

**NEWTON NASCENTES GALVÃO**

**ADESÃO DE ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* PROVENIENTES DE  
LINHAS DE PROCESSAMENTO DE CARNE BOVINA E CARACTERIZAÇÃO  
POR PFGE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2011

**NEWTON NASCENTES GALVÃO**

**ADESÃO DE ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* PROVENIENTES DE  
LINHAS DE PROCESSAMENTO DE CARNE BOVINA E CARACTERIZAÇÃO  
POR PFGE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**Aprovada em 22 de fevereiro de 2011**

---

Márcia de Aguiar Ferreira Barros

---

Maria Aparecida Scatamburlo Moreira  
Co-orientador

---

Luís Augusto Nero  
Orientador

A luta constante de uma jornada  
é gratificante ao seu término quando  
nos recordamos dos esforços  
empenhados para tal êxito.

Newton

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pois é Ele quem abre as portas e nos dá força para que sigamos nosso caminho.

Agradeço ao meu orientador Prof. Luís Augusto Nero pela orientação, ensinamentos, compreensão e apoio. Agradeço encarecidamente pela oportunidade de vivenciar e realizar esta fase da minha vida profissional.

Aos professores Maria Aparecida Scatamburlo Moreira (UFV) e Márcia Aguiar Ferreira Barros (UnB) por prestarem grandes conselhos e auxílio na realização do projeto.

Aos estagiários e amigos do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal: Japa, Rodrigo, Gabi, Isabela e principalmente Fernanda, que foi meu braço direito nesta jornada. Aos meus colegas de mestrado deste laboratório, Mococa, Luana e Paulinha, minha eterna gratidão pela ajuda e companheirismo.

Ao Departamento de Veterinária e seus funcionários, em especial: Dagoberto, Luiz Carlos e Rosi, pela atenção e presteza.

Aos professores e pesquisadores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, especialmente a profa. Maria Teresa Destro e Eb Chiarini, pela caracterização molecular das culturas por PFGE.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Veterinária, pela oportunidade de realizar o Mestrado.

À minha família, em especial meus pais Nélio e Vani, e meu irmão Nélio Jr., por estarem sempre me fortalecendo e torcendo por minha conquista. Agradeço também em especial, ao meu padrinho Zama, pelos conselhos e atenção.

Aos meus grandes amigos em Viçosa: Emílio, Renan e Daniel, por toda a ajuda prestada e pelas horas da cerveja gelada. Agradeço também á República K-Zona Rural, pelo grande companheirismo e apoio de seus integrantes: Nelcino, Tibil, Goianin e PG, e também à Dora.

## CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS .....	v
LISTA DE TABELAS .....	vi
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1. Características de <i>Listeria</i> spp. e <i>Listeria monocytogenes</i> .....	3
2. <i>Listeria monocytogenes</i> e toxinfecções alimentares. ....	6
3. Adesão e formação de biofilmes por <i>Listeria monocytogenes</i> .....	8
4. Eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE): ferramenta para a caracterização molecular de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	13
Referências bibliográficas.....	15
OBJETIVOS .....	22
ARTIGO: ADESÃO DE <i>Listeria monocytogenes</i> ISOLADAS DE LINHAS DE PROCESSAMENTO DE CARNE BOVINA E CARACTERIZAÇÃO POR PFGE.....	23
RESUMO .....	24
ABSTRACT .....	25
Introdução .....	26
Material e Métodos.....	28
1. Culturas bacterianas.....	28
2. Avaliação da capacidade de adesão.....	29
2.1 Metodologia com placas de microtitulação .....	29
2.2 Fatores determinantes de adesão.....	29
2.3 Análise dos dados de adesão.....	31
3. Perfil genético das culturas de <i>Listeria monocytogenes</i> por PFGE .....	31
Resultados e Discussão.....	33
Conclusões.....	45
Referências Bibliográficas .....	46

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão Bibliográfica

Figura 1. Esquema mostrando o ciclo de desenvolvimento de biofilmes bacterianos. 1: células individuais numa superfície. 2: início da produção de exopolissacarídeos, quando a adesão torna-se irreversível. 3 e 4: desenvolvimento e maturação do biofilme. 5: liberação de células sésseis e fragmentos do biofilme formado (<http://www.advancedhealing.com/blog/2009/09/25/dr-ettingers-biofilm-protocol-for-lyme-and-gut-pathogens/>) ..... 9

### Artigo

Figura 1. Representação esquemática dos perfis genéticos obtidos das 29 culturas de *Listeria monocytogenes* isoladas de plantas de processamento de carne bovina após macrorestrição do DNA com Apal e Ascl, código de identificação da cultura (Id.), sorotipo (Sor.), estabelecimento no qual foi isolada (Est.), coleta (col.) e classificação quanto a capacidade de adesão (Adesão). As similaridades entre os perfis foram estimadas usando o coeficiente de Dice (1% de tolerância). ..... 43

## LISTA DE TABELAS

### Revisão Bibliográfica

Tabela 1. Características bioquímicas de *Listeria* spp..... 5

### Artigo

Tabela 1. Locais de origem das culturas de *Listeria monocytogenes* utilizadas no presente estudo (Barros et al., 2007). ..... 28

Tabela 2. Variações no protocolo de avaliação da capacidade de adesão (Stepanović et al., 2007) de culturas de *Listeria monocytogenes* isoladas de linhas de processamento de carne bovinas e produtos cárneos, considerando diferentes variáveis..... 30

Tabela 3. Frequências de culturas de *Listeria monocytogenes* classificadas em diferentes capacidades de adesão considerando a concentração aproximada do inóculo avaliado no ensaio em placas de microtitulação. .... 34

Tabela 4. Valores médios de taxas de adesão (DO teste - DO branco) de culturas de *Listeria monocytogenes* isoladas de utensílios utilizados em plantas de processamento de carne bovina e avaliadas quanto a diferentes variáveis. .... 35

Tabela 5. Valores médios de taxas de adesão (DO teste - DO branco) de culturas de *Listeria monocytogenes* isoladas do ambiente de plantas de processamento de carne bovina e avaliadas quanto a diferentes variáveis. .... 37

Tabela 6. Valores médios de taxas de adesão (DO teste - DO branco) de culturas de *Listeria monocytogenes* isoladas de carcaças bovinas e avaliadas quanto a diferentes variáveis..... 38

Tabela 7. Valores médios de taxas de adesão (DO teste - DO branco) de culturas de *Listeria monocytogenes* isoladas de produtos cárneos produzidos em plantas de processamento de carne bovina e avaliadas quanto a diferentes variáveis. .... 39

## RESUMO

GALVÃO, Newton Nascentes, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro, 2011. **Adesão de isolados de *Listeria monocytogenes* provenientes de linhas de processamento de carne bovina e caracterização por PFGE.** Orientador: Luís Augusto Nero. Co-orientadores: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira e Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

*Listeria monocytogenes* é um patógeno alimentar e se diferencia dos demais patógenos por apresentar características psicotróficas, podendo se desenvolver em temperaturas de refrigeração. Este patógeno também é conhecido por resistir a variações de pH e diferentes concentrações de NaCl. Entretanto, sua principal forma de resistência é conferida pela sua capacidade de adesão e de formar biofilmes. Neste trabalho, a capacidade de adesão de 29 culturas de *L. monocytogenes* isoladas de plantas de processamento de carne bovina foi avaliada considerando diferentes condições de cultivo, e caracterizadas através da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE). Inicialmente, as culturas foram avaliadas quanto a capacidade de adesão pelo método com placas de microtitulação considerando diferentes concentrações populacionais dos inóculos. Em seguida, as culturas foram avaliadas quanto a capacidade de adesão pelo mesmo procedimento considerando diferentes meios de cultura (infusão cérebro-coração - BHI, caldo tripticase de soja - TSB, caldo de carne - CC, todos em suas composições usuais e diluídos 1:10), fontes de carboidratos (rhamnose, glicose, frutose e maltose), concentrações de NaCl (0.5%, 2.5%, 5.0%, 7.5% e 10.0%), pH (5.0, 7.0 e 9.0), e temperaturas de incubação (4 °C, 10 °C, 25 °C e 35 °C). Considerando os resultados iniciais, todos os testes foram conduzidos com as culturas em concentração aproximada de  $10^8$  UFC/mL, e classificadas quanto a sua capacidade de adesão: fraca (8 culturas), moderada (17) e forte (4). Em geral, as culturas apresentaram maior taxa de adesão em meio de cultura BHI, com pH 7,0, incubação a 25 e 37°C, e em concentrações de NaCl a 5,0 e 7,0%. Não foram observadas diferenças relevantes entre as taxas de adesão considerando diferentes fontes de carboidrato. A caracterização molecular das culturas foi realizada pela técnica de PFGE utilizando as enzimas de restrição *Ascl* e *Apal*. PFGE produziu clusters para os sorotipos 4b e 1/2a, com similaridades de 48% e 68% respectivamente, e evidenciou a persistência de algumas cepas no ambiente de produção e manipulação de carne bovina. Os resultados obtidos evidenciam que a capacidade de adesão de *L. monocytogenes* está relacionada às suas condições ideais de desenvolvimento, além de grande variação nos pulsotipos caracterizados.



## ABSTRACT

GALVÃO, Newton Nascentes, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Adhesion of strains of *Listeria monocytogenes* isolated from processing plants for beef and characterization by PFGE.** Adviser: Luís Augusto Nero. Co-Advisers: Maria Aparecida Moreira Scatamburlo and Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

*Listeria monocytogenes* is a foodborne pathogen and differs from other pathogens by its psychrotrophic characteristic, due to its ability of growing at refrigerator temperatures. This pathogen is also known as resistant to pH changes and different concentrations of NaCl. However, its main form of resistance is conferred by its ability to adhere and form biofilms. In this work, besides studying the adhesion of *L. monocytogenes* in different culture conditions, we performed a molecular technique, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), to characterize distinct cultures isolates from beef processing plants. First, tests were conducted to evaluate the adhesion of *L. monocytogenes* cultures using a method with microtiter plates considering distinct inoculum concentrations. In a second step, the adhesion ability was evaluated considering distinct culture media (brain-heart infusion - BHI, trypticase soy broth - TSB, beef extract - BE, all at their usual composition and diluted at 1:10), carbohydrate sources (rhamnose, glucose, fructose and maltose), NaCl concentrations (0.5%, 2.5%, 5.0%, 7.5% and 10.0%), pH (5.0, 7.0 and 9.0), and incubation temperatures (4 °C, 10 °C, 25 °C and 35 °C). After assessing the adhesion of *Listeria monocytogenes*, will be performed pulsed field gel electrophoresis to assess the genetic profile of each isolate. With this technique, we can classify the isolates according to their profiles and to correlate the enzymatic capacity to adhere to the origin in the processing of beef. Considering the initial results, all cultures were tested at  $10^8$  CFU/mL e classified as their adhesion ability: weak (8 cultures), moderate (17) and strong (4). The cultures presented higher adhesion ability at non-diluted cultures media (mainly brain and heart infusion), pH 7.0, incubation at 25 and 37 °C, and NaCl concentrations of 5 and 7%. No relevant differences were observed for adhesion considering the distinct carbohydrate sources. The cultures were characterized by PFGE, using *Ascl* and *Apal* as restriction enzymes. The analysis identified two clusters for serotypes 4b and 1/2a with similarities of 48% and 68% respectively, evidencing the persistence of some strains in the environment of beef production and processing. The obtained results indicated that the adhesion of *L. monocytogenes* is related to their optimal growing conditions, despite a wide variation of characterized pulsotypes.

## INTRODUÇÃO GERAL

A emergência de *Listeria monocytogenes* como patógeno alimentar data de 1980, com a ocorrência de diversos surtos e casos esporádicos de listeriose ligados ao consumo de alimentos contaminados. Diferente da maioria dos outros patógenos, *L. monocytogenes* apresenta características psicrotróficas, podendo se desenvolver em alimentos mantidos sob temperaturas de refrigeração. Esse patógeno também é conhecido pela sua resistência a diferentes fatores comuns em alimentos, como acidez, diferentes concentrações de NaCl e à vários agentes antimicrobianos e substâncias químicas. Entretanto, a principal forma de resistência de *L. monocytogenes* é sua capacidade de adesão e formação de biofilmes.

Esse patógeno possui capacidade de se aderir e formar biofilmes em diferentes tipos de materiais, como borracha, aço inoxidável, vidro e plásticos, todos comuns em indústrias de alimentos. Assim, biofilmes contendo *L. monocytogenes* são considerados, não somente como as principais fontes de contaminação em alimentos, mas também como fonte de novas contaminações dentro de um estabelecimento. Para efetivo controle de sua contaminação em indústrias de alimentos, é fundamental a compreensão de como esse microrganismo consegue expressar sua capacidade de adesão.

Além da capacidade de adesão, a identificação de diferentes cepas de *L. monocytogenes* que se mantém num ambiente de processamento de carne bovina é importante para possível associação com os produtos finais e ocorrência de surtos e casos de toxinfecções alimentares. A partir dessa associação, medidas de controle e eliminação podem ser programadas para garantir a segurança dos produtos finais de um estabelecimento. A identificação de diferentes cepas de patógenos causadores de toxinfecções alimentares, como *L. monocytogenes*, é um procedimento usual do PulseNet, um programa do Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Para isso, a eletroforese em gel em campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE) é a principal ferramenta utilizada, pois permite a caracterização precisa de diferentes cepas desses microrganismos e a associação entre alimentos contaminados e a ocorrência de enfermidades. Além disso, considerando essa caracterização é possível o

rastreamento epidemiológico dessas culturas, identificando-se suas origens primárias no ambiente de produção e processamento de alimentos, como a carne bovina.

Considerando a importância de *L. monocytogenes* como patógeno associado a produtos cárneos, esse estudo teve como objetivo a caracterização da capacidade de adesão e definição do perfil genético de culturas previamente isoladas de ambiente de processamento de carne bovina, carcaças e produtos finais.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Características de *Listeria spp.* e *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* está relacionado filogeneticamente aos gêneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Brochotrix*. Esta posição filogenética é consistente com seu baixo conteúdo de mol % G+C (36 a 42) e atualmente compreende seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. grayi*. De todas essas espécies, apenas duas são reconhecidamente patogênicas: *L. monocytogenes*, que pode infectar uma variedade de espécies animais (incluindo o homem) e *L. ivanovii*, com patogenicidade restrita aos ruminantes (Vazquez-Boland et al., 2001a, Hain et al., 2006; Buchrieser, 2007).

