 *England Journal of Medicine*, 312 (7), 404-407.
- 380 FORSYTHE, S. J. (2002). *Microbiologia da Segurança Alimentar*. Rio de Janeiro: Artmed.

- 381 GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. (2006). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to
382 survive. *International Journal Food of Microbiology*, 113, 1-15.
- 383 GOULET, V.; JACQUET, C.; VAILLANT, V.; REBIÈRE, I.; MOURET, LORENTE, E.; STEINER,
384 F.; ROCOURT, J. (1995). Listeriosis from consumption of raw milk cheese. *Lancet*,
385 345, 1581-1582.
- 386 GUDBJÖRNSDÓTTIR, B.; SUIHKO, M. L.; GUSTAVSSON, P.; THORKESSON, G.; SALO,
387 S.; SJÖBERG, A. M.; NICLASSEN, O.; BREDHOLT, S. (2004). The incidence of *Listeria*
388 *monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. *Food*
389 *microbiology*, 21, 217-225.
- 390 HANSEN, J.; HOLM, L.; FREWER, L.; ROBINSON, P.; SANDOE, P. (2003). Beyond the
391 knowledge deficit: recent research into lay and expert attitudes to food risks. *Appetite*,
392 41, 111-121.
- 393 HOFER, E., RIBEIRO, R., FEITOSA, D.P. (2000). Species and serovars of de Genus *Listeria*
394 isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. *Memórias do Instituto*.
395 *Oswaldo Cruz*, 95 (5), 615-620.
- 396 JAY, J.M. (2000). *Modern Food Microbiology*. Gaithersburg: Aspen.
- 397 KATHARIOU,S. (2002). *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety
398 perspective. *Journal of Food Protection*, 65 (11), 1811-1829.
- 399 LAMMERDING, A. M.; PAOLI, G.M. (1997). Quantitative risk assessment: an emerging tool for
400 emerging food-borne pathogens. *Emerging infectious Diseases*, 3 (4), 483-487.
- 401 LINNAN, M.J.; MASCOLA, L.; LOU, X.D.; GOULET, V.; MAY, S.; SALMINEN, C.; HIRD, D.W.;
402 YONEKURA, M.L.; HAYES, P.; WEAVER, R.; AUDURIER, A.; PLINKAYTIS, B.D.;
403 FANNIN, S.L.; KLEKS, A.; BROOME, C.V. (1988). Epidemic listeriosis associated with
404 Mexican-style cheese. *The New England Journal of Medicine*, 319, 823-828.
- 405 LÓPEZ, V. ; VILLATORO, D.; ORTIZ, S.; LÓPEZ, P.; NAVAS,J.; DÁVILA, J. C.; MARTÍNEZ-
406 SUÁREZ, J. V. (2008). Molecular tracking of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig
407 abattoir and processing plant. *Meat Science*, 78, 130-134.
- 408 LOW, J.C.; DONACHIE, W. (1997). A review of *Listeria monocytogenes* an listeriosis. *The*
409 *veterinary Journal*, 153, 9-29.

- 410 MCLAUCHILN, J., LOW, J.C. (1994). Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational
411 disease of veterinarians and farmers. *Veterinary Record*, 135, 615-617.
- 412 MCLAUCHILN, J. (1996). The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control*, 7
413 (4/5), 187-193.
- 414 McMEEKIN, T.A.; BROWN, J.; KRIST, K.; MILES, D.; NEUMEYER, K.; NICHOLS, D.S.;
415 OLLEY, J.; PRESSER, K.; RATKOWSKY, D.A.; ROSS, T.SCHLUNDT, J. (2002). New
416 directions in foodborne diseases prevention. *International Journal of Food*
417 *Microbiology*, 78, 3-17.
- 418 MEER, R.; MISNER, S. (1999). What is food-borne illness? *The University of Arizona-*
419 *Cooperative Extension*, AZ1065, n.5.
- 420 MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; HOGG, T.; GIBBS, P. A. (2004).
421 Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in
422 Portugal. *Food microbiology*, 21, 213-216.
- 423 MOURA, S.M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D. (1993). Incidence of *Listeria* species in raw and
424 pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil. *International Journal of Food*
425 *Microbiology*, 19, 229-237.
- 426 NØRRUNG, B.; BUNCIC, S. (2008). Microbial safety of meat in the European Union. *Meat*
427 *Science*, 78, 14-24.
- 428 PAGOTTO, F.; CORNEAU, N.; FARBER, J. (2006). *Listeria monocytogenes* infections in:
429 RIEMANN, H.; CLIVER, D. *Food-borne infections and intoxications*. (pp.313–340). New
430 York, London: Academic Press.
- 431 REIJ, M.W.; AANTREKKER, E.D. D.; *ILSI Europe risk analysis* in: MICROBIOLOGY TASK
432 FORCE. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International*
433 *Journal Food of Microbiology*, 91,1-11. 2004.
- 434 ROCOURT, J.; JACQUET, C.; REILLY, A. (2000). Epidemiology of human listeriosis and
435 seafoods. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 197-209.
- 436 SALVAT, G.; TOQUIN, M.T.; MICHEL, Y.; COLIN, P. (1995). Control of *Listeria monocytogenes*
437 in the delicatessen industries: the lessons of a listeriosis outbreak in France.
438 *International Journal of Food Microbiology*, 25, 75-81.
- 439 SCHLECH III, W.F. (2000). Foodborne listeriosis. *Clinical Infectious Diseases*, 31, 770-775.