*Listeria spp.* é um bacilo Gram positivo, com diâmetro de 0,4 a 0,5µm e comprimento de 0,51 a 2,0µm (Seeliger & Jones, 1986), aeróbico e facultativamente anaeróbico, não formador de esporos, e que apresenta motilidade característica em forma de “guarda chuva” quando incubado em meio de cultura próprio entre 20 a 25°C. As colônias formadas são acinzentadas brilhantes sob iluminação normal e de coloração azul esverdeada quando observadas sob iluminação oblíqua (Schuchat et al., 1991).

São microrganismos catalase positiva, oxidase negativa, sendo a faixa ótima de pH para seu desenvolvimento de 6 a 8, mas diversas pesquisas demonstraram sua multiplicação quando as faixas de pH variaram de 4,1 até 9,6. São capazes de se multiplicar em diferentes temperaturas, tempos de incubação e concentrações salinas (Cole et al., 1990; Buchanan & Klawitter, 1990). A temperatura ótima de multiplicação situa-se na faixa de 30 a 37°C, embora temperaturas extremas como 1°C e 45°C permitam o desenvolvimento de *Listeria spp.*, e congelamentos a -18°C e descongelamentos sucessivos parecem não promover a sua inativação (Schuchat et al., 1991).

O isolamento do microrganismo de ambiente anaeróbico foi demonstrado em pesquisa que avaliou amostras comerciais de carne processada e embalada a vácuo, na qual 53% das amostras testadas estavam contaminadas com *L. monocytogenes* e 4% apresentaram contagens superiores a 10<sup>3</sup> UFC/g (Grau & Vanderline, 1990). Em

pesquisa realizada com embutidos e presunto cozidos adicionados em diferentes concentrações de lactatos e acetatos e embalados a vácuo, Blom et al. (1997) concluíram que a inibição do desenvolvimento de *L. monocytogenes* ocorreu em concentrações de 2,5% de lactato e de 0,25% de acetato.

As exigências nutricionais para a multiplicação de *Listeria* spp. são praticamente as mesmas das outras bactérias Gram positivas, com boa adaptação a meios de cultura usualmente utilizados na rotina de isolamento de microrganismos, como infusão de coração e cérebro e ágar tripticase de soja. *Listeria* spp. é capaz de hidrolisar a esculina e se desenvolver na presença de 10% ou até 40% de bile e em concentrações salinas a 10%. Embora o ferro seja importante para o seu desenvolvimento *in vivo*, *L. monocytogenes* aparentemente não possui compostos específicos de ligação e esse íon seria obtido, quando necessário, a partir da redução do ferro livre que se liga a receptores de superfície (Jay et al., 2005).

A diferenciação bioquímica entre as diferentes espécies é baseada na fermentação de alguns açúcares como D-glucose, D-xilose, D-manitol e L-rhamnose e na reação de hemólise, que diferencia as espécies patogênicas de *L. innocua*, a espécie mais frequentemente encontrada. *L. monocytogenes* apresenta reação de  $\beta$ -hemólise quando semeada em ágar sangue ovino ou eqüino, formando uma estreita zona de hemólise ao redor da colônia. *L. seeligeri* pode ou não apresentar reação de hemólise fraca, e as outras espécies não são hemolíticas (Seeliger & Jones, 1986) (Tabela 1).

Tabela 1. Características bioquímicas de *Listeria* spp.

	Espécies					
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. grayi</i>
β-hemólise em ágar sangue	+	++	-	-	(+)	-
Redução do nitrato a nitrito	-	-	-	-	-	-
CAMP teste com <i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-	(+)	-
CAMP teste com <i>Rhodococcus equi</i>	-	+	-	-	-	-
Produção de ácido a partir de:						
D-manitol	-	-	-	-	-	+
L-rhamnose	+	-	V	V	-	-
D-xilose	-	+	-	+	+	-
α-metil D-manosídeo	+	-	+	+	V	NE

+ = reação positiva; ++ = reação positiva forte; (+) = reação positiva fraca; (-) = reação negativa

NE = não estabelecido

A diferenciação entre as espécies hemolíticas, e entre *L. innocua* e *L. monocytogenes* é feita através do teste Christie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP teste), já que essas duas espécies apresentam reações bioquímicas similares. O CAMP teste detecta reações sinérgicas de hemolisinas de *Listeria* spp. com a beta toxina de *Staphylococcus aureus* e com exofator de *Rhodococcus equi*. *L. monocytogenes* apresenta reação positiva com *S. aureus*, mas negativa com *R. equi*; *L. ivanovii* apresenta reação inversa e *L. innocua* apresenta reação negativa ao CAMP teste (McKellar, 1994) (Tabela 1).

*Listeria monocytogenes* está subdividida em sorotipos baseados em antígenos somáticos (O) e flagelares (H). Atualmente treze sorotipos de *L. monocytogenes* têm sido identificados (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7), mas apenas três estão relacionados a casos de listeriose humana (1/2a, 1/2b e 4b) (Slade, 1992; Rocourt & Cossart, 1997).

## **2. *Listeria monocytogenes* e toxinfecções alimentares.**

A principal forma de transmissão da *L. monocytogenes* é o consumo de alimentos contaminados (Jay et al., 2005). Isso pode ser evidenciado pela alta ocorrência do patógeno em diversos tipos de alimentos e ambientes de indústrias de alimentos (Peccio et al., 2003; Barros et al., 2007). Diversos alimentos de origem animal e vegetal têm sido relacionados a casos esporádicos e a surtos de listeriose no mundo. *L. monocytogenes* é capaz de se desenvolver e sobreviver tanto em alimentos crus quanto em alimentos processados (McLauchlin & Gilbert, 1990). Ainda, a *L. monocytogenes* pode ser transmitida pelo contato direto com animais infectados, mas essa via de transmissão é considerada rara. Nesta forma de doença surgem lesões cutâneas, especialmente sobre os braços de pessoas que manipulam animais como médicos veterinários e magarefes. McLauchlin (1996) relata a ocorrência de 17 casos na literatura mundial. Outra forma de transmissão é por contaminação cruzada durante o período neonatal, com casos de infecção nosocomial descritos (Hof & Lampidis, 2001; Colodner et al., 2003). Na maioria dos episódios relatados, as salas de parto, as enfermarias, os equipamentos e o pessoal médico envolvido foram relacionados aos casos de listeriose como fontes de infecção (McLauchlin, 1996).

O primeiro surto de listeriose de origem alimentar comprovado na América do Norte aconteceu em 1981 em Nova Escócia, Canadá, com 41 doentes e 11 mortes. Este surto foi relacionado com a ingestão de salada contendo repolho contaminado a partir de adubo *in natura* proveniente de ovinos (Schlech et al., 1983). Em 1983 ocorreu um surto em Boston, nos Estados Unidos, com 49 casos e 14 mortes, e epidemiologicamente ligado a leite pasteurizado, mas o microrganismo não foi isolado do produto (Fleming et al., 1985). Em 1985 um grande surto ocorreu no sul da Califórnia, Estados Unidos, com 142 casos e 48 mortes, e foi causado por um tipo de queijo de massa mole, denominado *Mexican-style*, produzido a partir de leite cru ou proveniente de processo de pasteurização inadequada (Linnan et al., 1988).

Com relação à listeriose causada por ingestão de produtos cárneos contaminados, o primeiro surto comprovado envolveu um tipo de patê importado pelo Reino Unido com 366 doentes e 63 mortes (McLauchlin et al., 1991), e o primeiro relato nos Estados Unidos foi de um caso esporádico relacionado ao consumo de embutido de carne de peru, por uma paciente com câncer (MMWR, 1989). Uma grande variedade de carnes e produtos cárneos, além de plantas de processamento, tem sido associada à contaminação por *L. monocytogenes* (Peccio et al., 2003; Barbalho et al., 2005). Em 2003, a presença de *L. monocytogenes* foi investigada em várias amostras de alimentos crus como leite, carne bovina e carne de frango, e em alimentos processados como carnes cozida e curada e salmão defumado, resultando em uma alta incidência, principalmente nos alimentos não processados (Vitas et al., 2004). Outro estudo realizado em 2010, na cidade de São Paulo, analisou dois tipos de produtos cárneos (presunto cozido e salame) adquiridos no comércio. A taxa de amostras positivas foi significativamente maior para o salame em relação ao presunto cozido, sugerindo um risco de listeriose maior para aquele alimento (Martins & Germano, 2010). Não somente alimentos são pesquisados quanto à ocorrência de *L. monocytogenes*, mas também equipamentos e instalações como o trabalho realizado em 2007 no estado do Paraná (Brasil), onde a ocorrência de *Listeria* spp. foi superior nas amostras de equipamentos e instalações quando comparada à de alimentos, demonstrando a importância desses pontos como fontes de contaminação para *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em linhas de processamento de carne e derivados (Barros et al., 2007).



A listeriose na forma invasiva é caracterizada por apresentar quadros graves em pessoas pertencentes aos grupos de risco. Em gestantes, a infecção é mais freqüente no terceiro trimestre, geralmente assintomática ou com sintomas de gripe. Para o feto ou recém nascido, as conseqüências são extremamente graves, incluindo aborto, morte fetal, parto prematuro, septicemia, meningite (Crespo et al., 1999; Di Maio, 2000; Colodner et al., 2003) e hidrocefalia (Laciar et al., 2000).

Em adultos *L. monocytogenes* apresenta tropismo pelo sistema nervoso central, causando meningite e meningoencefalite. Em pacientes imunocomprometidos a ocorrência de bacteremia é mais freqüente, e pode ser precedida por infecções focais como endocardites, pneumonias, osteomielite, hepatite e peritonite além de outras patologias (Kerr et al., 1988; Hofer et al., 1999; Crespo et al., 1999). Em indivíduos imunocompetentes *L. monocytogenes* pode causar uma gastroenterite febril caracterizada por febre, diarréia, dor muscular e cefaléia com um período de incubação que pode variar de 11 horas a uma semana. Em alguns casos, na ausência de sintomas gastrintestinais, pode assemelhar-se a uma gripe. Surtos de listeriose não invasiva têm envolvido uma série de alimentos prontos para o consumo, conhecidos como ready-to-eat (Sim et al., 2002).

### **3. Adesão e formação de biofilmes por *Listeria monocytogenes***

A eliminação de *L. monocytogenes* em ambientes de indústrias de alimentos é sabidamente difícil pela sua conhecida resistência a agentes antimicrobianos e substâncias químicas, como ácidos e álcalis. Entretanto, a capacidade de adesão e conseqüente formação de biofilmes são consideradas como principais fatores de persistência de *L. monocytogenes* em indústrias de alimentos (Hood & Zottola, 1995; Dykes & Moorhead, 2001; Dykes, 2003; Takhistov & George, 2004; Møretre & Langsrud, 2004). Esse microrganismo possui comprovada capacidade de adesão em superfícies de diferentes tipos de materiais, como borracha, plástico, vidro e aço inoxidável, frequentemente utilizados em utensílios e equipamentos nessas indústrias (Beresford et al., 2001; Palmer et al., 2007; Gandhi & Chikindas, 2007).

A adesão e o desenvolvimento de biofilmes podem ser estimulados por diferentes fatores ambientais sobre as células bacterianas. Situações de stress, como baixa

disponibilidade de nutrientes, baixas temperaturas e sanitizantes, são considerados os principais fatores (Bower & Daeschel, 1999; Jefferson, 2004). Os mecanismos de formação de biofilmes por *L. monocytogenes* são basicamente os mesmos usualmente apresentados por outros microrganismos (Mørretrø & Langsrud, 2004; Gandhi & Chikindas, 2007). De forma bastante simplificada, ocorre uma adesão inicial de bactérias em superfícies, desenvolvimento de microcolônias e produção de exopolissacarídeos e, por fim, maturação dos biofilmes (Chmielewski & Frank, 2003; McLandsborough et al., 2006) (Figura 1).

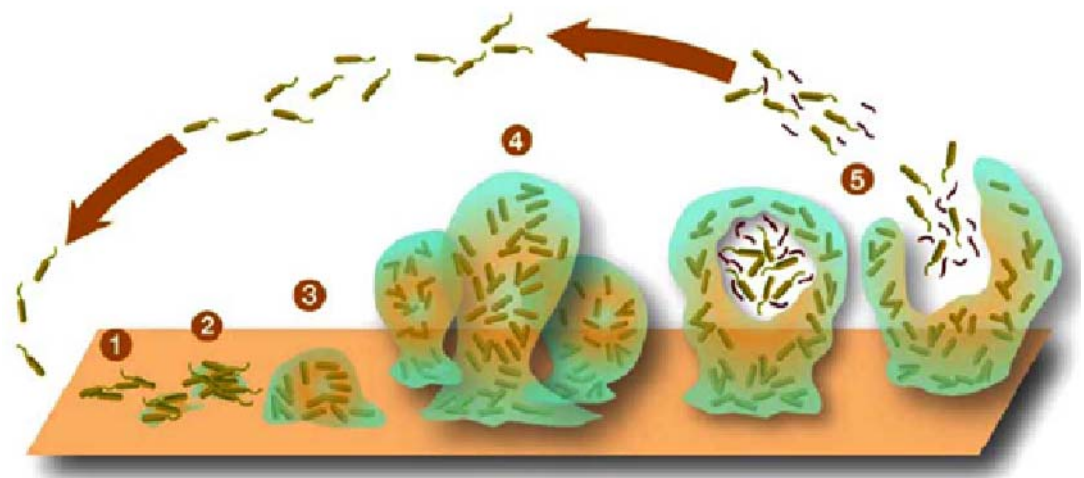


Figura 1. Esquema mostrando o ciclo de desenvolvimento de biofilmes bacterianos. 1: células individuais numa superfície. 2: início da produção de exopolissacarídeos, quando a adesão torna-se irreversível. 3 e 4: desenvolvimento e maturação do biofilme. 5: liberação de células sésseis e fragmentos do biofilme formado (<http://www.advancedhealing.com/blog/2009/09/25/dr-ettingers-biofilm-protocol-for-lyme-and-gut-pathogens/>)

Vários fatores são determinantes na adesão inicial de microrganismos em superfícies de equipamentos e utensílios utilizados na indústria de alimentos (Bower et al., 1996; Chmielewski & Frank, 2003; McLandsborough et al., 2006; Palmer et al., 2007). Inicialmente, moléculas orgânicas e inorgânicas dos alimentos que passam sobre a superfície de equipamentos tendem a formar um “filme condicionante”, que permite a concentração de vários nutrientes. Esse acúmulo pode determinar alterações em características importantes dessas superfícies como energia livre, hidrofobicidade e cargas elétricas (Kumar & Anand, 1998). O efeito desse filme

condicionante na formação de biofilmes é bastante discutido: enquanto várias pesquisas mostram que a presença de algumas proteínas impede a adesão inicial de bactérias, outros trabalhos sugerem que as substâncias orgânicas concentradas nesses filmes condicionantes são importantes fontes nutritivas para o desenvolvimento microbiano. Com isso, a importância dos filmes condicionantes na adesão de bactérias pode ser resultante das condições avaliadas, culturas bacterianas testadas, natureza da superfície e quais moléculas orgânicas formam esse filme (Kumar & Anand, 1998; Palmer et al., 2007).

Considerando as condições das superfícies, a formação dos biofilmes exige obrigatoriamente o transporte de microrganismos para o local de adesão. Essa movimentação pode ocorrer por movimentos de Brownian, sedimentação ou transporte ativo, bastante comum em utensílios e equipamentos por onde passam fluxos de alimentos líquidos ou sólidos (Bower et al., 1996; Kumar & Anand, 1998). Nesse caso, é bastante comum a fixação em junções e dobras de tubulações desses equipamentos. O transporte também é influenciado diretamente por outros fatores, como quimiotaxia e capacidade motora de certos microrganismos (Palmer et al., 2007). Assim, a presença de flagelos é considerada determinante para a interação inicial entre microrganismo e superfície, particularmente importante para *L. monocytogenes* (Møretrø & Langsrud, 2004).

Ainda, outros fatores podem ser considerados nessa etapa de adesão e contato inicial entre bactérias e superfícies. As cargas elétricas da superfície externa dos microrganismos é negativa em pH neutro, e pode ser alterada dependendo do meio de cultura, idade da cultura, resistência iônica e pH (Palmer et al., 2007). A associação entre adesão e carga elétrica da superfície de bactérias é bastante variável, dependendo da espécie estudada e condições avaliadas. Um consenso geral é que a variação da carga elétrica na superfície de microrganismos é um fator a mais a ser considerado para que ocorra o processo inicial de adesão (McLandsborough et al., 2006). A natureza hidrofóbica de paredes bacterianas também é um fator considerado importante, porém não único, para o processo de adesão (Chmielewski & Frank, 2003; Palmer et al., 2007).

Uma vez que ocorra interação entre superfície e microrganismo, um biofilme só pode ser formado quando ocorre efetivamente a adesão. Duas teorias são aceitas para

esse evento. A primeira teoria considera um processo em duas etapas, onde inicialmente o microrganismo é transportado próximo o suficiente da superfície para que seja possível uma adesão inicial (por forças de van der Waals, eletrostáticas e interações hidrofóbicas) considerada reversível (Bower et al., 1996; Palmer et al., 2007). Em seguida, o microrganismo aderido começa a produzir exopolissacarídeos ou estruturas de ancoragem específicas (pili ou fímbrias), tornando o processo de adesão irreversível (Mandlik et al., 2007). Nessa etapa, apenas ação mecânica é suficiente para remover o biofilme formado. A outra teoria consiste em um processo composto por três etapas, considerando as distâncias entre o microrganismo e a superfície: acima de 100 nm ocorre ação apenas de forças de van der Waals, até 20 nm atuam forças de van der Waals e interações eletrostáticas, e até 5 nm atuam receptores específicos que determinam adesão altamente resistente (McLandsborough et al., 2006; Palmer et al., 2007).

Uma vez aderidas, as bactérias começam a utilizar os nutrientes do “filme condicionante” e dos resíduos industriais de alimentos presentes no ambiente, e se multiplicam. Isso determina a formação de microcolônias, que crescem e tendem a formar camadas sobre a superfície inicialmente aderida (Chmielewski & Frank, 2003). Durante esse desenvolvimento, as bactérias aderidas também começam a produzir exopolissacarídeos de forma mais abundante, potencializando sua adesão e proporcionando maior estabilidade da colônia em formação em relação às variações ambientais. Em algumas espécies de microrganismos, a formação de exopolissacarídeos pode já ocorrer nos momentos iniciais da adesão, como no caso de *Pseudomonas* spp. (Kumar & Anand, 1998).

A contínua adesão de células bacterianas às colônias inicialmente formadas e já aderidas à superfície e o subsequente desenvolvimento destas, associadas a produção de exopolissacarídeos, determina a formação do biofilme (Hood & Zottola, 1995; Kumar & Anand, 1998; Chmielewski & Frank, 2003). Por essas características, a composição e dinâmica de desenvolvimento dos biofilmes são bastante variáveis, pois é possível a adesão e desenvolvimento de diferentes espécies de microrganismos, que irão aproveitar os nutrientes disponíveis de formas distintas, desenvolvendo-se mais ou menos rapidamente. As interações entre essas diferentes populações microbianas possuem papel determinante na formação do biofilme, afetando de forma significativa

sua estrutura e fisiologia. Nas comunidades usualmente encontradas em superfícies de equipamentos e utensílios de indústrias de alimentos, as interações microbianas observadas são complexas e compostas por múltiplas espécies microbianas (Kumar & Anand, 1998).

À medida que o biofilme se desenvolve, as bactérias aderidas tendem a se desprenderem e colonizar novos pontos. As células bacterianas que se soltam individualmente ou em grupos ou aglomerados. Nesse último caso, geralmente esse desprendimento gera perda de grandes porções e biomassa dos biofilmes, e pode ser provocado pelo fluxo dos alimentos sobre a superfície, além de substâncias químicas e até mesmo por alterações na superfície de adesão ou na superfície dos microrganismos, como perda de algumas estruturas de adesão (Bower et al., 1996; Kumar & Anand, 1998; Chmielewski & Frank, 2003; Jefferson, 2004). As bactérias liberadas são transportadas para novos locais, onde iniciarão um novo processo de formação de biofilme.

Biofilmes que contenham *L. monocytogenes* são considerados como as principais formas de contaminação de alimentos por esse patógeno durante o processamento industrial. Isso estimula o desenvolvimento de vários estudos que procuram elucidar os fatores e mecanismos de adesão desse microrganismo, visando principalmente o conhecimento de sua fisiologia e, conseqüentemente, formas de controle adequadas. Harvey et al. (2007) estudaram a capacidade de adesão e formação de biofilmes de 138 culturas de *L. monocytogenes* de diferentes origens (alimentos, clínicas e ambientais), e apenas 2 culturas foram classificadas como fortes formadoras de biofilmes. Di Bonaventura et al. (2008) estudaram 44 cepas de *L. monocytogenes* e verificaram maior capacidade de adesão em superfícies de vidro, quando comparadas a plásticas e de aço inoxidável, e a temperatura de 37 °C, quando comparadas a 4, 12 e 22 °C.

Apesar de situações de stress serem supostamente consideradas estimulantes para formação de biofilmes (Jefferson, 2004), *L. monocytogenes* apresentou maior capacidade de adesão em meio de cultivo rico em nutrientes e em superfície plástica (Stepanović et al., 2004). A associação entre maior capacidade de adesão e persistência de *L. monocytogenes* em ambientes industriais foi identificada por Norwood & Gilmour (1999), ressaltando a importância do controle do patógeno dentro

das indústrias a fim de se evitar a contaminação nos alimentos. Posteriormente, os mesmos pesquisadores, Norwood & Gilmour, em 2001, verificaram que *L. monocytogenes* possui maior capacidade de adesão em biofilmes associados a outras espécies, principalmente a 18 °C. A variação do pH pode também interferir na formação de biofilmes por *L. monocytogenes*, uma vez que em pH 5 ocorre redução da velocidade de adesão devido à inibição da produção de flagelina (Tresse et al., 2006).

#### **4. Eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE): ferramenta para a caracterização molecular de *Listeria monocytogenes***

Estudos com metodologias moleculares têm sido realizados para diferenciar as cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de um mesmo ambiente, como em um estabelecimento de processamento de carne e derivados. Um destes estudos consiste na eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE), que classifica os isolados de acordo com seu perfil de digestão enzimático (Autio et al., 1999; Peccio et al., 2003). Essa ferramenta é amplamente utilizada pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC), nos Estados Unidos, pelo programa PulseNet (CDC, 2010). Esse programa tem como objetivo detectar cepas de patógenos associados a casos e surtos de toxinfecções alimentares, permitindo a identificação e rastreamento de diferentes cepas de patógenos. Com esses dados, é possível a identificação de prevalência dos principais agentes causadores dessas enfermidades, além de detecção das principais fontes de contaminação. Por ser um patógeno de relevância, um dos objetivos de controle desse programa é *L. monocytogenes*.

O protocolo padronizado pelo PulseNet, para a classificação molecular de *Listeria monocytogenes* pela técnica de PFGE, utiliza as enzimas *Ascl* e *Apal* para a digestão do DNA deste patógeno. Graves & Swaminathan (2001) descreveram a padronização do protocolo para a classificação molecular de *Listeria monocytogenes*. Esta diferenciação molecular pode ser completada em até 30 horas a partir do momento em que se obtém a cultura pura. Este protocolo discrimina todas as etapas e detalhes do procedimento para realização de PFGE para *L. monocytogenes*.

Um exemplo de aplicação do PulseNet em uma investigação epidemiológica ocorreu em um surto de infecção por *L. monocytogenes*, em 2007, Massachusetts, associado a leite pasteurizado de uma produção local (MMWR, 2007). A técnica de PFGE foi

realizada para identificar o perfil enzimático dos isolados dos casos clínicos e de isolados do leite e derivados fluidos, permitindo o rastreamento preciso da origem da contaminação. Esses resultados evidenciam o potencial de contaminação do leite fluido ou derivados após o processo de pasteurização, situação já descrita em diversos surtos de listeriose (Fleming et al., 1985; Linnan et al., 1988). Outra investigação epidemiológica que utilizou o PulseNet ocorreu no Estados Unidos, em 2002 (MMWR, 2002), onde houve um surto de *L. monocytogenes* que atingiu vários estados com 46 casos confirmados de listeriose associado ao consumo de carne de frango, e a origem da contaminação foi identificada como sendo o ambiente da linha de processamento desse produto (MMWR, 2002).

Ainda, Fugett et al. (2007) usaram o PFGE para caracterizar temporariamente e geograficamente isolados de *L. monocytogenes* oriundos de casos clínicos de humanos, alimentos, fazendas, ambientes urbanos e rurais, para estabelecerem maiores detalhes na compreensão da diversidade, distribuição e ecologia desse patógeno. Neves et al. (2008) analisaram, pela técnica de PFGE, 80 isolados de *L. monocytogenes* de fontes e origens geográficas diferentes, classificados em 20 sorotipos distintos, e obtiveram 62 perfis moleculares. Esse trabalho evidencia a possibilidade de culturas de *L. monocytogenes* que possuam o mesmo sorotipo de apresentarem diferentes perfis moleculares.

A caracterização dos perfis moleculares de culturas *L. monocytogenes* permite a identificação da persistência desse patógeno nos ambientes de produção de alimentos. Além disso, com essa caracterização é possível associar com segurança a origem exata das cepas causadoras de casos e surtos de toxinfecções alimentares.

## Referências bibliográficas

- Autio, T.; Hielm, S.; Miettinen, M.; Sjöberg, A.-M.; Aarnisalo, K.; Björkroth, J.; Mattila-Sandholm, T.; Korkeala, H. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, p.150-155, 1999.
- Barbalho, T.C.F.; Almeida, P.F.; Almeida, R.C.C.; Hofer, E. Prevalence of *Listeria* spp. at a poultry processing plant in Brazil and a phage test for rapid confirmation of suspect colonies. *Food Control*, v.16, p. 211-216, 2005.
- Barros, M.A.F.; Nero, L.A.; Silva, L.C.; Ovidio, L.; Monteiro, F.A.; Tamanini, R.; Fagnani, R.; Hofer, E.; Beloti, V. *Listeria monocytogenes*: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. *Meat Science*, v.76, p.591-596, 2007.
- Beresford, M.R.; Andrew, P.W.; Shama, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. *Journal of Applied Microbiology*, v.90, p.1000-1005, 2001.
- Blom, H.; Nerbrink, E.; Dainty, R.; Hagtvedt, T.; Borch, E.; Nissen, H.; Nesbakken, T. Addition of 2,5% lactate and 0,25% acetate controls growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed, sensory-acceptable serelat sausage and cooked ham stored at 4°C. *International Journal of Food Microbiology*, v.38, p.71-76, 1997.
- Bower, C.K.; Daeschel, M.A. Resistance responses of microorganisms in food environments. *International Journal of Food Microbiology*, v.50, p.33-44, 1999.
- Bower, C.K.; McGuire, J.; Daeschel, M.A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. *Trends in Food Science and Technology*, v.7, p.152-157, 1996.
- Buchanan, R.L.; Klawitter, L.A. Effectes of temperature and oxygen on the growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4,5. *Journal of Food Science*, v.55, p.1754-1756, 1990.



- Buchrieser, C. Biodiversity of the species *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*. *Microbiology and Infection*, v.9, p.1147-1155, 2007.
- Chmielewski, R.A.N.; Frank, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.2, p.22-32, 2003.
- Cole, M.B.; Jones, M.V.; Holyoak, C. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*, v.69, p.63-72, 1990.
- Colodner, R.; Sakran, W.; Miron, D.; Teitler, N.; Khavalevsky, E.; Kopelowitz, J. *Listeria monocytogenes* cross-contamination in a nursery. *American Journal of Infectious Control*, v.31, n.5, p.322-324, 2003.
- Cordano, A. M.; Rocourt, J. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. *International Journal of Food Microbiology*, v.70, p.175-178, 2001.
- Crespo, M.P.; Vélez, J.D.; Castañeda, C.; Hoyos, F.; López, M.L.; Salazar, J.C. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en um hospital de tercer nivel. *Colombia Médica*, v.30, n.2, p.89-98, 1999.
- Destro, M.T.; Leitão, M.F.F.; Farber, J.M. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. *Applied Environmental Microbiology*, v.62, p. 705-711, 1996.
- Destro, M.T.; Serrano, A.M.; Kabliki, D.Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. *Food Control*, v.2, p.110-112, 1991.
- Di Bonaventura, G.; Piccolomini, R.; Paludi, D.; D’Orio, V.; Vergara, A.; Conter, M.; Ianieri, A. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*, v.104, p.1552-1561, 2008.
- DiMaio, H. *Listeria* infection in women. *Elsevier Science Inc. – Honorable Mention*, v.7, n.1, p. 40-46, 2000.