- 440 SILVA, W. P.; LIMA, A. S.; GANDRA, E. A.; ARAÚJO, M. R.; MACEDO, M. R. P.; DUVALL, E.
441 H. (2004). *Listeria* spp. no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de
442 Pelotas, RS, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, 34 (3), 911-916.
- 443 SILVA, M.C.D.; HOFER, E.; TIBANA, A. (1998). Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese
444 produced in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Food Protection*, 61, 256-354.
- 445 SILVA, M.C.D.; DESTRO, M.T.; HOFER, E.; TIBANA, A. (2001). Characterization and
446 evaluation of some virulence markers of *Listeria monocytogenes* strains isolated from
447 Brazilian cheeses using molecular, biochemical and serotyping techniques.
448 *International Journal of Food Microbiology*, 63, 275-280.
- 449 SILVA, I.M.M.; ALMEIDA, R.C.C.; ALVES, M.A.O.; ALMEIDA, P.F. (2003). Occurrence of
450 *Listeria* ssp. In critical control points and the environment of minas frescal cheese
451 processing. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 241-248.
- 452 THÉVENOT, D.; DELIGNETTE – MULLER, M. L.; CHRISTIEANS, S.; VERNOZY – ROZAND,
453 C. (2005). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing
454 plants and their products. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 85-94.
- 455 UYTENDAELE, M.; DE TROY, P.; DEBEVERE, (1999). J. Incidence of *Listeria*
456 *monocytogenes* in different types of meat products on Bealgian retail market.
457 *International Journal of Food Microbiology*, 53, 75-80.
- 458 VITAS, A.I.; AGUADO, V.; GARCIA-JALON, I. (2004). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in
459 fresh and processed foods in Navarra (Spain). *International Journal of Food*
460 *Microbiology*, 90, 349-356.
- 461 ZWIETERING, M.H.; van GERWEN, S.J.C. (2000). Sensitivity analysis in quantitative microbial
462 risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*, 58, 213-221.
- 463
- 464
- 465

466 TABLE 1. Samples from the retail market in Botucatu-SP: type, total number analyzed and
 467 number of samples positive for *L. monocytogenes*.

Sample	Nº of Analyzed Samples	Nº of Samples positive for <i>L. monocytogenes</i> (%)
Fresh sausage	10	06 (60)
Calabrese sausage	05	01 (20)
Chicken heart skewer	05	05 (100)
Poultry meat skewer	03	02 (66,7)
Bovine meat skewer	04	02 (50)
Hot Dog sausages in bulk	05	02 (40)
Hot Dog sausage	05	0 (0)
Jerked Beef	03	0 (0)
Salted and dried meat (charque)	02	0 (0)
Sliced cooked ham	05	0 (0)
Sliced seasoned loin	04	0 (0)
Total (%)	51 (100%)	18 (35,3%)

468

469

470 TABLE 2. Results of enumeration of *L. monocytogenes* in 5 samples in which the count was
 471 obtained

Sample	Count <i>L. monocytogenes</i> (CFU/g)
Pork meat sausage	100
Pork meat sausage	100
Chicken heart skewer	600
Chicken heart skewer	2700
Chicken heart skewer	>25000
Total (%): 05 (9,8%)	

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482 TABLE 3. Minimum, median and maximum values of total coliforms counts and *E. coli* in food
 483 samples collected at the retail market in Botucatu - SP.

Sample (n ^o)	Minimum (CFU/g)		Median (CFU/g)		Maximum (CFU/g)	
	Total Coliforms	<i>E. coli</i>	Total Coliforms	<i>E. coli</i>	Total Coliforms	<i>E. coli</i>
Pork meat sausage (fresh sausage) (05)	<10	<10	90	10	900	50
Tuscan sausage (fresh sausage) (05)	10	<10	160	<10	1800	90
Calabrese sausage (05)	<10	<10	<10	<10	160	<10
Bovine meat skewer (04)	60	<10	120	25	310	180
Chicken heart skewer (05)	2200	<10	33000	<10	>250000	>250000
Chicken meat skewer (03)	20	<10	30	<10	110	<10
Hot Dog sausage (05)	<10	<10	<10	<10	10	<10
Hot Dog Sausage in bulk (05)	<10	<10	<10	<10	270	<10
Jerked Beef (03)	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Salted and dried meat (charque) (02)	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Seasoned loin (04)	<10	<10	5	<10	490	<10
Cooked Ham (05)	<10	<10	<10	<10	50	<10

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494 TABLE 4. Descriptive measures of Total Coliforms count and *E. coli* according to *Listeria*
495 *monocytogenes* occurrence.

Group (<i>L. monocytogenes</i> <i>isolation</i>)	Nº of samples	Spearman Correlation (Total Coliforms x <i>E. coli</i>)	P- value
Negative	33	0,531	p<0,05
Positive	18	-0,411	p>0,05

496

497

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)