- Dykes, G.A Influence of the adaptation of *Listeria monocytogenes* populations to structured or homogeneous habitats on subsequent growth on chilled processed meat. *International Journal of Food Microbiology*, v.85, p.301-306, 2003.
- Dykes, G.A.; Moorhead, S.M. Combined antimicrobial effect of nisin and a listeriophage against *Listeria monocytogenes* in broth but not in buffer or on raw beef. *International Journal of Food Microbiology*, v.73, p.71-81, 2001.
- Fleming, D.W.; Cochi, S.L.; MacDonald, K.L.; Brondum, J.; Hayes, P.S.; Pilikaytis, B.D.; Holmes, M.B.; Audurier, A.; Broome, C.V.; Reingold A.L. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New England Journal of Medicine*, v.312, p.404-407, 1985.
- Fugett, E. B.; Schoonmaker-Bopp, D.; Dumas, N. B.; Corby, J.; Wiedmann, M. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) analysis of temporally matched *Listeria monocytogenes* isolates from human clinical cases, foods, ruminants farms, and urban and natural environments reveals source-associated as well as widely distributed PFGE types. *Journal of Clinical Microbiology*, v.45, p.865-873, 2007.
- Gandhi, M.; Chikindas, M.L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, v.113, p.01-15, 2007.
- Grau, F.H.; Vanderline, P.B. Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged beef. *Journal of Food Protection*, v.53, p.739-741, 1990.
- Graves, L.M.; Swaninathan, B. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, v.65, p.55-62, 2001.
- Gudbjörnsdóttir, B.; Suihko, M.-L.; Gustavsson, P.; Thorkeþsson, G.; Salo, S.; Sjöberg, A.-M.; Niclassen, O.; Bredholt, S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. *Food Microbiology*, v.21, p.217-225, 2004.

- Hain, T.; Steinweg, C.; Chakraborty, T. Comparative and functional genomics of *Listeria* spp. *Journal of Biotechnology*, v.126, p.37-51, 2006.
- Harvey, J.; Keenan, K.P.; Gilmour, A. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiology*, v.24, p.380-392, 2007.
- Hof, H.; Lampidis, R. Retrospective evidence for nosocomial *Listeria* infection. *Journal of Hospital Infection*, v.48, p.321-322, 2001.
- Hofer, C.B.; Melles, C.E.A., Hofer, E. *Listeria monocytogenes* in renal transplant recipients. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.41, p.375-377, 1999.
- Hood, S. K.; Zottola, E.A. Biofilms in food processing. *Food Control*, v.6, n.1, p.9-18, 1995.
- Jay, J. M.; Loessner, M.J.; Golden, D.A. *Modern Food Microbiology*. 7 ed., New York: Springer. 2005. 790pp.
- Jefferson, K.K. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, v.236, p. 163-173, 2004.
- Kerr, K. G.; Dealler, S. F.; Lacey, R.W. Materno-fetal listeriosis from cook-chill food. *Lancet*, ii, p.1133, 1988.
- Kumar, C.G.; Anand, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 42, p.09-27, 1998.
- Laciar, A.L.; Hasuoka, R.P.; Correa, S.M.; Miranda, A.M.; Centorbi, O.N.P. Symptomatic hydrocephalus in a newborn infected with *Listeria monocytogenes*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.31, p.09-11, 2000.
- Linnan, M.J.; Mascola, L.; Lou, X.D.; Goulet, V.; May, S.; Salminen, C.; Hird, D.W.; Yonekura, M.L; Hayes, P.; Weaver, R.; Audurier, A.; Plikaytis, B.D.; Fannin, S.L.; Kleks, A.; Broome, C.V. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *New England Journal of Medicine*, v.319, p.823-828, 1988.

- Mandlik, A.; Swierczynski, A.; Das, A.; Ton-That, H. Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends in Microbiology*, v.16, p.33-40, 2007.
- McKellar, R.C. Use of the CAMP test for identification of *Listeria monocytogenes*. *Applied Environmental Microbiology*, v.60, p.4219-4225, 1994.
- McLandsborough, L.; Rodriguez, A.; Pérez-Conesa, D.; Weiss, J. Biofilms: at the interface between biophysics and microbiology. *FOBI*, v.1, p.94-114, 2006.
- McLauchlin, J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control*, v7, n.4/5, p.187-193, 1996.
- McLauchlin, J.; Gilbert, R.J. *Listeria* in foods. *PHLS Microbiology*, v.7, p.54-55, 1990.
- McLauchlin, J.; Hall, S.M.; Velani, S.K.; Gilbert, R.J. Human listeriosis and pate: a possible association. *British Medical Journal*, v.303, p.773-775, 1991.
- Moltz, A.G.; Martin, S.E. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. *Journal of Food Protection*, v.68, p.92-97, 2005.
- MMWR - CDC - Morbidity Mortality Weekly Reports. Listeriosis associated with consumption of turkey franks. *MMWR*, v.38, p.267-268, 1989.
- MMWR - CDC - Public Health Dispatch: Outbreak of Listeriosis --- Northeastern of United States, 2002. *MMWR*. v.51, p.950-951, 2002.
- MMWR - CDC - Outbreak of *Listeria monocytogenes* infectious associated with pasteurized milk from local dairy --- Massachusetts, 2007. v.57, p.1097-1100, 2007.
- Møretre, T.; Langsrud, S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms*, v.1, p.107-121, 2004.
- Nesbakken, T.; Kapperud, G.; Caugant, D.A. Pathways of *Listeria monocytogenes* contamination in the meat processing industry. *International Journal of Food Microbiology*, v.31, p.161-171, 1996.

- Neves, E.; Lourenço, A.; Silva, A. C.; Coutinho, R.; Brito, L. Pulsed-Field Electrophoresis (PFGE) analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from different sources and geographical origins and representative of the twelve serovars. *Systematic and Applied Microbiology*, v.5, p.387-392, 2008.
- Nørrung, B.; Andersen, J.K.; Schlund, J. Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. *International Journal of Food Microbiology*, v.53, p.195-203, 1999.
- Norwood, D.E.; Gilmour, A. Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. *Journal of Applied Microbiology*, v.86, p.576-582, 1999.
- Norwood, D.E.; Gilmour, A. The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. *Letters in Applied Microbiology*, v.33, p.320-324, 2001.
- Palmer, J.; Flint, S.; Brooks, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.34, p.577-588, 2007.
- Peccio, A.; Autio, T.; Korkeala, H.; Rosmini, R.; Trevisani, M. *Listeria monocytogenes* occurrence and characterization in meat-producing plants. *Letters in Applied Microbiology*, v.37, p. 234-238, 2003.
- Rocourt, J.; Cossart, P. *Listeria monocytogenes*. In: Doyle; Beauchat; Montville. Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers, 1997.
- Schlech, W.F.; Lavigne, P.M.; Bortolussi R.A.; Allen, C.A.; Haldane, E.V.; Wort, A.J.; Hightower, A.W.; Johnson, S.E.; King, S.H.; Nichols, E.S.; Broome, C.V. Epidemic listeriosis- Evidence for transmission by food. *New England Journal of Medicine*, v.308, p.203-206, 1983.
- Schuchat, A.; Swaminathan, M.; Broome, C.V. Epidemiology of human listeriosis. *Clinical Microbiology Review*, v.4, p.169-183, 1991.

- Seeliger, H.P.R.; Jones, D. *Listeria*. In: Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E.; Holt, J.G (ed), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams e Wilkins, Baltimore, v.2, p.1234-1245, 1986.
- Sim, J.; Hood, D.; Finnie, L.; Wilson, M.; Grahan, C.; Brett, M.; Hudson, J.A. Series of incidents of *Listeria monocytogenes* non-invasive febrile gastroenteritis involving ready-to-eat meats. *Letters in Applied Microbiology*, v.35, p.409-413, 2002.
- Slade P. J. Monitoring *Listeria* in the food production environment . III. Typing methodology. *Food Research International*, v.25, p.215-225, 1992.
- Stepanović, S.; Ćirković, I.; Ranin, L.; Švabić-Vlahović, M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surfaces. *Letters in Applied Microbiology*, v.38, p.428-432, 2004.
- Stepanović, S.; Vuković, D.; Hola, V.; Bonaventura, G.; Djukić, S.; Ćirković, I.; Ruzicka, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, v.115, p.891-899, 2007.
- Takhistov, P.; George, B. Early events and pattern formation in *Listeria monocytogenes* biofilms. *Biofilms*, v.1, p.351-359, 2004.
- Tresse, O.; Leuret, V.; Benezech, T.; Faille, C. Comparative evaluation of adhesion, surface properties, and surface protein composition of *Listeria monocytogenes* strains after cultivation at constant pH of 5 and 7. *Journal of Applied Microbiology*, v.101, p.53-62, 2006.
- Vazquez-Boland, J.A.; Domínguez-Bernal, G.; González-Zorn, B.; Kreft, J.; Goebel, W. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes and Infection*, v.3, p.571-584, 2001a.
- Vitas, A. I.; Aguado, V.; Garcia-Jalon, I. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *International Journal of Food Microbiology*, v. 90, p. 349 - 356, 2004.

## OBJETIVOS

Considerando a importância de *L. monocytogenes* como patógeno associado a produtos cárneos, e a sua capacidade de se manter viável em ambientes de processamento desses produtos, esse estudo teve como objetivo geral caracterizar a capacidade de adesão de diferentes isolados desse patógeno. As culturas utilizadas para esse estudo foram previamente isoladas de equipamentos, utensílios, e ambientes de processamento de carne bovina, além de produtos finais (embutidos e carne moída embalada) e carcaças (Barros et al., 2007). Para isso, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- ✓ Verificar a capacidade de adesão das culturas em ensaio com placas de microtitulação considerando diferentes concentrações dos inóculos;
- ✓ Verificar a capacidade de adesão das culturas em ensaios com placas de microtitulação considerando variações de meios de cultura, temperaturas, pH, fontes de carboidrato e concentrações de NaCl;
- ✓ Caracterizar o perfil genético das culturas por PFGE, e associar esses resultados com os dados de adesão e as possíveis rotas de contaminação.

**ARTIGO: ADESÃO DE ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* PROVENIENTES DE  
LINHAS DE PROCESSAMENTO DE CARNE BOVINA E CARACTERIZAÇÃO POR PFGE**



## RESUMO

*Listeria monocytogenes* é um patógeno com capacidade de aderir em diversas superfícies e conseqüentemente formar biofilmes, o que pode explicar a sua persistência em ambientes de processamentos de alimentos por vários anos. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de adesão de culturas de *Listeria monocytogenes* em diferentes condições, e caracterizá-las molecularmente para verificação de possíveis rotas de contaminação. Foram utilizadas 29 culturas de *L. monocytogenes* previamente isoladas de linhas de processamento de carne bovina e sorotipadas. A capacidade de adesão foi avaliada utilizando a metodologia com placas de microtitulação, sendo avaliado diferentes concentrações da cultura testada, meios de cultura, fontes de carboidratos, concentrações de NaCl, temperaturas de incubação e valores de pH. Considerando os resultados iniciais, todos os testes foram conduzidos com as culturas em concentração aproximada de  $10^8$  UFC/mL, e classificadas quanto a sua capacidade de adesão: fraca (8 culturas), moderada (17) e forte (4). Em geral, as culturas apresentaram maior taxa de adesão em meio de cultura infusão de cérebro e coração (BHI), com pH 7,0, incubação a 25 e 37 °C, e em concentrações de NaCl a 5,0 e 7,0%. Não foram observadas diferenças relevantes entre as taxas de adesão considerando diferentes fontes de carboidrato. A caracterização molecular das culturas foi realizada pela técnica de PFGE utilizando as enzimas de restrição *Ascl* e *Apal*. PFGE produziu clusters para os sorotipos 4b e 1/2a, com similaridades de 48% e 68% respectivamente, e evidenciou a persistência de algumas cepas no ambiente de produção e manipulação de carne bovina. Os resultados obtidos evidenciam que a capacidade de adesão de *L. monocytogenes* está relacionada às suas condições ideais de desenvolvimento, além da diversificação dos pulsotipos caracterizados.

## ABSTRACT

*Listeria monocytogenes* is a pathogen capable of adhering to several surfaces and consequently forming biofilms, explaining its persistence in food processing plants for several years. The aim of this study was to evaluate the adhesion capacity of *L. monocytogenes* cultures according distinct conditions, and characterize them by molecular tools to verify possible contamination routes. *L. monocytogenes* cultures (n = 29) previously isolated from beef processing plants and serotyped were used in this study. The adhesion ability was evaluated according the methodology using microtiter plates, and the following variables were tested: inoculum concentrations, culture media, carbohydrate sources, NaCl concentrations, incubation temperatures, and pH. Considering the initial results, all cultures were tested at  $10^8$  CFU/mL e classified as their adhesion ability: weak (8 cultures), moderate (17) and strong (4). The cultures presented higher adhesion ability at media brain and heart infusion (BHI), pH 7.0, incubation at 25 and 37 °C, and NaCl concentrations of 5 and 7%. No relevant differences were observed for adhesion considering the distinct carbohydrate sources. The cultures were characterized by PFGE, using *Ascl* and *Apal* as restriction enzymes. The analysis identified two clusters for serotypes 4b and 1/2a with similarities of 48% and 68% respectively, evidencing the persistence of some strains in the environment of beef production and processing. The obtained results indicated that the adhesion of *L. monocytognes* is related to their optimal growing conditions, despite a wide variation of characterized pulsotypes.

## Introdução

*Listeria monocytogenes* tem sido considerado como um importante patógeno emergente de origem alimentar desde 1980, devido à ocorrência de diversos surtos e casos de listeriose associados ao consumo de alimentos contaminados (Schlech et al., 1983; Fleming et al., 1985; Linnan et al., 1988; McLauchlin et al., 1991). Considerando a gravidade dos sintomas dessa enfermidade (Kerr et al., 1988; Crespo et al., 1999; Hofer et al., 1999; Di Maio, 2000; Colodner et al., 2003), vários estudos tem sido desenvolvidos para identificação de suas principais fontes de contaminação, principais alimentos envolvidos em casos e surtos de toxinfecções alimentares, e caracterização de seus principais fatores de patogenicidade (Cordano & Rocourt, 2001; Peccio et al., 2003; Gudbjörnsdóttir et al., 2004; Vitas et al., 2004; Barros et al., 2007).

Produtos cárneos e alimentos prontos para o consumo são usualmente associados a *L. monocytogenes* (Jay et al., 2005; Barbalho et al., 2005; Gudbjörnsdóttir et al., 2004). Essa associação ocorre devido a suas características de produção, que necessariamente utiliza diversos utensílios e equipamentos, e os produtos finais são mantidos em temperatura de refrigeração. Essas condições favorecem a contaminação e multiplicação de *L. monocytogenes*, uma vez que esse microrganismo tende a se aderir nos utensílios e equipamentos usualmente utilizados no processamento desses produtos, e possui características psicrotróficas (Beresford et al., 2001; Palmer et al., 2007; Gandhi & Chikindas, 2007; Takhistov & George, 2004; Møretrø & Langsrud, 2004). Além desses fatores, esse patógeno também é conhecido pela sua resistência a variações de pH, concentrações de NaCl e a vários agentes antimicrobianos e substâncias químicas, o que favorece a sua persistência em ambientes de processamento de alimentos (Bower & Daeschel, 1999; Jefferson, 2004). Entretanto, a principal forma de persistência de *L. monocytogenes* em alimentos e ambiente industrial é sua capacidade de adesão e formação de biofilmes (Hood & Zottola, 1995; Dykes & Moorhead, 2001; Dykes, 2003; Takhistov & George, 2004; Møretrø & Langsrud, 2004).

*L. monocytogenes* possui alta capacidade de adesão em diferentes tipos de materiais usualmente utilizados na indústria de alimentos, como borracha, aço

inoxidável, vidro e plásticos (Beresford et al., 2001; Palmer et al., 2007; Gandhi & Chikindas, 2007). Após adesão, o microrganismo começa a se multiplicar e formar microcolônias, que se desenvolvem até a formação de biofilmes complexos (Chmielewski & Frank, 2003; McLandsborough et al., 2006). Os biofilmes formados são considerados como importantes fontes de contaminação dos alimentos produzidos, uma vez que determina a persistência das cepas de *L. monocytogenes* no ambiente de processamento e pode se desenvolver continuamente. A medida que se desenvolve, porções dos biofilmes podem se desprender e iniciar o processo de adesão em outros locais, formando novos focos de contaminação no ambiente de processamento de alimentos (Norwood & Gilmour, 1999; Møretrø & Langsrud, 2004; Stepanović et al., 2007).

Assim, a capacidade de adesão e de formação de biofilmes podem determinar a persistência de diferentes cepas de *L. monocytogenes* em um ambiente de processamento de alimentos. Porém, a identificação precisa dessa persistência é possível através de estudos moleculares que procurem determinar o perfil genético de culturas isoladas em diferentes pontos e períodos (Autio et al., 1999; Peccio et al., 2003; Fugett et al., 2007). Para isso, o Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) é uma das ferramentas mais utilizadas, pois permite o rastreamento epidemiológico de cepas do patógeno envolvidas em surtos de toxinfecções alimentares, associando-o aos alimentos envolvidos e suas origens de contaminação (Fugett et al., 2007; Neves et al., 2008). Essa metodologia é a utilizada pelo PulseNet para rastreamento epidemiológico de patógenos associados a toxinfecções alimentares, inclusive *L. monocytogenes*, pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2010), nos Estados Unidos.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade de adesão em diferentes condições de crescimento de culturas de *L. monocytogenes* previamente isoladas de ambiente de processamento de carne bovina e produtos cárneos, além de caracterizar seus perfis genéticos para determinação de suas origens e possíveis rotas de contaminação.

## Material e Métodos

### 1. Culturas bacterianas

Nesse estudo foram utilizadas culturas de *L. monocytogenes* (n = 29) obtidas de produtos cárneos e linhas de processamento de carne bovina, e previamente sorotipadas (Tabela 1, Barros et al., 2007). Essas culturas foram isoladas de cinco diferentes estabelecimentos processadores de carne bovina (A, B, C, D e E), e em várias coletas realizadas ao longo de três anos (2002 a 2005). Todos os estabelecimentos analisados recebiam carcaças bovinas para preparo de cortes e produtos cárneos, e dispunham de equipamentos e utensílios usualmente utilizados na manipulação desse produto. Todas as culturas foram conservadas liofilizadas a -80 °C, e no momento do uso foram suspendidas em 1 mL de caldo tripticase de soja (TSB, Oxoid Ltd., Basingstoke, England), incubadas a 30°C por 24h, e estriadas em ágar tripticase de soja (TSA, Oxoid), incubadas a 30 °C por 24h. Após confirmação de pureza, uma colônia isolada era semeada em TSB (Oxoid), incubada a 30°C por 24h, e a cultura obtida diluída até atingir uma turvidez semelhante a escala 0,5 de McFarland, com concentração aproximada de 10<sup>8</sup> UFC/mL.

Tabela 1. Locais de origem das culturas de *Listeria monocytogenes* utilizadas no presente estudo (Barros et al., 2007).

Local	Especificação	n	Identificação	Sorotipos
Ambiente	Piso	3	En01, En02, En03	1,2a e 4b*
	Ralo	1	En04	ns
Utensílios	Caixas plásticas	6	Ut01, Ut08 a Ut12	4b
	Amaciador	2	Ut02, Ut03	4b
	Moedor	3	Ut04, Ut05, Ut07	1,2a
	Misturador	1	Ut06	4b
Carcaças bovinas	--	9	Cc01 a Cc09	1,2a e 4b*
Produtos finais	Carne moída	1	Fp01	1,2a
	Embutidos	3	Fp02, Fp03, Fp04	4b

\* En01: 4b; En02 e En03: 1,2a; Cc01 e Cc02: 1,2a; Cc03 a Cc09: 4b

## 2. Avaliação da capacidade de adesão

### 2.1 Metodologia com placas de microtitulação

A metodologia com placas de microtitulação (Stepanović et al., 2007; com modificações) foi utilizada para avaliação da capacidade de adesão das culturas de *L. monocytogenes*, considerando diferentes variáveis.

Essa metodologia utiliza placas próprias para microtitulação com 96 poços, de poliestireno, estéreis e com fundo em forma de “U”. Um volume de 20 µL das culturas a serem analisadas foi adicionado nos poços (em quintuplicata), que foram completados com 180 µL de um meio de cultura a ser avaliado para desenvolvimento. Para cada placa utilizada, cinco poços eram reservados para o controle negativo, inoculados com o mesmo meio de cultura autoclavado. Em seguida, as placas foram incubadas em condições específicas de tempo e temperatura a serem testadas. Após incubação, o conteúdo dos poços foi descartado, e os poços submetidos a três lavagens sucessivas, utilizando 200µL de solução autoclavada de salina-fosfato tamponado (PBS, pH 7,2), para remoção de células não aderidas nas placas. O material aderido foi fixado com 200 µL de metanol em cada poço por 20 min. Em seguida, o metanol adicionado foi descartado e as placas submetidas à secagem natural por 10 min. Após secagem, 200µL de cristal violeta 1% foram adicionados em cada poço por 15 min, quando foram lavados em água corrente para retirada de excesso do corante e secas naturalmente. Em seguida, 200µL de etanol 95% foram adicionados em cada poço e as placas mantidas em temperatura ambiente por 30 min, quando a densidade óptica (DO) de cada solução em cada poço foi mensurada por espectrofotometria ( $\lambda=550\text{nm}$ ).

### 2.2 Fatores determinantes de adesão

Considerando a metodologia descrita, diferentes fatores foram avaliados para verificação de suas interferências na capacidade de adesão das culturas de *L. monocytogenes*. Todos os testes de adesão foram conduzidos em três repetições.

Inicialmente, as culturas foram avaliadas em diferentes concentrações populacionais. As culturas de *L. monocytogenes* foram diluídas em escala seriada

decimal a partir de  $10^8$  UFC/mL até atingir concentração aproximada de 10 UFC/mL. Alíquotas de todas as diluições obtidas foram adicionadas em poços de placas de microtitulação, completadas com TSB (Oxoid), com incubação a 37 °C por 24h. Após esse período, a adesão das culturas foi avaliada conforme descrito previamente.

Após essa etapa, todos os testes foram conduzidos com as culturas de *L. monocytogenes* na contração aproximada de  $10^8$  UFC/mL. As variáveis avaliadas foram: meios de cultura, fonte de carboidrato, concentração de NaCl, pH e temperatura. Considerando essas variáveis, diferentes variações foram testadas conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Diferentes variáveis usadas para avaliação da capacidade de adesão de *Listeria monocytogenes* isoladas de linhas de processamento de carne bovina e produtos cárneos.

Variável analisada	Meio de cultura*	Suplemento	pH	Incubação
Meios de cultura	BHI	nenhum	7.0	37 °C por 24h
	BHI a 10%		7.0	
	TSB		7.0	
	TSB a 10%		7.0	
	Caldo de carne		7.0	
	Caldo de carne a 10%		7.0	
Carboidratos	Caldo de carne	Rhamnose 1.0%	7.0	37 °C por 24h
		Glucose 1.0%	7.0	
		Maltose 1.0%	7.0	
		Frutose 1.0%	7.0	
NaCl	Caldo de carne	NaCl 2.5%	7.0	37 °C por 24h
		NaCl 5.0%	7.0	
		NaCl 7.5%	7.0	
		NaCl 10.0%	7.0	
pH	Caldo de carne	NaOH 0.1N ou	5.0	37 °C por 24h
		HCl 0.1N	7.0	
			9.0	
Temperatura	Caldo de carne	nenhum	7.0	4 °C por 24h 10 °C por 24h 25 °C por 24h 37 °C por 24h

\* Meios de cultura da marca Oxoid Ltda., Basingstoke, England. BHI: infusão de cérebro e coração; TSB: caldo tripticase de soja; Caldo de carne: 10 g de peptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl, 1.000 mL de água destilada (Freney et al., 1999).

### 2.3 Análise dos dados de adesão

Os resultados obtidos no primeiro teste de adesão (diferentes concentrações das culturas) foram avaliados conforme Stepanović et al. (2007), com modificações. Para cada placa de microtitulação, as DO médias das culturas foram calculadas e comparadas com o ponto de corte para o controle negativo (cut-off - DOc), que foi obtido da seguinte forma:

$$\text{DOc} = \text{Média do DO controle negativo} + 3 \times (\text{Desvio padrão de DO controle negativo})$$

Considerando esses resultados, as culturas receberam as seguintes classificações:

Ausência de adesão =  $\text{DO cultura} \leq \text{DOc}$

Adesão fraca =  $\text{DOc} < \text{DO cultura} \leq 2\text{DOc}$

Adesão moderada =  $2\text{DOc} < \text{DO cultura} \leq 4\text{DOc}$

Adesão forte =  $\text{DO cultura} \geq 4\text{DOc}$

Nos demais testes, os valores médios de DO obtidas para cada cultura foram subtraídos das médias de DO dos controles negativos em suas respectivas placas de microtitulação, e comparadas para verificação de diferenças significativas, considerando as variações para cada um dos fatores estudados (Tabela 2). Esses resultados foram comparados por ANOVA ( $p < 0.05$ ), utilizando-se o software Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

### 3. Perfil genético das culturas de *Listeria monocytogenes* por PFGE

A caracterização molecular das 29 culturas de *L. monocytogenes* foi realizada pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - USP, usando a metodologia de eletroforese em gel em campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE), com as enzimas de restrição *Ascl* e *Apal* (BioLabs, Massachusetts USA), seguindo o protocolo padronizado por Pulsenet (CDC, 2011; Graves & Swaminathan, 2001). Colônias purificadas de cada cultura foram diluídas em 2 mL de tampão TE [10 mM Tris-HCl: 1 mM EDTA (Invitrogen, CA, USA)], cuja DO foi corrigida entre 1,3 a 1,4, a 610 nm (Pharmacia Biotech, Ultraspec 2000). Dessas suspensões, 240  $\mu\text{L}$  foram transferidos para microtubos contendo 60  $\mu\text{L}$  de lisozima (Roche, New Jersey USA), com



incubação a 37 °C por 10 min. Em seguida, 300 µL de solução SDS [(1,2% SeaKenGold Agarose (Lonza, New Jersey USA), 1% SDS, 0,2 mg/mL proteinase K (Sigma-Aldrich, Minnesota USA)] foram adicionados e homogeneizados, quando foram distribuídos em moldes acrílicos (BioRad, Philadelphia USA) para formação dos blocos.

Os blocos de agarose foram tratados com a solução de lise (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 1% sarcosina e 0,2 mg/mL proteinase K) em tubos que foram incubados em *shaker* a 54 °C por 2 horas. Após duas lavagens sucessivas com água ultrapura estéril a 50 °C e quatro com tampão TE a 50 °C sob agitação constante (150 rpm), os blocos foram estocados em tampão TE em refrigerador até a restrição enzimática. Porções de cerca de 1/6 dos blocos foram retiradas com lâminas e submetidas à digestão com as enzimas de macrorrestrição, *Apal* ou *Ascl*, em seus respectivos tampões, sendo incubadas a 30 °C, por 5 horas, e a 37 °C, por 4 horas, respectivamente.

Os produtos da macrorrestrição foram separados por eletroforese em gel de agarose (Agarose SeaKem Gold 1% em tampão TBE 0,5X), empregando-se o equipamento CHEF-DR III® Variable Angle System (BioRad, Philadelphia USA) com os parâmetros: 200 Volts, tempo de 17 horas e pulsos de 4 a 40 segundos interpolados. O gel foi corado em solução de brometo de etídio (1 µL/mL), a imagem foi registrada sob luz ultravioleta, empregando-se o sistema UVP BioImaging Systems (Digidoc-IT Systems, USA). Os dendrogramas foram construídos utilizando-se o programa BioNumerics (BioRad, Philadelphia USA).

*Salmonella* sorovar Braenderup, cepa H9812, foi utilizada como referência para padrão de peso molecular. Os blocos contendo o DNA deste microrganismo foram preparados da mesma maneira que os blocos contendo DNA de *L. monocytogenes*, sendo a macrorrestrição realizada com a enzima *XbaI*, 37 °C por 2 horas.

## Resultados e Discussão

A persistência de *L. monocytogenes* em ambientes de processamentos de produtos cárneos é fundamentalmente determinada pela capacidade das cepas em se aderir em superfícies e se manterem viáveis, permitindo a formação de biofilmes e conseqüente contaminação dos alimentos produzidos (Møretrø & Langsrud, 2004). Assim, a identificação dos principais fatores de adesão é fundamental para o controle adequado da contaminação nesses ambientes.

O estudo inicial de adesão foi realizado para se estabelecer em qual concentração as culturas de *L. monocytogenes* avaliadas apresentaram o seu maior potencial de adesão, para ser utilizada como referência para os estudos de adesão específicos com diferentes fatores interferentes. Os resultados obtidos nessa etapa são apresentados na Tabela 3. Um maior número de isolados apresentaram forte adesão quando avaliadas na concentração aproximada de  $10^8$  UFC/mL, o que determinou o estabelecimento dessa concentração para os estudos complementares. Considerando esses resultados, também foi possível observar que à medida que a concentração do inóculo diminui a quantidade de isolados classificados como adesão moderada ou forte também reduzem (Tabela 3).

Apesar da variação observada (Tabela 3), estudos de adesão conduzidos com essa metodologia usualmente adotam a concentração aproximada de  $10^8$  UFC/mL, independente da espécie de microrganismo testada (Moltz & Martin, 2005). A concentração do inóculo da cultura avaliada influencia diretamente a capacidade de adesão e formação de biofilme, o que determina a necessidade de se padronizar essa variável para uma avaliação adequada de fatores que interferem na adesão (Stepanovic et al., 2007)

Tabela 3. Número de isolados de *Listeria monocytogenes* classificadas em diferentes capacidades de adesão considerando a concentração aproximada do inóculo avaliado no ensaio em placas de microtitulação.

Classificação	Concentração aproximada da cultura testada (log UFC/mL)							
	8.0	7.0	6.0	5.0	4.0	3.0	2.0	1.0
Ausência de adesão	0	1	1	1	4	6	12	16
Adesão fraca	8	8	10	14	17	17	16	12
Adesão moderada	17	18	18	14	8	6	1	1
Adesão forte	4	2	0	0	0	0	0	0

Uma vez padronizado o inóculo inicial das culturas, diferentes fatores foram avaliados como interferentes da adesão. Os resultados dessa etapa foram agrupados considerando os locais de isolamento das culturas nas linhas de processamento de carne bovina (Tabelas 1, 4, 5, 6 e 7). Em relação aos meios de cultura, duas culturas apresentaram maior adesão em BHI (Ut12 e Fp02), que foi estatisticamente superior ao caldo de carne e TSB diluídos (Tabelas 4 e 7). A escassez de nutrientes pode ser considerada um fator estressante para os microrganismos, o que induziria a sua adesão e formação de biofilmes. Essa associação é observada para várias espécies de microrganismos, como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Stepanovic et al., 2004). Entretanto, as culturas de *L. monocytogenes* avaliadas não apresentaram maior adesão em condições restritas de nutrientes, como já observado em outros estudos (Stepanovic et al., 2004; Moltz & Martin, 2005; Takhistov & George, 2004). Takhistov & George (2004) nos quais *L. monocytogenes* desenvolve biofilmes principalmente em direção a áreas com maior densidade de nutrientes, indicando que esse fator é determinante para a sua adesão. Ut12 foi classificada inicialmente como uma cultura com fraca adesão, porém os nutrientes disponíveis no BHI determinaram uma maior capacidade de adesão em relação aos outros meios de cultura diluídos (Tabela 4). O mesmo ocorreu com a cultura Fp02 (Tabela 7), que foi inicialmente classificada como com capacidade de adesão moderada.

Tabela 4. Valores médios de taxas de adesão (DO teste - DO branco) de culturas de *Listeria monocytogenes* isoladas de utensílios utilizados em plantas de processamento de carne bovina e avaliadas quanto a diferentes variáveis.

Variáveis	Culturas											
	Ut01	Ut02	Ut03	Ut04	Ut05	Ut06	Ut07	Ut08	Ut09	Ut10	Ut11	Ut12
Meios de cultura												
BHI	0,368a	0,412a	0,407a	0,221a	0,240a	0,055 <sup>a</sup>	0,255a	0,177a	0,226a	0,152a	0,296a	0,831a
BHI diluído	0,243a	0,324a	0,305a	0,177a	0,152a	0,135 <sup>a</sup>	0,136a	0,092a	0,108a	0,251a	0,228a	0,295ab
Caldo de carne	0,508a	0,508a	0,445a	0,359a	0,308a	0,201 <sup>a</sup>	0,272a	0,168a	0,184a	0,173a	0,153a	0,607ab
Caldo de carne diluído	0,242a	0,176a	0,170a	0,095a	0,059a	0,109 <sup>a</sup>	0,080a	0,064a	0,106a	0,097a	0,033a	0,150b
TSB	0,322a	0,320a	0,326a	0,187a	0,199a	0,051 <sup>a</sup>	0,151a	0,142a	0,203a	0,116a	0,218a	0,318ab
TSB diluído	0,140a	0,174a	0,160a	0,099a	0,125a	0,077 <sup>a</sup>	0,112a	0,087a	0,109a	0,233a	0,223a	0,099b
ANOVA												
<i>F</i>	2,112	1,594	2,320	2,022	2,092	1,601	2,170	1,184	0,950	1,038	1,737	5,024
<i>p</i>	0,134	0,235	0,108	0,147	0,137	0,233	0,126	0,373	0,485	0,439	0,201	0,010
Açúcares												
Frutose	0,267a	0,320a	0,377a	0,273a	0,304a	0,267 <sup>a</sup>	0,343a	0,331a	0,268a	0,203a	0,292a	0,265a
Glicose	0,275a	0,391a	0,346a	0,203a	0,252a	0,218 <sup>a</sup>	0,237a	0,318a	0,324a	0,149a	0,292a	0,238a
Maltose	0,181a	0,297a	0,320a	0,122a	0,167a	0,098 <sup>a</sup>	0,334a	0,116a	0,139a	0,133a	0,166a	0,303a
Rhamnose	0,263a	0,295a	0,318a	0,281a	0,293a	0,077 <sup>a</sup>	0,409a	0,136a	0,224a	0,226a	0,326a	0,319a
ANOVA												
<i>F</i>	1,998	0,669	0,139	2,836	1,379	3,173	0,451	5,256	2,85	0,865	1,193	0,073
<i>p</i>	0,193	0,595	0,934	0,106	0,318	0,085	0,724	0,027	0,105	0,498	0,372	0,973
NaCl												
2,5	0,168b	0,235b	0,254b	0,083a	0,088a	0,070 <sup>a</sup>	0,130a	0,162ab	0,121ab	0,172ab	0,161a	0,134a
5	0,488a	0,513a	0,584a	0,096a	0,067a	0,067 <sup>a</sup>	0,060a	0,325a	0,354a	0,203a	0,049b	0,361a
7,5	0,063bc	0,175b	0,231b	0,094a	0,127a	0,078 <sup>a</sup>	0,111a	0,149b	0,118ab	0,044bc	0,045b	0,381a
10	0,037c	0,042b	0,054b	0,050a	0,041a	0,026 <sup>a</sup>	0,057a	0,043b	0,044b	0,020c	0,039b	0,247a
ANOVA												
<i>F</i>	78,162	20,055	20,370	0,107	0,338	0,532	0,329	9,287	6,103	8,244	20,117	0,261
<i>p</i>	< 0,0001	0,000	0,000	0,954	0,799	0,673	0,804	0,006	0,018	0,008	0,000	0,851

Continuação Tabela 4

Variáveis	Culturas											
	Ut01	Ut02	Ut03	Ut04	Ut05	Ut06	Ut07	Ut08	Ut09	Ut10	Ut11	Ut12
Temperatura												
4	-0,009b	-0,006b	-0,011b	-0,007b	-0,009b	-0,010ab	-0,009b	0,006b	0,005b	0,001a	-0,010b	0,002c
10	-0,001b	0,015b	0,006b	-0,013b	-0,018b	-0,026b	-0,019b	0,021b	0,014b	0,022a	-0,004ab	0,075c
25	0,153b	0,410a	0,267ab	0,038ab	0,051ab	0,108 <sup>a</sup>	0,072ab	0,210a	0,176a	0,168a	0,036ab	1,136a
37	0,558a	0,444a	0,434a	0,151a	0,175a	0,062ab	0,193a	0,144ab	0,170a	0,200a	0,162a	0,609b
ANOVA												
F	17,734	9,419	9,528	6,113	6,43	5,753	8,673	7,348	12,891	2,429	4,507	36,164
p	0,001	0,005	0,005	0,018	0,016	0,021	0,007	0,011	0,002	0,14	0,039	< 0,0001
pH												
5	0,279ab	0,136b	0,206b	0,070a	0,094a	0,082 <sup>a</sup>	0,101a	0,104a	0,104ab	0,167a	0,233a	0,130c
7	0,558a	0,444a	0,434a	0,151a	0,175a	0,062 <sup>a</sup>	0,193a	0,144a	0,170a	0,200a	0,162a	0,609a
9	0,223b	0,277ab	0,246b	0,129a	0,161a	0,029 <sup>a</sup>	0,193a	0,069a	0,063b	0,122a	0,146a	0,209b
ANOVA												
F	7,74	8,114	16,234	1,48	1,187	2,099	2,165	1,499	6,878	0,726	1,56	321,932
p	0,022	0,02	0,004	0,3	0,368	0,204	0,196	0,296	0,028	0,522	0,285	< 0,0001

Obs: Para cada variável e por isolado testado, valores médios seguidos da mesma letra não apresentaram diferença significativa ( $P > 0.05$ ).

Tabela 5. Valores médios de taxas de adesão (DO teste - DO branco) de culturas de *Listeria monocytogenes* isoladas do ambiente de plantas de processamento de carne bovina e avaliadas quanto a diferentes variáveis.

Variáveis	Culturas			
	En01	En02	En03	En04
<b>Meios de cultura</b>				
BHI	0,703a	0,069a	0,066 <sup>a</sup>	0,302a
BHI diluído	0,570a	0,191a	0,097 <sup>a</sup>	0,135a
Caldo de carne	0,769a	0,317a	0,199 <sup>a</sup>	0,231a
Caldo de carne diluído	0,449a	0,121a	0,071 <sup>a</sup>	0,075a
TSB	0,907a	0,165a	0,107 <sup>a</sup>	0,140a
TSB diluído	0,582a	0,105a	0,071 <sup>a</sup>	0,119a
<b>ANOVA</b>				
<i>F</i>	1,999	1,225	0,999	1,158
<i>p</i>	0,151	0,356	0,459	0,384
<b>Açúcares</b>				
Frutose	0,436a	0,350a	0,361 <sup>a</sup>	0,328a
Glicose	0,451a	0,298ab	0,282 <sup>a</sup>	0,283a
Maltose	0,343a	0,116b	0,146 <sup>a</sup>	0,194a
Rhamnose	0,458a	0,225ab	0,281 <sup>a</sup>	0,318a
<b>ANOVA</b>				
<i>F</i>	0,238	5,631	2,653	2,406
<i>p</i>	0,867	0,023	0,120	0,143
<b>NaCl</b>				
2,5	0,279a	0,082a	0,102 <sup>a</sup>	0,072a
5,0	0,395a	0,061a	0,067 <sup>a</sup>	0,046a
7,5	0,565a	0,105a	0,093 <sup>a</sup>	0,093a
10,0	0,277a	0,104a	0,085 <sup>a</sup>	0,073a
<b>ANOVA</b>				
<i>F</i>	0,472	0,134	0,088	0,388
<i>p</i>	0,710	0,937	0,965	0,765
<b>Temperatura</b>				
4	-0,001c	0,002b	0,003b	0,011b
10	-0,009c	-0,001b	0,001b	0,020b
25	0,826a	0,128ab	0,108ab	0,061b
37	0,635b	0,172a	0,231 <sup>a</sup>	0,181a
<b>ANOVA</b>				
<i>F</i>	115,100	6,299	7,324	11,470
<i>p</i>	< 0,0001	0,017	0,011	0,003
<b>pH</b>				
5	0,503b	0,135a	0,121 <sup>a</sup>	0,092a
7	0,635ab	0,172a	0,231 <sup>a</sup>	0,181a
9	0,764a	0,129a	0,136 <sup>a</sup>	0,218a
<b>ANOVA</b>				
<i>F</i>	6,356	0,266	1,657	3,005
<i>p</i>	0,033	0,775	0,267	0,125

Obs: Para cada variável e por isolado testado, valores médios seguidos da mesma letra não apresentaram diferença significativa ( $P > 0.05$ ).

Tabela 6. Valores médios de taxas de adesão (DO teste - DO branco) de culturas de *Listeria monocytogenes* isoladas de carcaças bovinas e avaliadas quanto a diferentes variáveis.

Variáveis	Culturas								
	Cc01	Cc02	Cc03	Cc04	Cc05	Cc06	Cc07	Cc08	Cc09
<b>Meios de cultura</b>									
BHI	0,350a	0,165a	0,327a	0,323a	0,521a	0,236a	0,256a	0,320a	0,307a
BHI diluído	0,434a	0,115a	0,316a	0,315a	0,321a	0,287a	0,176a	0,186a	0,232a
Caldo de carne	0,440a	0,124a	0,333a	0,269a	0,592a	0,175a	0,186a	0,221a	0,264a
Caldo de carne diluído	0,203a	0,054a	0,230a	0,133a	0,235a	0,065a	0,048a	0,041a	0,049a
TSB	0,201a	0,103a	0,271a	0,178a	0,399a	0,144a	0,181a	0,197a	0,186a
TSB diluído	0,175a	0,048a	0,197a	0,166a	0,163a	0,198a	0,150a	0,118a	0,133a
<b>ANOVA</b>									
<i>F</i>	1,202	0,483	0,586	0,960	1,343	1,593	1,726	1,827	1,215
<i>p</i>	0,365	0,783	0,711	0,479	0,311	0,235	0,203	0,182	0,360
<b>Açúcares</b>									
Frutose	0,408a	0,241a	0,231a	0,229a	0,392a	0,309a	0,433a	0,327a	0,318a
Glicose	0,306a	0,212a	0,241a	0,336a	0,441a	0,316a	0,428a	0,336a	0,320a
Maltose	0,353a	0,111a	0,231a	0,203a	0,516a	0,227a	0,256a	0,253a	0,170a
Rhamonse	0,462a	0,208a	0,301a	0,291a	0,470a	0,250a	0,271a	0,218a	0,189a
<b>ANOVA</b>									
<i>F</i>	1,924	1,507	0,385	0,463	0,405	0,975	0,849	1,511	3,267
<i>p</i>	0,204	0,285	0,767	0,716	0,754	0,451	0,505	0,284	0,080
<b>NaCl</b>									
2,5	0,100a	0,069a	0,204b	0,225b	0,477a	0,305b	0,217a	0,179b	0,178b
5	0,077a	0,052a	0,418a	0,429a	0,648a	0,530a	0,299a	0,331a	0,340a
7,5	0,193a	0,116a	0,052bc	0,126bc	0,133b	0,130c	0,177a	0,065bc	0,083b
10	0,101a	0,051a	0,033c	0,065c	0,048b	0,052c	0,049a	0,019c	0,046b
<b>ANOVA</b>									
<i>F</i>	0,391	0,636	23,909	23,374	34,700	36,454	1,049	23,516	14,359
<i>p</i>	0,763	0,612	0,0000	0,000	< 0,001	< 0,001	0,422	0,000	0,001
<b>Temperatura</b>									
4	0,018b	0,005a	-0,013b	-0,017a	-0,009b	-0,017c	-0,019c	-0,012a	-0,006a
10	0,028b	-0,002a	0,000b	0,013a	0,003b	-0,006c	0,008bc	0,004a	0,018a
25	0,390a	0,219a	0,154ab	0,133a	0,107b	0,058b	0,055b	0,228a	0,333a
37	0,384a	0,246a	0,383a	0,184a	0,526a	0,214a	0,235a	0,173a	0,224a
<b>ANOVA</b>									
<i>F</i>	9,358	1,446	8,226	3,366	72,923	145,321	54,138	2,970	2,138
<i>p</i>	0,005	0,300	0,008	0,075	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,097	0,174
<b>pH</b>									
5	0,125b	0,124a	0,138a	0,112a	0,182b	0,112b	0,127b	0,088b	0,128b
7	0,384a	0,246a	0,383a	0,184a	0,526a	0,214a	0,235a	0,173a	0,224a
9	0,227ab	0,196a	0,139a	0,191a	0,228b	0,114b	0,126b	0,039ab	0,056ab
<b>ANOVA</b>									
<i>F</i>	10,094	0,742	3,983	0,827	11,600	7,659	7,992	5,482	6,344
<i>p</i>	0,012	0,515	0,079	0,482	0,009	0,022	0,020	0,044	0,033

Obs: Para cada variável e por isolado testado, valores médios seguidos da mesma letra não apresentaram diferença significativa ( $P > 0.05$ ).

Tabela 7. Valores médios de taxas de adesão (DO teste - DO branco) de culturas de *Listeria monocytogenes* isoladas de produtos cárneos produzidos em plantas de processamento de carne bovina e avaliadas quanto a diferentes variáveis.

Variáveis	Culturas			
	Fp01	Fp02	Fp03	Fp04
<b>Meios de cultura</b>				
BHI	0,335a	0,157a	0,231 <sup>a</sup>	0,220a
BHI diluído	0,390a	0,085ab	0,234 <sup>a</sup>	0,205a
Caldo de carne	0,457a	0,122ab	0,214 <sup>a</sup>	0,226a
Caldo de carne diluído	0,182a	0,012b	0,068 <sup>a</sup>	0,056a
TSB	0,225a	0,113ab	0,177 <sup>a</sup>	0,236a
TSB diluído	0,183a	0,080ab	0,173 <sup>a</sup>	0,163a
<b>ANOVA</b>				
<i>F</i>	1,045	2,659	1,219	1,053
<i>p</i>	0,436	0,077	0,358	0,432
<b>Açúcares</b>				
Frutose	0,322a	0,241a	0,410 <sup>a</sup>	0,333a
Glicose	0,318a	0,207a	0,327 <sup>a</sup>	0,279a
Maltose	0,264a	0,124a	0,256 <sup>a</sup>	0,210a
Rhamnose	0,435a	0,131a	0,268 <sup>a</sup>	0,234a
<b>ANOVA</b>				
<i>F</i>	1,534	1,785	3,110	1,544
<i>p</i>	0,279	0,228	0,089	0,277
<b>NaCl</b>				
2,5	0,076a	0,233ab	0,316 <sup>a</sup>	0,308a
5	0,043a	0,268a	0,412 <sup>a</sup>	0,384a
7,5	0,087a	0,065ab	0,195ab	0,176ab
10	0,090a	0,020b	0,038b	0,044b
<b>ANOVA</b>				
<i>F</i>	0,223	6,446	9,778	8,954
<i>p</i>	0,878	0,016	0,005	0,006
<b>Temperatura</b>				
4	0,027b	-0,012c	-0,002c	0,032a
10	0,024b	0,007c	0,009bc	0,030a
25	0,363a	0,055b	0,084b	0,225a
37	0,297ab	0,128a	0,224 <sup>a</sup>	0,204a
<b>ANOVA</b>				
<i>F</i>	5,836	46,909	32,100	3,452
<i>p</i>	0,021	< 0,0001	< 0,0001	0,072
<b>pH</b>				
5	0,105b	0,190a	0,149 <sup>a</sup>	0,121a
7	0,297a	0,128ab	0,224 <sup>a</sup>	0,204a
9	0,182ab	0,041b	0,162 <sup>a</sup>	0,155a
<b>ANOVA</b>				
<i>F</i>	10,981	6,008	2,893	2,397
<i>p</i>	0,010	0,037	0,132	0,172

Obs: Para cada variável e por cultura testada, valores médios seguidos da mesma letra não apresentaram diferença significativa ( $P > 0.05$ ).



Poucas culturas apresentaram diferenças significativas na capacidade de adesão considerando diferentes fontes de carboidratos. Apenas En02, que foi inicialmente classificada como uma cultura com fraca adesão, apresentou melhor capacidade de adesão na presença de frutose quando comparada a maltose. Kim & Frank (1994) também observaram que diferentes fontes de carboidrato não interferem significativamente a adesão e produção de biofilme. Entretanto, para algumas espécies de microrganismos as fontes de carboidratos utilizadas nos meios de cultura podem determinar melhores taxas de adesão e formação de biofilmes. Dewanti & Wong (1995) observaram que a glicose permitiu uma maior estabilidade na formação de biofilmes por *Escherichia coli* O157:H7.

A concentração de NaCl influenciou significativamente a adesão das culturas de *L. monocytogenes*. Maior adesão foi observada quando NaCl foi utilizado a 5%, e menor a 10%. Apenas as culturas isoladas de ambiente de processamento de carne bovina não sofreram interferência da concentração de NaCl em sua capacidade de adesão (Tabela 5). Esse padrão de interferência de NaCl na adesão de *L. monocytogenes* já foi observado em estudos similares, que demonstraram que em altas concentrações ocorreu inibição da adesão e formação de biofilmes. Jensen et. al. (2007) observaram que em concentrações de NaCl superiores a 5%, a maior parte das culturas de *L. monocytogenes* avaliadas não apresentou adesão. Caly et al. (2009) verificaram a capacidade de multiplicação de *L. monocytogenes* em meios de cultura com NaCl em concentrações até 15%, porém baixa capacidade de adesão em concentrações a partir de 11%.

*L. monocytogenes* é um patógeno conhecido pela sua característica psicrotrófica (Jay et al., 2005), porém baixas temperaturas não determinaram maior adesão das culturas avaliadas (Tabelas 4, 5, 6 e 7). De forma geral, as temperaturas de 25 e 37 °C permitiram maior adesão quando comparadas a 4 e 10 °C. Somente seis culturas não apresentaram diferenças significativas da capacidade de adesão em relação a diferentes temperaturas (Ut10, Cc02, Cc04, Cc08, Cc09, e Fp04). Esses resultados mostram que temperaturas próximas a ótima de multiplicação de *L. monocytogenes* determinaram maior adesão das culturas, como observado em estudos similares. Djordjevic et. al. (2002) observaram um aumento da produção de biofilme por *L. monocytogenes* em 32 °C quando comparada a 20 °C. Moltz & Martin (2005)

encontraram culturas de *L. monocytogenes* capazes de produzir biofilme a 4 °C, embora em menor quantidade do que a 20 °C ou 37 °C. Duffy & Sheridan (1997) observaram aumento da adesão de *L. monocytogenes* a 30 °C, quando comparado a 25 °C e 37 °C.

Análises com diferentes valores de pH possuem importância para avaliar a suposta interferência de sanitizantes utilizados na higienização de ambientes de processamento de alimentos, além de características intrínsecas dos produtos finais potencialmente contaminados por *L. monocytogenes*. De forma geral, o pH 7.0 favoreceu maior adesão das culturas de *L. monocytogenes*. Resultados semelhantes foram encontrados por Smoot & Pierson (1998), que observaram menores taxas de adesão de *L. monocytogenes* em pH 5.5 do que em pH 7.0 ou 8.5. Porém, En01 (Tabela 5) apresentou maior adesão em pH 9.0, e foi classificada como uma cultura com forte capacidade de adesão. Considerando que essa cultura foi isolada do piso de uma sala de manipulação de produtos cárneos, o resultado obtido sugere uma grande capacidade de persistência nesse ambiente induzida por sanitizantes alcalinos, ou adaptação a essa condição.

Por outro lado, Fp02 (Tabela 7) apresentou maior adesão em pH 5.0, e foi isolada de um produto final do tipo embutido (lingüiça maturada), sugerindo uma adaptação dessa cultura a essa condição. Stopforth et. al. (2002), entretanto, avaliaram a capacidade de adesão e formação de biofilmes por culturas de *L. monocytogenes* adaptadas ou não a diferentes valores de pH, e não observaram diferenças significativas.

A genotipagem das culturas de *L. monocytogenes* (Figura 1) permitiu uma evidente divisão entre os sorotipos previamente identificados (Barros et al., 2007). Os sorotipos identificados são frequentemente associados com casos e surtos de toxinfecções alimentares, sendo que as culturas pertencentes ao sorotipo 4b apresentaram similaridade mínima de 48%, e as pertencentes ao sorotipo 1,2a, 68%. Rivoal et al. (2010) isolaram 196 culturas de *L. monocytogenes* de amostras de ovos, com predomínio do sorotipo 1,2a e taxa de similaridade mínima de 61,7% por PFGE. Em um estudo conduzido com lingüiça fresca (Von Laer et al., 2009), vários sorotipos foram identificados (1,2c, 1,2b, 4b e 1), porém sem associação evidente com os 22 pulsotipos caracterizados por PFGE. Essa diversidade de pulsotipos independente dos sorotipos

identificados também foi observada em um estudo retrospectivo com culturas de *L. monocytogenes*, isoladas de alimentos e amostras clínicas, na Itália (Nucera et al., 2010).

Apesar da associação dos sorotipos identificados, os pulsotipos caracterizados por PFGE não apresentaram uma associação com a capacidade de adesão das culturas (Figura 1). A ausência de associação evidente também foi observada considerando o estabelecimento no qual as culturas foram isoladas. Entretanto, algumas associações foram observadas. No estabelecimento C, Fp01 foi isolada de um produto final (carne moída embalada) e classificada como uma cultura com forte capacidade de adesão, e apresentou um grau de similaridade de 82% com Cc01, Cc02, En03, En02 e Ut11, e 88% com En04, todas isoladas no mesmo estabelecimento em coletas anteriores (até 5 meses) (Figura 1). No estabelecimento E, Ut02 e Ut03 foram isoladas em amaciadores de carne um mês após a identificação de Ut01, isolada de caixa plástica de estocagem de cortes, e apresentaram 100% de similaridade genética (Figura 1).

Relações bem definidas entre culturas de *L. monocytogenes* isoladas de diferentes plantas de processamento de carne bovina e outros alimentos já foram descritas, indicando a contaminação cruzada entre equipamentos contaminados e produtos finais, além de persistência de culturas com mesmo pulsotipo em diferentes coletas (Senczek et al., 2000; Jiang et al., 2008; Rivoal et al., 2010).

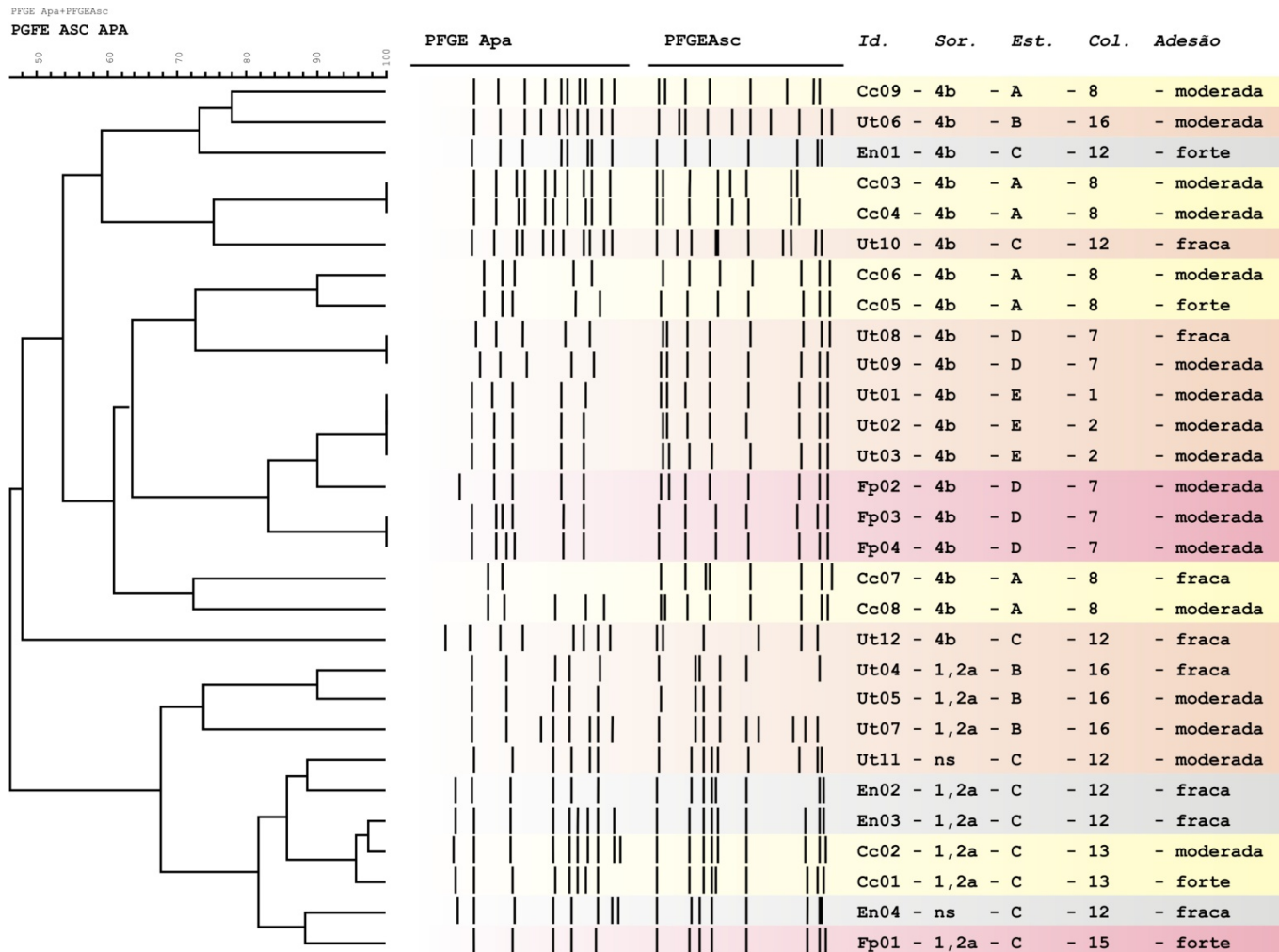


Figura 1. Representação esquemática dos perfis genéticos obtidos das 29 culturas de *Listeria monocytogenes* isoladas de plantas de processamento de carne bovina após macrorestrição do DNA com Apal e AscI, código de identificação da cultura (Id.), sorotipo (Sor.), estabelecimento no qual foi isolada (Est.), coleta (col.) e classificação quanto a capacidade de adesão (Adesão). As similaridades entre os perfis foram estimadas usando o coeficiente de Dice (1% de tolerância).

Por outro lado, não foi possível estabelecer a rota epidemiológica de algumas culturas que apresentaram grande capacidade de adesão. En01 foi isolada do piso da sala de manipulação de carcaças e preparo de cortes do estabelecimento C e foi classificada como uma cultura com forte capacidade de adesão, e apresentou maior adesão em pH 9.0 (Tabela 5). Entretanto, essa cultura não foi isolada de produtos finais ou outros locais desse estabelecimento na mesma coleta ou em visitas posteriores (Figura 1).

Também foi observada uma alta variabilidade genética das culturas isoladas do estabelecimento A em uma mesma coleta, com taxas de similaridades entre 60% e 62%, além de grande variação na capacidade de adesão, apesar de todas serem pertencentes ao sorotipo 4b (Figura 1). Essa variabilidade genética entre as culturas num mesmo estabelecimento e ausência de possíveis associações entre os locais de isolamento podem indicar a contínua contaminação por novas cepas de *L. monocytogenes*, provavelmente pela matéria-prima (Figura 1; Thévenot et al., 2006).

Os resultados obtidos mostram que a capacidade de adesão de culturas de *L. monocytogenes* isoladas de ambientes de processamento de carne bovina e de produtos cárneos é determinada principalmente pelas condições ótimas de desenvolvimento desse patógeno. Entretanto, algumas situações específicas de estresse, como pH alcalino ou ácido, podem favorecer a adesão de algumas culturas. Não foi possível uma associação evidente dos perfis genéticos caracterizados por PFGE com o potencial de adesão das culturas, sendo identificada uma grande variedade de pulsotipos e possíveis rotas epidemiológicas de contaminação.

## Conclusões

- ✓ As culturas de *Listeria monocytogenes* avaliadas apresentaram maior capacidade de adesão em valores maiores de concentração bacteriana inoculada, a partir de  $10^8$  UFC/mL.
- ✓ As culturas de *Listeria monocytogenes* obtiveram melhores taxas de adesão quando submetidas às condições ideais de desenvolvimento, exceto por algumas poucas que expressaram maior capacidade de adesão também em situações de estresse.
- ✓ Não foi possível uma associação evidente dos perfis genéticos caracterizados por PFGE com o potencial de adesão das culturas, considerando as condições testadas.
- ✓ Foram observadas algumas rotas de contaminação dentro de plantas de processamento de carne bovina e produtos cárneos.

## Referências Bibliográficas

- Autio, T.; Hielm, S.; Miettinen, M.; Sjöberg, A.-M.; Aarnisalo, K.; Björkroth, J.; Mattila-Sandholm, T.; Korkeala, H. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, p.150-155, 1999.
- Barbalho, T.C.F.; Almeida, P.F.; Almeida, R.C.C.; Hofer, E. Prevalence of *Listeria* spp. at a poultry processing plant in Brazil and a phage test for rapid confirmation of suspect colonies. *Food Control*, v.16, p. 211-216, 2005.
- Barros, M.A.F.; Nero, L.A.; Silva, L.C.; Ovidio, L.; Monteiro, F.A.; Tamanini, R.; Fagnani, R.; Hofer, E.; Beloti, V. *Listeria monocytogenes*: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. *Meat Science*, v.76, p.591-596, 2007.
- Beresford, M.R.; Andrew, P.W.; Shama, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. *Journal of Applied Microbiology*, v.90, p.1000-1005, 2001.
- Bower, C.K.; Daeschel, M.A. Resistance responses of microorganisms in food environments. *International Journal of Food Microbiology*, v.50, p.33-44, 1999.
- Caly, D.; Takilt, D.; Lebret, V.; Tresse, O. Sodium chloride affects *Listeria monocytogenes* adhesion to polystyrene and stainless steel by regulating flagella expression. *Letters in Applied Microbiology*, v.49, p.751-756, 2009.
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention. PulseNet protocols. Disponível em <http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols.htm>, acesso em 25 de janeiro de 2011.
- Chmielewski, R.A.N.; Frank, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.2, p.22-32, 2003.

- Colodner, R.; Sakran, W.; Miron, D.; Teitler, N.; Khavalevsky, E.; Kopelowitz, J. *Listeria monocytogenes* cross-contamination in a nursery. *American Journal of Infectious Control*, v.31, n.5, p.322-324, 2003.
- Cordano, A.M.; Rocourt, J. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. *International Journal of Food Microbiology*, v.70, p.175-178, 2001.
- Crespo, M.P.; Vélez, J.D.; Castañeda, C.; Hoyos, F.; López, M.L.; Salazar, J.C. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en um hospital de tercer nivel. *Colombia Médica*, v.30, n.2, p.89-98, 1999.
- Dewanti, R; Wong, A. C. L. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, v.26, p.147-164, 1995.
- DiMaio, H. *Listeria* infection in women. *Elsevier Science Inc. – Honorable Mention*, v.7, n.1, p. 40-46, 2000.
- Djordjevic D.; Wiedmann M.; McLandsborough L. A. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, p.2950-2958, 2002.
- Duffy G.; Sheridan J. J. The effect of temperature, pH and medium in a surface adhesion immunofluorescence technique for detection of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, v.83, p.95-101, 1997.
- Dykes, G.A Influence of the adaptation of *Listeria monocytogenes* populations to structured or homogeneous habitats on subsequent growth on chilled processed meat. *International Journal of Food Microbiology*, v.85, p.301-306, 2003.
- Dykes, G.A.; Moorhead, S.M. Combined antimicrobial effect of nisin and a listeriophage against *Listeria monocytogenes* in broth but not in buffer or on raw beef. *International Journal of Food Microbiology*, v.73, p.71-81, 2001.
- Fleming, D.W.; Cochi, S.L.; MacDonald, K.L.; Brondum, J.; Hayes, P.S.; Pilikaytis, B.D.; Holmes, M.B.; Audurier, A.; Broome, C.V.; Reingold A.L. Pasteurized milk as a vehicle



- of infection in an outbreak of listeriosis. *New England Journal of Medicine*, v. 312, p.404-407, 1985.
- Freney J.; Kloos W.E.; Hajek V.; Webster J.A.; Bes M.; Brun Y.; Vernozy-Rozand C. Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. Subcommittee on the taxonomy of staphylococci and streptococci of the International Committee on Systematic Bacteriology. *International Journal of Bacteriology*, v.49, p.489-502. 1999.
- Gandhi, M.; Chikindas, M.L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, v.113, p.01-15, 2007.
- Graves, L.M.; Swaminathan, B. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, v.65, p.55-62, 2001.
- Gudbjörnsdóttir, B.; Suihko, M.-L.; Gustavsson, P.; Thorkelsson, G.; Salo, S.; Sjöberg, A.-M.; Niclassen, O.; Bredholt, S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. *Food Microbiology*, n. 21, p. 217-225, 2004.
- Hofer, C.B.; Melles, C.E.A., Hofer, E. *Listeria monocytogenes* in renal transplant recipients. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.41, p.375-377, 1999.
- Hood, S. K.; Zottola, E.A. Biofilms in food processing. *Food Control*, v. 6, n.1, p.9-18, 1995.
- Jay, J. M.; Loessner, M.J.; Golden, D.A. *Modern Food Microbiology*. 7 ed., New York: Springer. 2005. 790pp.
- Jefferson, K.K. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, v.236, p. 163-173, 2004.

- Jensen, A.; Larsen, M. H.; Ingmer, H.; Vogel, B. F.; Gram, L. Sodium chloride enhances adherence and aggregation and strain variation influences invasiveness of *Listeria monocytogenes* strains. *Journal of Food Protection*, v.70, p.592-599, 2007.
- Jiang L.; Chen J.; Xu J.; Zhang X.; Wang S.; Zhao H.; Vongxay K.; Fang W. Virulence characterization and genotypic analyses of *Listeria monocytogenes* isolates from food and processing environments in eastern China. *International Journal of Food Microbiology*, v.121, p.53-59, 2008.
- Kerr, K. G.; Dealler, S. F.; Lacey, R.W. Materno-fetal listeriosis from cook-chill food. *Lancet*, ii, p.1133, 1988.
- Kim K. Y.; Frank J. F. Effect of growth nutrients on attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Journal of Food Protection*, v.57, p.720-724, 1994.
- Linnan, M.J.; Mascola, L.; Lou, X.D.; Goulet, V.; May, S.; Salminen, C.; Hird, D.W.; Yonekura, M.L; Hayes, P.; Weaver, R.; Audurier, A.; Plikaytis, B.D.; Fannin, S.L.; Kleks, A.; Broome, C.V. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *New England Journal of Medicine*, v.319, p.823-828, 1988.
- McLandsborough, L.; Rodriguez, A.; Pérez-Conesa, D.; Weiss, J. Biofilms: at the interface between biophysics and microbiology. *FOBI*, v.1, p.94-114, 2006.
- McLauchlin, J.; Hall, S.M.; Velani, S.K.; Gilbert, R.J. Human listeriosis and pate: a possible association. *British Medical Journal*, v.303, p.773-775, 1991.
- Moltz A.G.; Martin S.E. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. *Journal of Food Protection*, v.68, p.92-97, 2005.
- Møretrø, T.; Langsrud, S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms*, v.1, p.107-121, 2004.
- Neves, E.; Lourenço, A.; Silva, A.C.; Coutinho, R.; Brito, L., Pulsed-Field Electrophoresis (PFGE) analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from different sources and geographical origins and representative of the twelve serovars. *Systematic and Applied Microbiology*, v.5, p.387-392. 2008.

- Norwood, D.E.; Gilmour, A. Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. *Journal of Applied Microbiology*, v.86, p.576-582, 1999.
- Nucera, D.; Lomonaco, S.; Bianchi, D.M.; Decastelli, L.; Grassi, M.A.; Bottero, M. T.; Civera, T. A five year surveillance report on PFGE types of *Listeria monocytogenes* isolated in Italy from food and food related environments. *International Journal of Food Microbiology*, v.140, p.271-216, 2010.
- Palmer, J.; Flint, S.; Brooks, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.34, p.577-588, 2007.
- Peccio, A.; Autio, T.; Korkeala, H.; Rosmini, R.; Trevisani, M. *Listeria monocytogenes* occurrence and characterization in meat-producing plants. *Letters in Applied Microbiology*, v.37, p. 234-238, 2003.
- Rivoal, K.; Quéguiner, S.; Boscher, E.; Bougeard, S.; Ermel, G.; Salvat, G.; Federigh, M.; Jugiau, F.; Protais, J. Detection of *Listeria monocytogenes* in raw and pasteurized liquid whole eggs and characterization by PFGE. *International Journal of Food Microbiology*, v.138, p. 56-62, 2010.
- Schlech, W.F.; Lavigne, P.M.; Bortolussi R.A.; Allen, C.A.; Haldane, E.V.; Wort, A.J.; Hightower, A.W.; Johnson, S.E.; King, S.H.; Nichols, E.S.; Broome, C.V. Epidemic listeriosis- Evidence for transmission by food. *New England Journal of Medicine*, v.308, p.203-206, 1983.
- Senczeck, D.; Stephan, R.; Untermann, F. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from a meat processing plant over a 2-year period. *International Journal of Food Microbiology*, v.62, p.155-159, 2000.
- Slade, P.J. Monitoring *Listeria* in the food production environment . III. Typing methodology. *Food Research International*, v.25, p.215-225, 1992.
- Smoot, L.M.; Pierson, M.D. Influence of environmental stress on the kinetics and strength of attachment of *Listeria monocytogenes* Scott-A to Buna-N rubber and stainless steel. *Journal of Food Protection*, v61, p.1286-1292, 1998.

- Stepanović, S.; Vuković, D.; Dakić, I.; Savić, B.; Svabić-Vlahović, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, v.40, p.175-179, 2000.
- Stepanović, S.; Vuković, D.; Hola, V.; Bonaventura, G.; Djukić, S.; Čircović, I.; Ruzicka, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, v.115, p.891-899, 2007.
- Stopforth, J.D.; Samelis, J.; Sofos, J.N.; Kendall, P.A.; Smith, G.C. Biofilm formation by acid-adapted and non-adapted *Listeria monocytogenes* in fresh beef decontamination washings and its subsequent inactivation with sanitizers. *Journal of Food Protection*, v.65, p.1717-1727, 2002.
- Takhistov, P.; George, B. Early events and pattern formation in *Listeria monocytogenes* biofilms. *Biofilms*, v.1, p.351-359, 2004.
- Takhistov, P.; George, B. Linearized kinetic model of *Listeria monocytogenes* biofilm growth. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. v. 26, p. 259-270, 2004.
- Thévenot, D.; Dernburg, A.; Vernozy-Rozand, C. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *Journal of Applied Microbiology*, v.101, p.7-17, 2006.
- Vitas, A.I.; Aguado, V.; Garcia-Jalon, I. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *International Journal of Food Microbiology*, v.90, p.349-356, 2004.
- Von Laer, A.E.; Lima, A.S.; Trindade, P.S.; Andriguetto, C.; Destro, M. T.; Silva, W.P. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from a fresh mixed sausage processing line in Pelotas-RS by PFGE. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.40, p.574-582, 2009.